

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SH SY5Y HÜCRE HATTINDA BACE1 GENİNİN BÜTEİN
VE SODYUM BÜTİRAT İLE ALTERNATİF
KIRPILMASININ İNDÜKLENMESİ VE OLUŞAN
İZOFORM PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

Gülsevinç AY

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP**

ADANA-2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**SH SY5Y HÜCRE HATTINDA BACE1 GENİNİN BÜTEİN
VE SODYUM BÜTİRAT İLE ALTERNATİF
KIRPILMASININ İNDÜKLENMESİ VE OLUŞAN
İZOFORM PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

Gülseviç AY

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP**

Bu tez, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından desteklenmiştir.

Tez No:.....
ADANA-2017

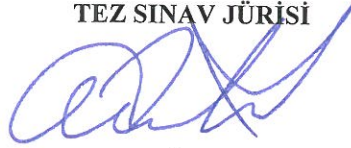
KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“SH SY5Y Hücre Hattında BACE1 Geninin Büttein ve Sodyum Bütirat ile Alternatif Kırılmasının
İndüklenmesi ve Oluşan İzofom Profilinin İncelenmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 17 / 08 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof Dr. H. Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Yrd. Doç. Dr. Mustafa Ertan AY
Mersin Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
kabul edilmiştir.

sayılı kararı ile

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 21.10.8./2017

İMZA

Adı Soyadı

Gülsevinc AY



Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyoloji Tezli YL Programı

Tezin Konusu : SH SY5Y Hücre Hattında BACE1 Geninin Büttein ve Sodyum Bütirat ile Alternatif Kırılmaya İndüklenmesi ve Oluşan İzofrom Profilinin İncelenmesi

Tezin Türü : Yüksek Lisans : Doktora:

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. H.Ümit LÜLEYAP

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : +903223386060*3498

E-Posta : ululeyap@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : +905057039746

E-Posta : gulsevinc91ay@gmail.com

Adresi : Yeşilyurt mahallesi. 70069 sok.Sezer Apt. Kat:4 No:6 Seyhan/ADANA

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen ve yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız değerli Öğretim Üyelerinden, Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a, Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na ve Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Ar.Gör. Gamze CÖMERTPAY'a, Ar.Gör. İlayet Nur USLU'ya, Dok. Öğr., Gülşah EVYAPAN'a, Yük. Lis. Öğr. Nesrin ÇETİNEL'e ve Yük. Lis. Öğr. Hale ÖKSÜZ'e teşekkür ederim.

Çalışmamın istatistiksel analizlerini yaparken yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Betül DAĞOĞLU'na teşekkür ederim.

2014 yılında başladığım Lisansüstü eğitimim boyunca 2228/A burs programı kapsamında beni maddi açıdan destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Son olarak, sevgilerini hiç bir zaman esirgemeyen, her konuda arkamda duran, destekleri ile beni cesaretlendiren biricik aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	xii
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)	3
2.1.1. AH Patolojisi	5
2.1.1.1. Amiloid Beta (A β)	6
2.1.1.2. Nörofibrilar Yumaklar	9
2.1.1.3. Sinaptik Dejenerasyon	10
2.1.2. AH'nin Genetiği	10
2.1.2.1. Ailesel AH (Erken başlangıçlı/ FAH)	11
2.1.2.2. Sporadik AH (Geç-başlayan/SAH)	13
2.1.2.2.1. AH Riskini Artıran Faktörler	14
2.1.2.2.2. AH Riskini Azaltan Faktörler	17
2.1.3. AH ile ilgili Hipotezler	18
2.1.3.1. Kolinergic Hipotez	18
2.1.3.2. Amiloid Kaskat Hipotezi	19
2.1.3.2.1. A β 'nın Dahil Olduğu Diğer Yolaklar	19
2.1.4. A β Yıkımı	22
2.1.5. AH Tanı ve Tedavisi	23
2.1.6. BACE1 (β -sekretaz 1) Enzimi	25
2.1.6.1 BACE1 Enziminin İzofomları.	29
2.2. Histon Deasetilazlar (HDAC) ve İnhibitörleri	32
2.2.1. HDAC İnhibitörleri ve AH	33

2.2.2. Sodyum Bütirat	34
2.2.3. Büttein	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Araç ve Gereçler	37
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	37
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	38
3.2. Yöntem	38
3.2.1. SH SY5Y Hücre Hattının Özellikleri	38
3.2.2. SH SY5Y Hücrelerinin Büyümesi Ortamının Hazırlanması	39
3.2.3. Kimyasallar için Stok Çözeltilerin Hazırlanması	39
3.2.3.1. 5 mM Sodyum Bütirat (NAB) İçin 1M Stok Çözeltisinin Hazırlanması	39
3.2.3.2. 1 mM Sodyum Bütirat (NAB) İçin 1M Stok Çözeltisinin Hazırlanması	40
3.2.3.3. 0,1 mM Büttein Stok Çözeltisinin Hazırlanması	40
3.2.4. SH SY5Y Hücre Hattının Çözülmesi	40
3.2.5. Hücrelerin Pasajlanması	41
3.2.6. Hücrelerin Sayımı	41
3.2.7. RNA İzolasyonu	42
3.2.8. cDNA Eldesi	43
3.2.9. Real-Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu	44
3.2.10. Real-Time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	46
3.2.11. İstatistiksel Analizler	47
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	58
EKLER	65
EK-1	65
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1:	Sağlıklı beyin dokusu ile AH'li beyin dokusu	5
Şekil 2:	AH'nin patolojisinde görülen senil plaklar ve nörofibrilar yumaklar	6
Şekil 3:	APP'nin 2 farklı yolakta kesimi	7
Şekil 4:	AH'de A β patolojisi	8
Şekil 5:	AH'nin genetik sebepleri	11
Şekil 6:	Populasyonlara göre APP gen mutasyonları	12
Şekil 7:	AH riskini artıran faktörler	14
Şekil 8:	A β 'nin hücre içinde etkilediği yolaklar	20
Şekil 9:	AH'nin tanı kriterleri	24
Şekil 10:	BACE1 enziminden hücre yüzeyinden endositoz ile alınıp, daha sonra hücre yüzeyine geri dönüşü	26
Şekil 11:	BACE1 enziminin hücre içi trafiği	26
Şekil 12:	BACE1 enzimini kodlayan genin 11. Kromozomdaki konumu	27
Şekil 13:	BACE1 enziminin temel yapısı	28
Şekil 14:	BACE1 pre-mRNA'sında BACE1 izoformlarının oluşması için kullanılan kırılma bölgeleri	31
Şekil 15:	Bütirik asitin sodyum tuzunun (NaB) kimyasal yapısı	34
Şekil 16:	Büteinin kimyasal yapısı	35
Şekil 17:	SH SY5Y hücrelerinin mikroskopta 10x büyütmedeki görüntüsü	39
Şekil 18:	1 mM sodyum bütirat konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları	49
Şekil 19:	5 mM sodyum bütirat konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları	49
Şekil 20:	2 μ M bütein konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları	50
Şekil 21:	2 μ M bütein konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1:	Bazı sporadik AH risk genleri	15
Çizelge 2:	SHSY57 hücrelerinin büyüme ortamının içeriği	39
Çizelge 3:	Reverse transkripsiyon için kullanılan reaksiyon bileşenleri	43
Çizelge 4:	Revers transkripsiyon reaksiyonunun aşamaları	44
Çizelge 5:	Hedef genlere özgü dizayn edilen primer çiftleri	45
Çizelge 6:	Sybr green Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler	45
Çizelge 7:	Real-Time PCR reaksiyonunun aşamaları	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
ABAD	: A β Bağlanma Alkol Peroksidaz
ABCA7	: ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcısı A7
ADRDA	: Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü
AH	: Alzheimer Hastalığı
AICD	: Amiloid Prekürsör Protein Hücre İçi Domaini
APOϵ2	: Apolipoprotein E2'nin ϵ 2 Alleli
APOϵ3	: Apolipoprotein E2'nin ϵ 3 Alleli
APOϵ4	: Apolipoprotein E2'nin ϵ 4 Alleli
APP	: Amiloid Prekürsör Proteini
Aβ₄₀	: 40 aa'lık β -Amiloid Peptidi
Aβ₄₂	: 42 aa'lık β -Amiloid Peptidi
Aβ	: β -Amiloid Peptidi
BACE1	: Beta-bölgesi Amiloid Prekürsör Proteini Kesen Enzim 1
BACE1₁₂₇	: 127 aa uzunluğunda BACE1 izoformu
BACE1₄₃₂	: 432 aa uzunluğunda BACE1 izoformu
BACE1₄₅₅	: 455 aa uzunluğunda BACE1 izoformu
BACE1₄₅₇	: 457 aa uzunluğunda BACE1 izoformu
BACE1₅₀₁	: 501 aa uzunluğunda BACE1 izoformu
BIN1	: Myc Box Bağımlı Etkileşim Proteini 1
Büt	: Bütein
°C	: Santigrat Derece
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
cDNA	: Komplementer DNA
CLU	: Clusterin Geni
CR1	: Komplement Reseptör 1 Geni
CSF	: Serebrospinal Sıvı
Ct	: Eşik Döngüsü
CVD	: Kardiyovasküler Hastalık

DMEM/F12	: Dulbecco tarafından Modifiye Edilmiş Eagle Mediumu
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dNTP	: DeoksiNükleotid Tri Fosfat
DSM IV	: Tanısal ve İstatistiksel El kitabı IV
ECE	: Endotelin Dönüştürücü Enzimler
EPHA1	: Efrin Tip A Reseptör 1
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER Aracılı Degradasyon Yolağı
FAH	: Ailesel (Erken başlangıçlı) Alzheimer Hastalığı
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
G	: Guanin Nükleotidi
g	: Gram
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GSH	: Glutatyon Peroksidaz
GWAS	: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HAT	: Histon Asetil Transferaz Enzimi
HDAC	: Histon Deasetilaz Enzimi
HDL	: Yüksek-Yoğunluklu Lipoprotein
HEK293	: İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri
hnRNP H	: Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein
IDE	: İnsülin Degrade Eden Enzim
IL-1R2	: İnterlökin-1 Reseptör II
iNOS	: İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz
kb	: Kilobaz
kDA	: Kilodalton
LRP	: Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
MR	: Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NaB	: Sodyum Bütitrat
NAD	: Nikotinamid Dinükleotid
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa
NINCDS	: İnce-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği
NMDA	: N-metil-N-aspartat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NRG-1	: Neuregulin 1
PICALM	: Fosfotidilinozitol Bağlayan Klatrin Birleştirme Proteini
PS	: Penisilin/Streptomisin
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PSGL1	: P-selektin Glikoprotein Ligand-1
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT	: Ters Transkripsiyon
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAH	: Sporadik (Geç başlayan) Alzheimer Hastalığı
sAPPα	: Çözünebilir Amiloid Prekürsor Protein α
sAPPβ	: Çözünebilir Amiloid Prekürsor Protein β
SORL1	: Sortilin İlişkili Reseptör 1
ST6-Gal1	: β-galaktosidaz, α-2,6-sialil Transferaz
SH SY5Y	: Nöroblastoma Hücre Hattı
TNFα	: Hücre Ölüm Faktörü Alfa
TRH	: Tiroid Uyarıcı Hormonu Serbestleştirici Hormon
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı
VGSCβ	: Voltaj-Kapılı Sodyum Kanallarının β-Alt Birimi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

α	: Alfa
β	: Gama
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
ε	: Epsilon
ΔCt	: Ct Hedef gen – Ct Referans gen
$\Delta\Delta\text{Ct}$: Deney Grubu ΔCt - Kontrol grubu ΔCt



ÖZET

SH SY5Y Hücre Hattında BACE1 Geninin Bütein ve Sodyum Bütirat ile Alternatif Kırpılmaya İndüklenmesi ve Oluşan İzoform Profilinin İncelenmesi

Nörodejeneratif hastalıklar grubunda ilk sırada yer alan Alzheimer hastalığına yönelik tedavi yaklaşımlarında BACE1 enzimi (beta-bölgesi amiloid prekürsör proteini kesim enzimi) oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu enzim Alzheimer hastalığının önemli nedenlerinden biri olan β -amiloidin oluşumundan sorumludur. Bu enzimin beyin dokusundaki tam uzunluktaki aktif olan formunun dışında farklı dokularda da birden fazla izoforma sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca alternatif kırılma sonucu oluşan izoformlardaki artışın β -amiloid miktarını azalttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda; histon deasetilaz inhibitörü olarak bilinen sodyum bütirat ve büteinin Alzheimer hastalığında önemli rolü olduğu bilinen BACE1 enziminin alternatif kırılma sonucu oluşmuş izoformlarına olan etkisi incelenmiştir. SH-SY5Y hücrelerine iki farklı dozda uygulanan sodyum bütirat (1 mM ve 5 mM) ve büteinin (2 μ M ve 10 μ M), farklı alternatif kırılmalar sonucu oluşmuş izoformların ifade düzeylerine etkisi Real-Time PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Mann-Whitney U-testine göre, hem sodyum bütiratın hem de büteinin iki dozu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ($p>0.05$) Hem 1 mM'lık hem de 5 mM'lık sodyum bütirat dozu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BACE₅₀₁ ekspresyonunu artırmıştır. 1mM NaB BACE₁₄₅₇ ve BACE₁₄₃₂ ekspresyonunu azaltırken, 5 mM NaB BACE₁₄₅₇ ve BACE₁₄₃₂ ekspresyonunu artırmıştır. Hem 2 μ M'lık hem de 10 μ M'lık bütein konsantrasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BACE₁₅₀₁ ekspresyonunu artırmıştır. 2 μ M bütein BACE₁₄₅₇ ekspresyonunu bir miktar artırırken, 10 μ M bütein BACE₁₄₃₂ ekspresyonunu 3 kat artırmıştır. 2 μ M bütein BACE₁₄₃₂ üzerinde herhangi bir değişiklik yapmazken, 10 μ M bütein BACE₁₄₃₂ ekspresyonunu yaklaşık 2 kat artırmıştır.

Sonuç olarak kullandığımız HDAC inhibitörlerinin seçici olarak, ekspresyon düzeyinde anlamlı değişikliklere sebep olabileceğini düşünülen BACE1 izoformları üzerinde beklenen etkiye neden olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, BACE1 Enzimi, Bütein, Sodyum Bütirat

ABSTRACT

Induction to Alternative Splicing of BACE1 Gene With Sodium Butyrate And Butein in SH SY5Y Cell Line and Identification of Resulting Isoform Profile

BACE1 enzyme (beta-site amyloid precursor protein enzyme 1) has a highly important role in treatment for Alzheimer Disease which is in first place within group of neurodegenerative disease. The enzyme is responsible for production β -amyloid which is hallmark of Alzheimer's Disease. It is reported that the enzyme has several isoform in different tissues apart from full-length active form in brain tissue. Also it is shown that increase in amount of these alternatively spliced isoforms reduces amount of β -amyloid which has important function in Alzheimer's Disease.

In this study, it has been examined effect of sodium butyrate and butein known as histone deacetylase inhibitor on alternative splicing of the BACE1 enzyme known importance in Alzheimer's Disease. It has evaluated effect of sodium butyrate (1 mM and 5 mM) and butein (2 μ M and 10 μ M) treated to SH-SY5Y cell on expression of alternatively spliced isoforms by Real-Time PCR. According to Mann-Whitney U test, it has not found significant differences between doses of both sodium butyrate and butein ($p > 0.05$) Both 1 mM and 5 mM concentration of sodium butyrate has increased in expression of BACE1₅₀₁ compared to control group. While 1mM sodium butyrate has decreased in expression of BACE1₄₅₇ and BACE1₄₃₂, 5 Mm sodium butyrate has increased in BACE1₄₅₇ and BACE1₄₃₂. Both 2 μ M and 10 μ M butein has increased in expression of BACE1₅₀₁ compared to control group. Whereas 2 μ M butein has increased in expression of BACE1₄₅₇ a little bit, 10 μ M butein has tripled expression of BACE1₄₃₂. While 2 μ M butein has no change on BACE1₄₃₂, 10 μ M butein has approximately doubled expression of BACE1₄₃₂.

As a result, it has been determined that HDAC inhibitors which we used selectively didn't cause effect which we estimated as significant changes in expression level on BACE1 isoforms.

Key Words: Alzheimer's Disease, BACE1 enzyme, Butein, Sodium Butyrate

1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH) genellikle 65 yaş üstü insanlarda kişisel ve davranış bozukluklarının yanı sıra hafıza kaybı ve konuşma bozuklukları gibi zihinsel ve bilişsel kusurların görüldüğü beyindeki nöron hücre harabiyetinden kaynaklanan nörodejeneratif bir hastalıktır¹.

Alzheimer Hastalığı ile ilgili olarak farklı ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmaların ortaya çıkardığı önemli sonuçlarından birisi, artan yaşlı nüfus oranına paralel olarak Alzheimer hasta sayısının dikkate değer şekilde artış göstermesidir. Hastaların yaşamını ve yaşam kalitesini önemli derecede etkileyen Alzheimer hastalığının, hem hastalara yüklediği maddi-manevi yük hem de ülke ekonomisine verdiği zarar ihmal edilemeyecek kadar büyüktür². Diğer kompleks hastalıklarda olduğu gibi, günümüz toplumunda en korkulan ve giderek yaygınlaşan Alzheimer hastalığının tedavisi tam olarak mümkün değildir ve tedavi konusundaki yeni yaklaşımlar ile bu konuda uzun süredir çalışmalar yapılmaktadır³.

Alzheimer hastalığının patofizyolojisi oldukça komplekstir⁴. Alzheimer hastalığındaki en önemli değişiklik, amiloid plakların oluşumudur. Bu oluşumun ana bileşeni, β -amiloid proteindir. Bu protein 40-42 aminoasitten oluşan bir protein olup, daha büyük bir protein olan amiloid prekürsör proteininden (APP) proteolitik kesim sonucu oluşur. APP bir dizi proteoliz olayı ile kesilir ve bu kesimde; α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri rol oynar. α -sekretaz ve γ -sekretazın ardışık kesimi ile amiloid β ($A\beta$) oluşmazken, β -sekretaz ve γ -sekretazın APP'yi ardışık kesimi ile $A\beta$ oluşur⁵. 2000'li yıllarda Beta-bölgesi Amiloid Prekürsör Proteini Kesen Enzimi 1 (BACE1) olarak adlandırılan yeni bir aspartik asit proteazının β -sekretaz olduğu ve BACE1 enziminin β -sekretaza ait tüm özellikleri taşıdığı belirlenmiştir^{6,7}. BACE1 ekspresyon paterni, hücre ve dokulardaki β -sekretaz aktivitesininki ile oldukça uyumludur. BACE1 enzimi, aspartat proteaz ailesindedir ve 501 aminoasitten oluşur. BACE1 mRNA'sının düzeyi beyinde ve karaciğerde oldukça yüksektir ve diğer birçok dokuda ise oldukça düşüktür⁷. Pankreasta BACE1 mRNA'sının yüksek ekspresyonu ve düşük β -sekretaz aktivitesinin şaşırtıcı olduğu düşünülmüştür. Ancak, daha sonraki çalışmalarda, pankreastaki BACE1 mRNA transkriptinin 3. ekzonun büyük

çoğunluğunu kaybeden bir kırılma varyantından oluştuğu bildirilmiştir. Bu kırılma varyantı β -sekretaz aktivitesinden yoksun bir BACE1 izoformunu kodlar⁸.

Alternatif kırılma olayı proteomik çeşitliliği artırmada bir mekanizma sunar. Alternatif kırılmanın BACE1 aktivitesinin üzerinde etkisi önemlidir, Çünkü Alzheimer hastalarının beyinlerinde, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında artan BACE1 protein düzeyi ve aktivitesi gösterilmiştir. Böylece BACE1 kırılmasındaki varyasyonların, insan beyin dokusunda koruyucu etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir⁹. BACE1'in normal kırılması tam uzunlukta (501 aminoasit) aktif proteinin (BACE1₅₀₁) üretimi ile sonuçlanır. BACE1'in alternatif kırılması 3. Ekzon içindeki alternatif 5' kırılma bölgesinin ve/veya 4. ekzon içindeki alternatif 3' kırılma bölgesinin kullanımı ile meydana gelir. Bu alternatif ve normal kırılma bölgelerinin çeşitli kombinasyonları ile 476, 457 ve 432 aminoasit uzunluklarında kırılma varyantları oluşur¹⁰. Ayrıca BACE1'in, 4. Ekzonu içermeyen 455 aminoasit uzunluğunda ve 127 aminoasit uzunluğunda iki kırılma varyantı daha mevcuttur¹¹. Tüm bu 5 BACE1 izoformu, değişen düzeylerde de olsa beyin dokusunda bulunduğu belirlenmiştir¹⁰.

Histon Deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ifadesini değiştirebilmekte, ayrıca transkripsiyon faktörleri ve tümör baskılayıcı proteinler gibi histon olmayan bazı proteinlerin asetilasyonunu da artırarak ilgili genlerin transkripsiyonunun yapılmasını sağlamaktadır¹². Bazı HDAC inhibitörlerinin alternatif kırılmayı etkilediği belirlenmiştir. HeLa hücre hattına sodyum bütirat ve diğer bazı HDAC inhibitörlerinin muamelesi ile 683 genin alternatif kırılmasının değiştiği belirlenmiştir. Bu genlerin sinyal yolları, transkripsiyon düzenlenmesi, apoptoz gibi süreçlerde rol aldığı bulunmuştur. HDAC inhibisyonunun AH hastalığında rol oynayan diğer bir protein olan Tau'nun hastalık sırasında artan varyantını azalttığı belirlenmiştir¹³. Çalışmamızda kullanılan HDAC inhibitörü olan sodyum bütirat ve bütinin çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir^{14,15}.

Çalışmamızda SH-SY5Y hücre hattında her biri için 2 farklı konsantrasyonda sodyum bütirat ve bütinin muamelesinin BACE1 enziminin 3 ayrı izoformuna olan etkisi Real-Time PCR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular mevcut ve yeni tedavi stratejilerine ile bu alanda yapılacak araştırmalara yol gösterme ve farklı bakış açısı sunma potansiyeli taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Alzheimer Hastalığı

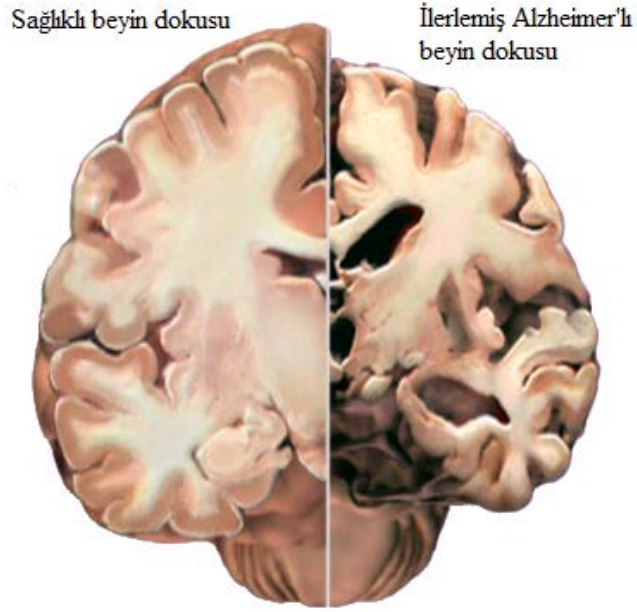
İnsan yaşam standardındaki iyileşmelerin yanı sıra tıp alanındaki teknolojik ilerlemeler ve sağlık hizmetlerinin yaygınlaşmasıyla birlikte doğum ve ölüm hızlarındaki düşüş, ortalama insan ömrünün uzamasına ve insan popülasyonlarında yaşlı nüfus oranının artmasına neden olmuştur. Bu artışın derecesi, ülkenin ve bireyin refah düzeyi ile ilişkili olmakla birlikte, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, önümüzdeki yıllarda gelişmekte olan ülkelerin nüfuslarında %95 oranında bir artış beklenirken, yaşlı nüfus için bu artışın %240 oranında olacağı öngörülmektedir¹⁶. Nüfus bilimciler dünya nüfusu ile ilgili projeksiyonlarında, 2000 yılında 420 milyon olan 65 yaş üstü insan sayısının 2030 yılına kadar yaklaşık 1 milyara ulaşacağını tahmin etmektedirler. Bugün için dünya genelinde 60 yaş üstü insanlarda demans prevalansının %3.9 ile %6.4 arasında değiştiği belirlenmiştir. Örneğin; Kuzey Amerika'da 60 yaş ve üstü insanlarda demans prevalansı %6.4 iken, Batı Avrupa'da %5.4, Latin Amerika'da %4.9, Çin ve batı pasifik bölgelerde ise %4 olduğu bildirilmiştir¹⁷.

Demansın en yaygın formu olan Alzheimer Hastalığının (AH) prevalansı yaşla birlikte artmakta ve 65 yaşından sonra her 5 yılda yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Bugün için gezegenimizde 35.6 milyon Alzheimer hastası bulunmakta olup her yıl 4.6 milyon yeni vakanın buna eklendiği bildirilmiştir¹⁸.

Alzheimer Hastalığı (AH), ilk olarak Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından 1900'lerin başında tanımlanmış¹⁹ ve şu anda tüm demans sendromlarının yaklaşık %75'inden sorumlu olarak nörodejeneratif hastalıklar kategorisinde birinci sırada yer almaktadır²⁰.

Alzheimer Hastalığı, genellikle 65 yaş üstü insanlarda psikiyatrik semptomlar, kişilik ve davranış bozuklukları, hafıza kaybı ve konuşma bozuklukları gibi zihinsel ve bilişsel kusurlara sebep olan ve oluş nedenine göre farklılık gösteren kompleks hastalıklar kategorisinde yer alan multifaktöriyel bir hastalıktır. AH ile ilişkili problemler; sadece ömür uzunluğunu ve yaşam kalitesini düşürmekle kalmaz, aynı zamanda bireyin sosyal ve mesleki yaşamını olumsuz etkileyerek ciddi problemlere yol açmaktadır¹.

AH, geriye dönüşü mümkün olmayan ilerleyici bir hastalık olmakla birlikte hastalığın ilerleme hızı; gen, çevre ve gen-çevre etkileşiminde rolü olan faktörlerin kombinasyonuna göre hastalarda değişkenlik gösterir. AH'nin semptomları zamana bağlı olarak şiddetlense de genel olarak bir Alzheimer hastasının ömür uzunluğu tanı konulduktan sonra 4-8 yıla kadar değişmektedir. AH ile ilişkili beyin dokusundaki değişimler ve bunun mikro düzeydeki yansımaları, aslında hastalığa tanı koymayı gerektirecek makro değişikliklerden çok öncesine uzanmakta olup temelinde nöron hücre kaybına dayanmaktadır²¹. Hastalık başlangıç belirtileri ile tanı konulan süre arasındaki zaman periyodu '*preklinik dönem*' olarak adlandırılmakta ve bu dönem uzun bir süreyi kapsamaktadır. AH'nin preklinik döneminde, kısa ve uzun dönem hafızadan sorumlu olan hipokampus ile serebral korteksi bağlayan entorhinal korteks etkilenir. AH'de genel olarak 3 farklı evre tanımlanmış olup bunlar; hafif, orta ve şiddetli dönem olarak adlandırılır. Hafif ile orta dönem AH'de, hastalar iyi bildikleri isimleri hatırlamada zorluk çekebildiği gibi daha önce gidilen yerleri tanıyamama gibi konumsal hafıza kayıpları ve ruhsal değişimler de gösterirler. Beyindeki hasar derecesi gittikçe artmakta olduğundan, bu hasar bilişsel fonksiyonların merkezi konumundaki üst beyin kabuğunun (serebral korteks) diğer alanlarına da yayılım gösterir. Şiddetli dönem olarak tanımlanan evrede, Alzheimer hastalarında konuşma, anlama, algılama ve bilinci kontrol eden beyin bölgeleri de hasar görmüştür. Bu dönemde hastalar; uzun dönem hafıza bozuklukları, hastalık nöbetleri, kilo kaybı, sevdiği insanları tanıyamama ve günlük işlerini tek başına yapamama gibi birçok semptomu birlikte gösterir. Ayrıca AH progresyonuna bağlı olarak, kolinerjik nöron hücre kayıplarının sayısı gittikçe artmakta olup, beyinin bazı bölgelerinde bu kaybın oranı %75'ten daha fazla olabilmektedir²². (Şekil 1.)

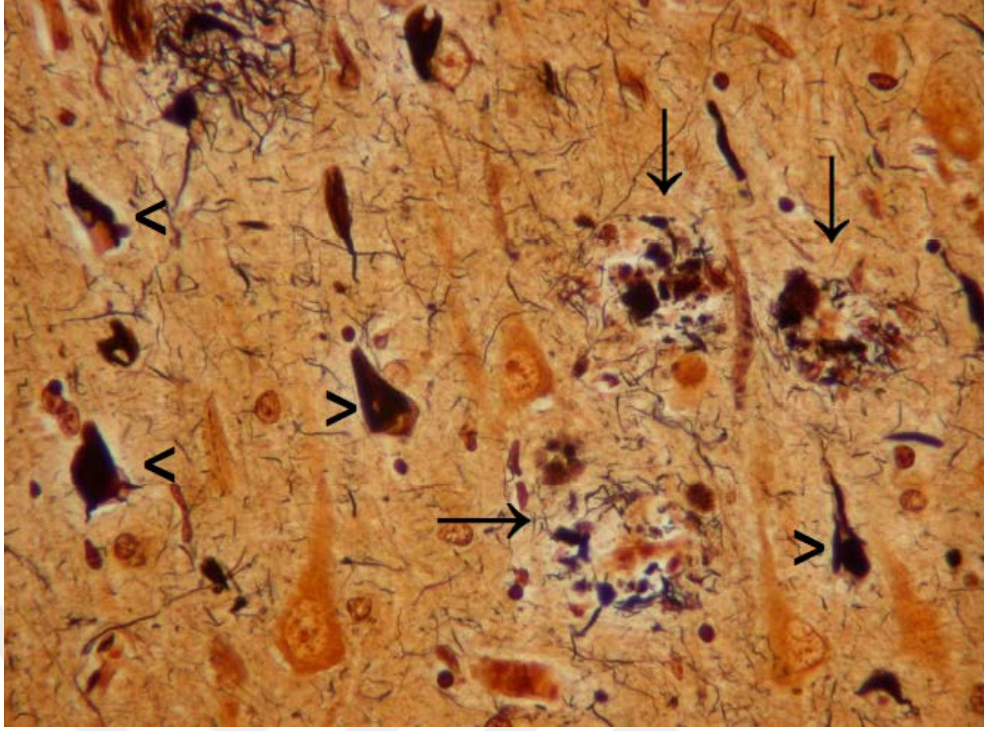


Şekil 1. Sağlıklı beyin dokusu ile AH'li beyin dokusu²³

2.1.1. Ah Patolojisi

Genel olarak Alzheimer Hastalığı, insan genom yapısında yer alan ve hastalıkla ilişkili olan genlerdeki mutasyonlar ile risk oluşturan çevresel faktörlerin ve epigenetik değişimlerin yakın ilişki içinde olduğu poligenik ve multifaktöriyel bir hastalıktır²⁴. Bu nedenlerle AH patofizyolojisi de oldukça kompleksdir. AH'nin patolojisi, hastalığın ortaya çıkmasına neden olan gen kombinasyonu ve bu genlerin çevre ile etkileşimine göre değişkenlik göstermekle birlikte histolojik açıdan beyin dokusunda 3 nöropatolojik özelliğin belirleyici olduğu gösterilmiştir (Şekil 2);

1. Amiloid beta ($A\beta$) peptidinden oluşan ekstraselüler senil plaklar
2. Nörofibrilar yumaklar
3. Sinaptik dejenerasyon²⁵.



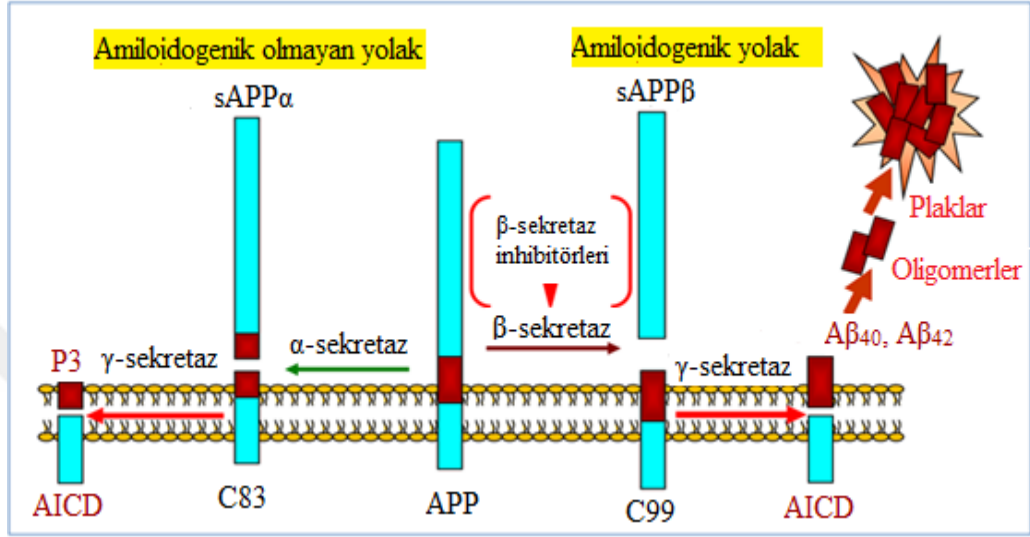
Şekil 2. AH'nin patolojisinde görülen senil plaklar(→) ve nörofibrilar yumaklar (>) ²⁶

2.1.1.1. Amiloid Beta (A β)

AH'deki en önemli değişiklik, amiloid plakların oluşumudur. Bu oluşumun ana bileşeni β -amiloid proteinidir. Bu protein 40-42 aminoasitten oluşan bir protein olup β -sekretaz enziminin proteolitik kesimi sonucunda oluşur. Bu nedenle AH'nin başlaması ve ilerlemesinde A β peptidi çok önemli bir risk faktörüdür²⁵.

Hücre membranı ile ilişkili birçok proteinden biri olan **Amiloid Prekürsör Protein**, (APP) endoplazmik retikulumde (ER) katlanan, modifiye edilen ve Golgi kompleksi aracılığıyla dış membrana gönderilen, tek geçişli bir transmembran proteinidir. Söz konusu protein, hücre yüzeyine ulaşır ulaşmaz endositozla alınır ve lizozomal kompartımana taşınır. APP nöronlarda yüksek derecede eksprese edilirken¹, astrositlerde ve oligodendrositlerde de eksprese edilebilmektedir. APP hücre içinde üretildikçe, membrana gömülü hale gelir. Hızlı ve oldukça kompleks bir şekilde metabolize edilir. APP diğer transmembran proteinlerde olduğu gibi 47 aa'lik hücre içi karboksil ucu, membranı kateden 24 aa'lik bir kısım ve 682 aa'lik hücre dışı amino ucundan oluşmaktadır. AH'nin patolojisinden sorumlu olan A β , APP'nin membranın içindeki 24 aa'lik bölgesinin bir kısmını da içermektedir. Hücre membranının dış zarı gibi hücre kompartımanlarında spesifik enzimler APP'yi farklı fragmentler oluşturacak

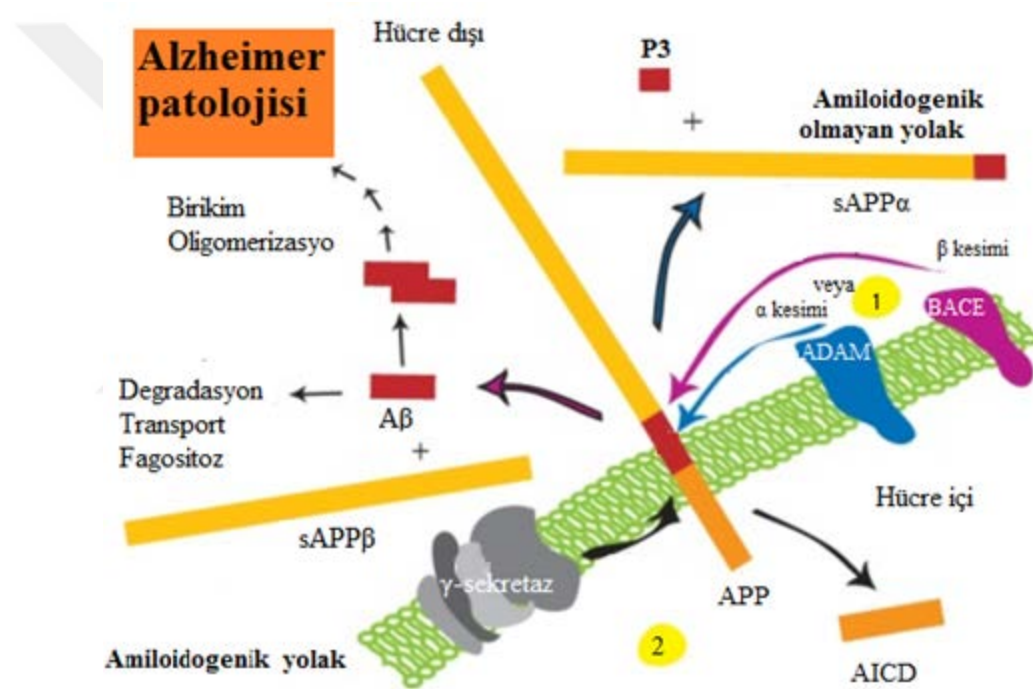
şekilde keser. 1999 ve 2000 yıllarında APP'nin kesiminden sorumlu olan enzimler tanımlanmış olup bu enzimler α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz'dır. APP işlenmesi, rol oynayan enzime ve kesimin meydana geldiği APP segmentine bağlı olarak, hücre için oldukça farklı sonuçları olan 2 yoldan birini takip etmektedir²⁵. (Şekil 3)



Şekil 3. APP'nin 2 farklı yolda kesimi²⁷.

'Amiloidogenik yolak' olarak adlandırılan zararlı yolda; A β peptidinin bir ucundan APP molekülünü, ilk olarak β -sekretaz enzimi keser ve hücreden sAPP β (çözünebilir amiloid prekürsör protein β) salınır. Daha sonra γ -sekretaz, hala membranda tutulu kalan APP fragmentini, A β peptidinin diğer ucundan keser. Her bir uçtaki kesim sonucunda A β peptidleri, nöronun ekstraselüler matrisine salınır ve diğer A β peptidleri ile agregasyon yapmaya başlarlar. Bu küçük, 2, 3, 4 veya bir düzineye kadar A β peptidi 'oligomer' olarak adlandırılır. Spesifik büyüklükteki oligomerler, fonksiyonu etkileyen, komşu hücreler ve sinaps üzerindeki reseptörler ile etkileşime girmekten sorumlu olabilir²⁸. APP'nin kesiminde, γ -sekretazın birden fazla noktadan kesim yapabilme yeteneğinin sonucu olarak, meydana gelen A β 'ler 40 ve 42 aa uzunluğunda olabilir. Çözünebilen A β_{40} peptidleri hem normal hem de AH beyin dokusundaki serebrospinal sıvıda (CSF) belirlenmiştir. Biyokimyasal çalışmalarla A β_{42} olarak adlandırılan 42 aa'lik formun, agregat oluşturmaya daha eğilimli olduğu ve kısa form olan A β_{40} 'ın polimerasyonunu kolaylaştırdığı belirlenmiştir. AH'li hastaların beyin dokularında ve beyin-omurilik sıvısında yüksek miktarda A β_{42} oligomerleri

görülmektedir²⁹. Bazı oligomerlerin beyinden temizlenmesi muhtemeldir. Temizlenemeyen kümeler, daha fazla A β peptidi ile biraraya gelir. Süreç devam ettikçe, oligomerler daha da genişler ve protofibril veya fibril olarak adlandırılan birimler haline gelir²⁵. A β peptidlerinin agregat oluşturmaya yatkın doğası, sayısız proteinin yapıya katılmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda senil plaklar oluşturmaktadır. Dolayısıyla, A β 'nin anormal birikimi; A β üretimi, A β 'nin agregasyonu ve temizlenmesi arasındaki dengenin kaybolması sonucunda oluşur. A β 'nin aşırı üretimi, salgılanan A β 'nin yıkımındaki azalma ve agregat oluşturan ek faktörlerin dahil olması nörodejenerasyona sebep olabilir³⁰ (Şekil 4).



Şekil 4. AH'de A β patolojisi³¹

'Amiloidogenik olmayan yolak' olarak adlandırılan alternatif bir yolakta, α -sekretaz enzimi görev yapar. Bu enzim APP molekülünü, A β peptidi oluşturma potansiyeline sahip kısmın içinden keser. Bu nedenle A β peptidinin üretimini ve plak oluşum potansiyelini elimine eder. Bu kesimle birlikte, nörondan nöronal büyüme ve hayatta kalma gibi yararlı özelliklere sahip sAPP α (çözünebilir amiloid prekürsor protein α) olarak adlandırılan bir fragment salgılanır. Hala nöron membranında tutulu kalan APP fragmenti, daha sonra A β segmentinin sonundan γ -sekretaz tarafından kesilir. Sonuçta oluşan fragmentlerden P3 olarak adlandırılan daha küçük olanı,

nöronun ekstraselüler matriksine bırakılırken, AICD (Amiloid prekürsör protein hücre içi domaini) olarak adlandırılan daha büyük olanı ise nöron hücre gövdesinde kalır ve nükleusdaki faktörler ile etkileşime girerek bazı genlerin ekspresyonlarını indükler³².

APP'nin kesimi sırasında β -sekretaz enzimi ve α -sekretaz enzimi arasında bir yarışma söz konusudur. AH'li bireylerde α -sekretaz'ın görev yaptığı amiloidogenik olmayan yolak baskılanırken, APP'nin daha çok β -sekretaz enziminin görev yaptığı amiloidogenik yolak aracılığıyla kesildiği belirlenmiştir³³. α -sekretaz ve β -sekretaz enzimleri arasındaki yarışma henüz tamamen anlaşılammış olmakla birlikte iki enzimin kesim yaptığı hücresel kompartımanların farklı olduğu gösterilmiştir. α -sekretazın rol oynadığı kesim plazma membranında ve trans-Golgi ağında meydana gelirken, β -sekretazın kesimi temelde endozomlarda ve az miktarda trans-Golgi ağında meydana gelmektedir. α -sekretaz ve β -sekretaz enzimleri arasındaki yarışma β -sekretazın aşırı düzeyde eksprese olduğu durumlarda gösterilmiştir. Aşırı düzeyde eksprese olan β -sekretaz APP'yi, APP plazma membranına ve dolayısıyla α -sekretaza ulaşmadan önce sekresyon yolağının ilk kompartımanlarında kestiği için, β -sekretaz ile kesim artarken, α -sekretaz kesimi azalmıştır. Bu iki enzimin yarışması konusu aydınlatılmamış olsa da α -sekretazın β -sekretaz ile yarışarak A β üretimini azaltacağı ve böylece α -sekretazın farmakolojik olarak aktivasyonunun AH için terapötik bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir³⁴.

2.1.1.2. Nörofibrilar Yumaklar

Dr. Alzheimer tarafından tanımlanan, AH'nin ikinci nedeni; nörofibrilar yumakların oluşumudur^{18,35}. Bu yumaklar, sinir hücrelerinin içinde bulunan kıvrılmış proteinlerin anormal şekilde birikimi sonucu oluşur. Yumakların temel bileşiminde '*tau*' olarak adlandırılan proteinler bulunur. Tau, sağlıklı nöronlarda iç yapıyı destekleyen, akson boyunca besin maddelerinin ve transmitter maddelerin geçişini kolaylaştırıcı yapılar olan mikrotübüllere bağlanarak onları stabilize eder. Tau proteinine belirli bir sayıda fosfat molekülü bağlıdır. AH'de hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteinine bağlanan fosfat sayısında anormal bir artış gerçekleşmesine sebep olur. Hiperfosforile olmuş olan tau, mikrotübüllerden ayrılır ve diğer tau proteinleri ile bir araya gelmeye başlar. Nöron içinde yumaklar şeklinde birikim meydana gelir. Mikrotübüllerin yapısında bozulmalar başlar ve nöronların

içindeki transport ağı zarara uğrar. Bu zarar da nöronların birbirleriyle etkileşebilme yeteneğini bozmaktadır³⁶.

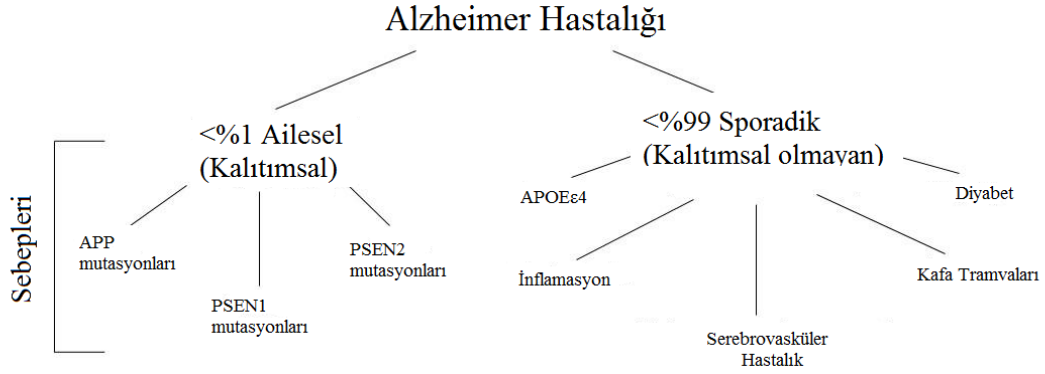
Nörofibrilar yumakların, A β birikimi sonucunda meydana geldiğini destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Tau ve A β arasında gerçekleşen moleküler mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen, AH'de A β 'nin birikiminin proteozomun normal fonksiyonunu bozarak inhibe ettiği ve bu nedenle tau proteininin proteozomlar tarafından degrade edilemediği ve böylece nörofibrilar yumak oluşumun gerçekleştiği belirlenmiştir. Normal şartlar altında ise ubikütilenmiş tau proteini proteozomlar tarafından yıkılmaktadır³⁷.

2.1.1.3. Sinaptik Dejenerasyon

AH'nin nedenlerinden üçüncüsü olan sinaptik dejenerasyon, hücreler arasındaki bağlantının kaybıdır. Nöronlar birbirleri ile etkileşimini sinapslar aracılığıyla gerçekleştirir. Böylece sinapslarda meydana gelen dejenerasyon, hücre fonksiyonunun azalmasına ve hücre ölümüne sebep olur²⁵. Sinaptik dejenerasyon AH'nin ilerlemesinde ilk aşamalarda meydana gelir. Sinaptik hasar, glutamat reseptörlerinin fonksiyonunun bozulması ile başlayan çok aşamalı bir süreçtir. AH'de sinaptik kaybın mekanizmasında, aksonal taşınma bozuklukları, oksidatif stres, mitokondriyal hasar ve nöroinflamasyon rol oynayabilir³⁸. AH'de görülen sinaptik kayıp ve nöronal hücre ölümüne sebep olan başlatıcı patojenik olay hakkında bilim insanları arasında fikir birliği olmamasına rağmen, sinir uçlarında A β oligomerlerinin anormal birikiminin sinaptik hasara ve nihayetinde AH'deki nörodejenerasyona sebep olabildiğine dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Böylece artan A β 'nin AH'de sinaptik hasarın patogenezinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir.³⁰

2.1.2. AH'nin Genetiği

Alzheimer Hastalığı; etiyolojik, patolojik, genetik ve biyokimyasal görünümüne göre iki ana forma ayrılabilir³⁹; (Şekil 5)



Şekil 5. AH'nin Genetik Sebepleri²⁶

2.1.2.1. Ailesel AH (Erken başlangıçlı/ FAH)

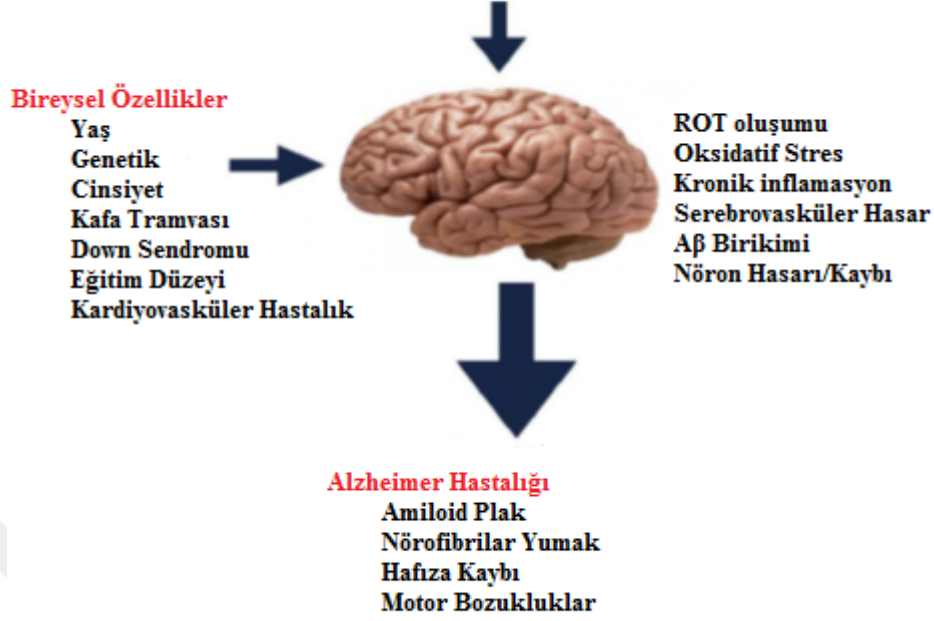
Tüm AH vakalarının yaklaşık %1'i otozomal dominant olarak Mendelyen kalıtılan ailesel form gösterir. AH'nin ailesel formu 65 yaşından önce başlar. 21. Kromozomda bulunan APP geni, γ -sekretaz enziminin alt birimlerini kodlayan ve 14. Kromozomda bulunan Presenilin 1 (PSEN1) ve 1. Kromozomda bulunan Presenilin 2 (PSEN2) genlerinin içindeki mutasyonlar ailesel tip Alzheimer hastalığının ortaya çıkması ile sonuçlanır³⁸. Yapılan çalışmalar, ailesel tip AH vakalarının büyük çoğunluğunu PSEN1 genindeki mutasyonların oluşturduğunu, küçük bir kısmının ise APP genindeki mutasyonlardan kaynaklandığını ortaya koymaktadır⁴⁰. Bu mutasyonlar, diğer Mendelyen kalıtılan özellik ve genlerde olduğu gibi yüksek penetransa sahiptir ve otozomal dominant kalıtılır. Bu mutasyonlar ayrıca $A\beta_{42}$ peptidi düzeyinin artmasına sebep olarak hastalığın başlama yaşının düşürürler. APP mutasyonlarının sebep olduğu vakalar, tüm AH vakalarının %1'inden daha azında görülmektedir. Tanımlanan tüm APP missense mutasyonları, APP'nin $A\beta$ 'yi kodlayan ekzonlarının yakınında meydana geldikleri için APP'nin proteolitik işlenmesini ve $A\beta$ agregasyonunu etkilerler⁴¹ (Şekil 6).

γ -sekretaz enziminin katalitik aktivitesi için gerekli olan PSEN1 ve PSEN2 homolog proteinlerdir ve bu proteinlerin protein trafiğinde ve Notch sinyal yolağında rol oynadıkları belirlenmiştir⁴³. Yabanıl tip PSEN1 ve PSEN2'nin çekirdek zarında yer alması, interfaz kinetokor ve sentrozomları ile ilişkisi bu iki proteinin kromozom organizasyonu ve ayırımındaki görevine işaret etmiştir. AH'nin patojenik mekanizması tartışıldığında, mutant presenilinlerin mitoz sürecinde kromozomların yanlış ayırımına neden olduğu ve bunun apoptozis ya da trizomi mozaizmi ile sonuçlandığını göstermiştir. Alternatif bir hipoteze göre mutant presenilinlerin ER'den çıkış trafiği normal şekilde işlemez, bu durum da APP'nin normal işleme sürecine engel olur⁴⁴. Bugüne kadar FAH'a sebep olan 401 ailede 182 farklı AH ile ilişkili PSEN1 mutasyonu belirlenirken, 23 ailede 14 PSEN2 mutasyonu belirlenmiştir. PSEN mutasyonlarının büyük çoğunluğu tek nükleotid değişimleridir. Ayrıca bu genlerde delesyon ve insersiyonlar da tanımlanmıştır. PSEN mutasyonları APP'nin γ -sekretaz aracılı proteolitik kesimini değiştirir ve böylece $A\beta_{42}$ oranı artarken, $A\beta_{40}$ oranı azalmaktadır. APP'den 3 kopya taşınmasına sebep olan Down Sendrom'lu hastalar (Trizomi 21), erken yaşlarda (<65) AH'ye yakalanırlar³². Bu 3 gendeki mutasyonlar nadir olarak görülmelerine rağmen, $A\beta$ 'nin AH'nin patogeneğinde oynadığı önemli rolü desteklemektedir⁴⁵.

2.1.2.2. Sporadik AH (Geç-başlayan/SAH)

Alzheimer hastalığının en yaygın formu, sporadik tip olarak adlandırılan formdur. Bu formun etiolojisinde genler, çevre ve yaşam tarzının bileşimi ile ortaya çıkan multifaktöriyel bir yapı söz konudur. Çevresel faktörler ve genlerin etkileşimi, AH'nin başlama yaşını ve ilerleme sürecini etkilemektedir. Sporadik AH için en büyük risk faktörü; yaşlanmadır. Birçok sporadik AH, 65 yaşından sonra başlar. Araştırmacılar, sporadik AH'ye yakalanma olasılığını artıran birçok gen belirlemişlerdir. Bu risk oluşturan genlerin mutant formları direkt olarak AH'ye sebep olmaz, ancak bu genleri taşıyan bireyler AH'ye daha duyarlı hale gelir⁴⁶. Ayrıca AH'ye yakalanma riskini artıran serebrovasküler hastalık, tip II diyabet, sigara kullanımı ve travmatik beyin yaralanmaları gibi birçok faktör de bulunmaktadır¹⁸. (Şekil 7) ,

Yaşa Bağımlı Nörodejenerasyon



Şekil 7. AH riskini artıran faktörler⁴⁴

2.1.2.2.1. AH Riskini Artıran Faktörler

Genom ölçekli yapılan popülasyon çalışmalarında, 19. Kromozomda bulunan Apolipoprotein E2'nin $\epsilon 4$ (APOE $\epsilon 4$) allelinin, sporadik tip AH vakalarında ortaya konmuş güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir ve APOE $\epsilon 4$ beyindeki A β agregasyonunu artırmakta ve A β 'nin yıkımını bozmaktadır. Bu alleli taşıyan bireyler, oldukça yaygın bulunan $\epsilon 3$ allelini taşıyan bireyler ile karşılaştırıldığında, Alzheimer hastalığı bakımından artan risk altındadır. APOE $\epsilon 2$ alleli taşıyan bireylerde ise bu risk en düşüktür^{47,48}. APOE $\epsilon 4$ allelini homozigot olarak taşıyan bireylerde AH riskini yüksektir ve başlama yaşı düşüktür. AH vakalarının yaklaşık olarak %15-20'si APOE $\epsilon 4$ varlığı ile oluşmaktadır. Birçok popülasyonda, bireylerin %50-90'ının APOE $\epsilon 3$ allelini, %5-35'inin APOE $\epsilon 4$ allelini ve %1-5'inin ise APOE $\epsilon 2$ allelini taşıdığı belirlenmiştir⁴⁹. ApoE'nin temel görevi, sinir sisteminde kolesterol taşınmasını gerçekleştirmektir, ayrıca A β katabolizması için önemlidir. APOE'nin hem mikroglial hücrelerinde hem de astrositlerde A β degradasyonunda rol oynar¹. Şu ana kadar yapılan 11 tane genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile ApoE geni dışında CLU (clusterin),

ABCA7 (ATP-Bağlayan Kaset Taşıyıcısı A7), CR1 (Komplement Reseptör 1) gibi AH riskini artıran birçok gen belirlenmiştir⁵⁰ (Çizelge 1).

Çizelge 1. AH'ye yakalanma riskini artıran bazı genler ve kodladıkları proteinlerin görevleri⁵¹

	Gen Adı	Proteinin Fonksiyonu
1	Apolipoprotein E (APOE)	Lipoprotein, yağda çözünen vitaminlerin ve kolesterolün taşınması
2	Clusterin (CLU)	Şaperon protein
3	ATP-Bağlayan Kaset Taşıyıcısı A7 (ABCA7)	Lipid homeostazisi ve immün sistemdeki hücrelerin farklılaşması
4	Komplement Reseptör 1 (CR1)	A β peptidine bağlanan ve innat bağışıklık sistemin ana bileşeni olan C3b ve C4b kompleman kesim fragmentlerinin reseptörü,
5	Fosfatidilinozitol bağlayan klatrin birleştirme proteini (PICALM)	Sinaptik veziküllerin membran içerisine alınması, lipid ve proteinlerin hücre içi hareketi, tam uzunlukta APP'nin hücre yüzeyinden içeri alınması
6	Myc box bağımlı etkileşim proteini 1 (BIN1)	Tümör baskılayıcı
7	Sortilin ilişkili reseptör 1 (SORL1)	ApoE reseptörü, APP'nin hücre içi trafiğinde ve işlenmesi
8	Efrin tip A reseptör 1 (EPHA1)	Sinir sisteminin gelişimi

Ancak bu genlerin hastalığa katkısı düşüktür. Geniş veri setleri ile yapılan genom ve ekzom çalışmaları ile risk genlerinin sayısının artacağı düşünülmektedir. AH riskini artıran, yeni yaygın ve nadir allellerin belirlenmesi, AH'nin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasını sağlayacaktır⁵⁰.

Serebrovasküler hastalık sıklıkla AH ile birlikte görülmektedir. Birkaç epidemiyolojik çalışmada vasküler risk faktörleri kontrol altına alındığında AH prevalansının azaldığı gösterilmiştir ve AH riskinin kan damarlarına zarar veren birçok durumda arttığı görülmüştür. Çünkü AH ve vasküler hastalıklar yüksek tansiyon, diyabet ve kolesterol gibi risk faktörlerini paylaşırlar. Bazı çalışmalarda ise serebrovasküler hastalıkların tau ve A β patolojisini etkilediği belirlenmesine rağmen, serebrovasküler hastalıklar ile AH'yi bağlayan moleküler mekanizma tamamen anlaşılammıştır⁵².

Uzun dönem çalışmalarda sadece vasküler demans değil aynı zamanda nerödejeneratif tip demans riskinin diyabetle birlikte arttığı gösterilmiştir. Yüksek glikoz düzeyi, tek başına bilişsel bozukluklar ve AH için risk faktörüdür. Tip II diyabetin varlığı AH riskini yaklaşık olarak 2 kat artırmaktadır. Diyabet hastalığı beyinde direkt olarak A β birikimini etkiler, çünkü tip II diyabet ile birlikte seyreden hiperinsülinemide insülin, İnsülin Degrade Eden Enzimin (İDE) substratı olarak A β ile yarışarak A β yıkımını bozmaktadır⁵³. Ayrıca bozulmuş glikoz toleransı da yaşlı insanlarda artan AH riski ile bağlantılıdır. Kontrol edilemeyen hiperglisemi ve hiperinsülineminin, beyinde nörodejeneratif değişimler üzerinde direkt etkiye sahip olduğu ve bu nedenle hiperinsülinemi ve diyabet AH riskinin arttığı gösterilmiştir⁵⁴.

Orta yaşlarda kontrol edilemeyen yüksek kan basıncının birçok gözlemsel çalışmada AH riskini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca AH ve demans için antihipertensif ilaçların kullanımı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiş olup, antihipertensif tedavinin AH ve demans üzerindeki etkisinin, tedavi süresine ve tedavinin verildiği hastanın yaşına bağlı olarak değişebileceği de saptanmıştır. Tedavinin etkisinin 75 yaş altı hastalarda yüksek olduğu görülmüştür. Antihipertensif tedavinin, serebrovasküler lezyonların sayısını azaltmasının yanı sıra serebral perfüzyonu iyileştirerek ve atherosklerotik süreci geciktirerek de AH ve demasa karşı koruyucu olabilmektedir. Tedavi edilmiş hipertansiyon grubunda hipertansiyonu olmayan hastalardan daha düşük düzeyde AH ile ilişkili nöropatolojik değişimler bulunmuştur⁵⁵.

Vaka kontrol çalışmaları, başlangıçta sigara kullanımının AH riskini düşürdüğünü gösterse de daha sonraki yapılan prospektif çalışmalarda sigara kullanımının AH'de bir risk artışına sebep olduğu belirlenmiştir. Sigara kullanımının oksidatif stresi artırarak AH'de risk artışına sebep olduğu ileri sürülmektedir⁵⁶.

Hipotiroidinin de AH riskini artırdığı bildirilmiştir. AH bireylerin hipokampüsünde Tiroid uyarıcı hormonu serbestleştiren hormon (TRH) konsantrasyonunda azalma saptanmış, TRH'nin hipokampüste proteinlerin fosforilasyonunu düzenlediği ve böylelikle AH patogenezinde yer alabileceği öne sürülmüştür⁴⁴.

Kafa tramvası öyküsü bulunan bireyler özellikle APOE ϵ 4 alleli taşıyanlar AH bakımından yüksek risk altındadır⁵⁵. Bir meta analiz AH riskinin tramvatik beyin yaralanması geçiren erkeklerde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Post-mortem ve deneysel çalışmalar, beyin yaralanmasından sonra hem A β birikiminin hem de tau

patolojisinin arttığını göstermiştir. Ayrıca CSF’de A β düzeyi yükselmiştir ve APP aşırı üretilmektedir⁵⁷.

Orta yaşta aşırı alkol alımının özellikle APOe4 alleli taşıyıcıları arasında yaşamın geç evrelerinde demans ve AH riskini 3 kat artırdığı bulunmuştur. Düşük dozda alkol alımının demans ve AH’nin insidansını azalttığı bildirilmiştir ve düşük dozda alkol alımının demansa karşı koruyabileceği ileri sürülmüştür. Ancak düşük dozda alkol alımının demanstaki rolü ile ilgili çalışmalar tartışmalıdır. Çünkü ikisi arasındaki ilişki, yaşam tarzından, sosyoekonomik durumdan ve alkol tüketiminin değerlendirme ölçütlerinden etkilenebilir. Alkolün lipid, lipoprotein düzeyi, inflamasyon ve hemostatik faktörler gibi kardiyovasküler sistem üzerinde yararlı etkiye sahip olabilir. Düşük dozda alkol kullanımı, kardiyovasküler hastalık riskini azaltabilir ve böylece daha az beyin hasarı ortaya çıkabilir. Aşırı alkol tüketiminin ise artan beyin atrofisi ve daha küçük beyin hacmi ile ilişkili olarak beyinde zararlı etkiye sebep olmaktadır⁵⁴.

2.1.2.2.2. AH Riskini Azaltan Faktörler

Eğitim ve sosyoekonomik durum ile AH ve demans arasında oldukça yakın bir ilişki vardır. Eğitim düzeyi arttıkça nöronal ve bilişsel rezervin iyileştirilebildiği ve böylece demans ile ilgili sendromların başlamasının geciktiği gösterilmiştir. Ayrıca, düşük eğitim düzeyinin AH açısından riski arttırdığını gösteren birçok çalışma da bulunmaktadır^{58,59}.

Düzenli fiziksel egzersizin de bilişsel açıdan sağlıklı hastalarda demans ve AH’nin başlama yaşını geciktirebileceği bildirilmiştir. Ayrıca yürüme gibi hafif fiziksel aktiviteler de demans riskini azaltabildiği bildirilmiştir⁶⁰. APOE ϵ 4 allelini taşıyan hastalarda, orta yaşlarda yapılan düzenli fiziksel aktivitenin demans ve AH gelişimine karşı güçlü bir koruyucu etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir. Fiziksel aktivitenin genel ve vasküler sağlığı iyileştirmesinin yanı sıra, beyin plastisitesini de bilişsel fonksiyonların sürdürülebilmesi ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu ve nörotrofik faktörleri etkileyerek iyileştirir⁶¹.

Ayrıca ileri yaşlarda bilişsel fonksiyonların sürdürülmesinde yararlı olduğu ileri sürülen antioksidan ve vitaminleri içeren birçok besin bulunmaktadır. Bu maddeleri içeren besinler, meyve, sebze ve güçlü antioksidan bir bileşik olan resveratolü içeren kırmızı şarap gibi içeceklerdir. Bu besinlerin ayrıca kardiyovasküler hastalıklardan

(CVD) korunmaya yardımcı olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Düşük kolesterol içeriğine sahip ve vitamin, antioksidan, anti-inflamatuvar moleküller, omega-3 yağ asitleri ve mineralleri içeren besinleri tüketmenin AH'nin önlenmesinde yararlı olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca tüketilen yağ içeriği ve kalitesi de önemlidir. Yağ asitlerinin PSEN1 üretimini başlatabileceği ve donmuş yağ asitlerinin de tau oluşumu tetikleyebileceğini gösteren çalışmaların yanı sıra, sinir ve dolaşım sistemindeki önemli yollarda görevli enzimlerin kofaktörü olan B12 gibi bazı vitaminlerin eksikliğinin de AH'ye yakalanma riskini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır²⁶.

Aile geçmişi, eğitim düzeyi, yüksek yağ içeren besinler tüketme, hipertansiyon, diyabet, kafa tramva geçmişi ve belirli genlerin etkisi AH için risk faktörü iken, yaşam tarzının ve beslenmenin değiştirilmesi gibi koruyucu tavsiyelerin ise AH'nin başlangıcını geciktirdiği ileri sürülmektedir. Bu faktörler hastalığın temel nedeni değildir, ancak AH'nin ilerlemesinde önemli etkileri olduğu düşünülmektedir²⁶.

2.1.3. AH ile İlgili Hipotezler

Alzheimer Hastalığının kompleksliği nedeniyle AH'nin etiyojisi ve patogenezi ile ilgili birçok hipotez ortaya konmuştur;

2.1.3.1. Kolinerjik Hipotez

AH ile ilişkili ilk ortaya atılan hipotez kolinerjik fonksiyon bozukluğudur. AH'li hastaların beyin dokusunda yapılan biyokimyasal araştırmalarda, normal bireyler ile karşılaştırıldığında serebral kortekste ve diğer beyin bölgelerinde kolin asetilkolin sentezinin ve asetilkolin salınımının azaldığı gösterilmiştir. AH'de hem asetilkolini sentezleyen enzim asetiltransferaz, hem de asetilkolini hidroliz eden enzim, asetilkolin esteraz aktivitesi azalmıştır. Bu bulgular, serebral kortekste ve diğer beyin bölgelerinde kolinerjik nöronların kaybı ve kolinerjik nörotransmisyon kaybının, önemli ölçüde AH'deki bilişsel fonksiyonların bozulmasına sebep olduğunu belirlemiştir⁶². AH'de asetilkolin esteraz aktivitesi azalmış olmasına rağmen, kolinerjik nörotransmisyonun iyileştirilmesi için Alzheimer hastalarında kullanılan mevcut ilaçların büyük çoğunluğu asetilkolin esteraz inhibitörleridir. Asetilkolin esteraz inhibitörleri bir nörotransmitter olan asetilkolinin yıkımını inhibe ederek kolinerjik fonksiyonu güçlendirirler. Kolinerjik

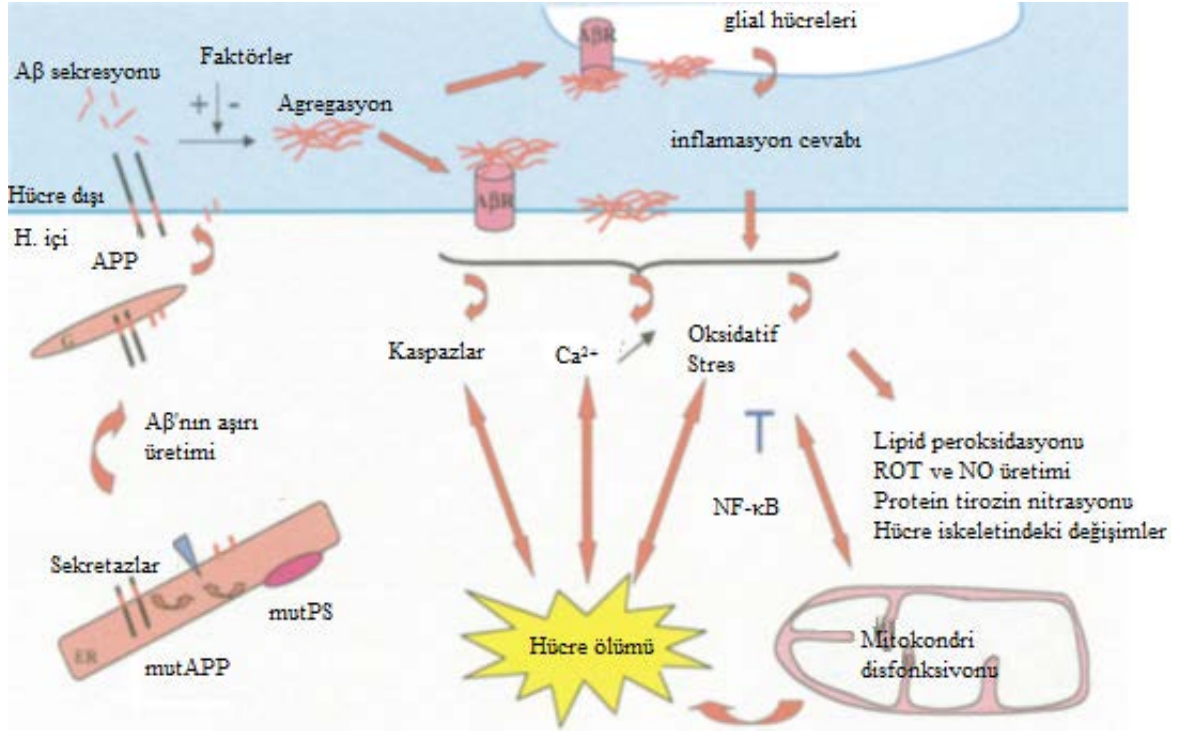
hipotez AH'nin semptomatik tedavisinde yarar sağlayan ilaçların geliştirilmesi için önemli bir yaklařımdır⁶³.

2.1.3.2. Amiloid Kaskat Hipotezi

Bilimsel çalışmalarda ve ilaç endüstrisinde yapılan araştırmalarda en etkili olan yaklaşım 'Amiloid Kaskat Hipotezi'dir ve bu hipotez beyinde A β birikiminin, sinirsel yaralanmalar ve nörofibrilar yumakların oluşumu gibi AH'ye sebep olan olaylar zincirini başlattığı varsayımına dayanır. Amiloid Kaskat Hipotezi'ne göre, A β 'nın konformasyonel değişimleri ve fibrilar agregasyon, hücrelerle etkileşime giren ve nöronal lme sebep olabilen hücre dışı birikimlere sebep olur. Bu hipotez primer kültür ve nöronal hücre hatlarının kullanıldığı birçok çalışma ile dođrulanmıřtır⁶⁴. Bu hipotez doğrultusunda Alzheimer hastalarında A β birikimini azaltmaya yönelik mevcut olarak kullanılan hiçbir ilaç bulunmamaktadır. Ancak bu yaklaşım ile ilgili birçok ilaç olma potansiyeline sahip molekül deneme aşamasındadır ve yeni ilaç arama çalışmaları da devam etmektedir⁶⁵.

2.1.3.2.1. A β 'nın Dahil Olduğu Diğer Yolaklar

A β 'nın nöronal hücre ölümünü indüklediği birçok yolak vardır ve hücre içi kalsiyum birikimi, nitrik oksit (NO) ve peroksit üretimi, membran lipid peroksidasyonu, azalan membran akışkanlığı ve hücre iskeletindeki değişim gibi birçok benzeri mekanizmayı esas alan görüşler ileri sürülmüştür.⁶⁶ (şekil 8);



Şekil 8. Aβ'nin hücre içinde etkilediği yollar⁶⁶

Aβ protofibrilleri, nöronun yakınındaki glial hücrelerden glutamat gibi uyarılmış aminoasitlerin aşırı salınımını tetiklemektedir. N-metil-D aspartatın, glutamat reseptörlerini aşırı aktive etmesi, hücre içinde Ca²⁺ artışı ile sonuçlanır. Böylece nöronal nitrik asit sentaz aktive olur ve sonuçta NO üretilir⁶⁷. Nöronal hücre hatlarında, Aβ toksisitesinin Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve NO üretimini indüklediği gösterilmiştir. NO aşırı üretildiğinde, süperoksit anyonu ile birleşir ve aşırı derecede reaktif ve nörotoksik bir ürün olan peroksinitrit meydana gelir. Bu toksik bileşenlerin üretimine, Glutasyon peroksidaz (GSH) azalması, indüklenebilen NO sentazın (iNOS) aktivasyonu, mitokondriyal peroksiniritin birikimi, tirozin nitrosasyonu ve membran lipid peroksidasyonu eşlik etmektedir. Sonuç olarak mitokondriyal hasarın bir parçası olarak daha ileri oksidatif ve nitrosatif hasara sebep olur⁶⁶.

Protofibrillerin ve agregatların aksonal ve dendritik taşınmayı bozarak nöronlarda zararlı etkiye sahip olduğu da belirlenmiştir. APP ve PSEN, kinezin I'e bağlanabilir ve veziküler trafiği düzenleyebilir. PSEN mutantları, kinezin aracılı ileriye dönük aksonal taşınmayı bozan glikojen sentaz kinaz-3B aktivitesini artırır ve ayrıca biriken Aβ'lar fiziksel transportu engelleyebilir⁶⁷.

Beyin dokusu, diğer organlar ile karşılaştırıldığında, yüksek oksijen tüketim hızı, bol lipid içeriği ve görece antioksidan enzimlerindeki yetersizlik nedeniyle oksidatif strese oldukça hassastır. Nöronlarda oksidasyon, inflamatuvar sitokinlerin upregülasyonu ve tamir edilemeyen DNA hasarları gibi birçok farklı probleme sebep olabilir⁶⁸. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu sonucu oksidatif stres AH'nin erken aşamalarında meydana gelir ve A β direkt veya indirekt olarak mitokondriye zarar verebilir. A β , solunum kompleks I'i bloke eder, böylece ATP üretiminde azalma meydana gelir. A β 'nin mitokondride solunum ve α -ketoglutarat dehidrogenaz ve pürivat dehidrogenaz enzim aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. A β 'nin mitokondriye translokasyonu bilinmemektedir. Ancak, mitokondride A β 'nin etkileştiği bir enzim olan A β bağlanma alkol dehidrogenaz (ABAD) tanımlanmıştır. ABAD, AH'li hastaların beyinlerinde upregüle edilmiştir. Mutant APP ile ABAD'm ekspresyonu, serbest radikal üretimini ve toksisiteyi artırır. A β -ABAD etkileşimini engelleyen bir peptid, serbest radikal oluşumunu ve hücre ölümünü engelleyebilir. Özetle, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve ortaya çıkan enerji bozuklukları, protein agregatlarının temizlenmesindeki bozukluklara, iyon kanalları ve pompalama aktivitesini ve nöronal taşınmayı etkileyen nöronal fonksiyon bozukluklarına sebep olabilir⁶⁷.

Biriken A β , nörofibrilar yumaklar ve hasar görmüş nöronlar, hücre hasarına doğal bir cevap olarak inflamasyonu uyarabilir. Ayrıca mikroglia, beyin içindeki enfeksiyon ve yaralanmaya bağlı olarak immün ve inflamatuvar cevapta rol oynar. AH patogenezi sırasında mikroglia, proinflamatuvar sitokinler reaktif oksijen türleri, proteinazlar ve komplement proteinler gibi sitotoksik moleküllerin salınımını aktive ederek sitokinler nöron hücrelerini ve oligodendritleri apoptoza sürükleyen ve miyelin hasarını artıran inflamatuvar süreçleri uyarır⁶⁹.

Kolesterolün de AH patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Beyin diğer organlarla karşılaştırıldığında, en yüksek kolesterol düzeyine sahip organdır. Yükselen kolesterol düzeyinin A β üretimini artırdığı ve azalan kolesterol sentezinin A β düzeyini azalttığı ve dolayısıyla AH riskini de azalttığı gösterilmiştir. Kolesterol seviyesinin düşmesi, aynı zamanda vasküler risk faktörlerinden koruyarak demans riskini ve şiddetini azaltabilmektedir. Çünkü sıklıkla vasküler demans, Alzheimer hastalığı ile birlikte seyretmektedir⁷⁰. 218 bireyde yapılan bir çalışma, orta yaşlı ve yaşlılarda

Yüksek-Yoğunluklu Lipoprotein (HDL) kolesterol ile korteksteki plaklar ve nörofibrilar yumaklar arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir⁷¹.

A β peptidinin nöronlarda ER stresini indüklediği ve mitokondri ve ER-aracılı hücre ölüm yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. APP mutantlarının ER'de tutulması, APP'nin işlenmesinde değişikliklere sebep olmakta ve ER'den sitozole A β salınımını değiştirmektedir. ER'de proteinlerin birikimi, ER'de strese neden olur. ER, stres durumunu yönetmek için gerekli olan gen ekspresyonunu ve metabolizmadaki adaptif değişimleri uyaran katlanmamış protein cevabını (UPR) aktive ederek hücreyi korur. Bu yolak yanlış katlanmış proteinlerin şaperonlar aracılığıyla düzeltilmesini eğer hatalı katlanma düzeltilemiyorsa, bu proteinlerin übikütilenerek ER aracılı degradasyon yolağı (ERAD) üzerinden proteozomlar ile degrade olmasını sağlar. Bu cevapla birlikte, protein sentezini yavaşlatmakta ve hücreşel şaperonlar uyarılarak protein katlama kapasitesi artmaktadır. UPR, redoks savunmasını ve Ca²⁺ iyonunun savunma kapasitesini güçlendirebilir ve otofaji ile hücreşel temizliğı artırabilir. ER stresi ayrıca nöronları apoptotik hücre ölümüne hazırlayabilir. Bu stresin devam etmesi halinde hücre apoptoza uğrayabilir. ER stresi, sinaptik kaybı ve aksonal dejenerasyonu başlatabilir, sonuç olarak ER stresi AH patogeneşini ağırlaştıran diğere hücreşel yolların katılmasına sebep olabilir⁷².

A β kaskat hipoteşine göre, A β plakların oluşumu AH patolojisinde ilk aşamadır. Nörofibrilar yumakların A β plaklarının oluşumundan sonra sekonder olarak ortaya çıktığını gösteren genetik ve histopatolojik çalışmalar, bu hipoteşu destekler niteliktedir. Bu hipoteşu destekleyici kanıtların artmasıyla birlikte A β 'nin üretimini azaltmak ve A β 'nin yıkımını artırmak için uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesi daha önemli hale gelmektedir⁴. Bu hipoteş doğrultusunda birçok ilaç olma potansiyeline sahip molekül deneme aşamasındadır ve yeni ilaç arama çalışmaları da devam etmektedir⁶⁵.

2.1.4. A β Yıkımı

A β sağlıklı bireylerde de üretilir. Ancak A β 'nin üretimi ve eliminasyonu nöronlarda normal şartlar altında dengededir. A β 'nin sağlıklı bireylerde sürekli olarak dengeli üretimi ve eliminasyonu sonucu, hücrenin belirli kompartımanlarında belirli bir konsantrasyonda A β bulunmaktadır. Down sendromu gibi Ailesel AH'de 21. kromozomda bulunan APP geninin 3 kopya bulunmasından dolayı, ekspresyonundaki

artış, beyin dokusunda A β üretimi-yıkımı arasındaki dengeyi A β üretimini artıracak yönde bozmaktadır. Sporadik form AH'de ise A β degradasyonu ile ilişkili bu mekanizmalarda bozulmalar meydana gelebilmektedir. A β degradasyonunda, Neprilysin, İnsülin Degrade Eden Enzim (İDE), Endotelin Dönüştürücü Enzimler (ECE) gibi görevli birçok proteaz bulunmaktadır⁷³. Proteolitik kesim sonucu oluşan A β , proteozom tarafından degrade edilir. Yaşa bağlı olarak proteozom aktivitesindeki azalma hem A β hem de tau proteininin birikimine sebep olabilir ve bu proteinlerin birikiminin artması proteozom aktivitesini daha da azaltabilmektedir. AH'de A β peptidleri ve bu azalmış proteozom aktivitesi, sinaptik fonksiyonun bozulmasını hızlandırmaktadır⁷⁴.

2.1.5. AH Tanı ve Tedavisi

AH tanısı için geliştirilen altın standartlar otopsiye dayalı çalışmalardan elde edilmiştir. Amiloid plakların ve nörofibrilar yumakların varlığı ve yayılımı, kesin AH tanısını ve hastalığın aşamasını belirlemek için kullanılmaktadır. Klinik aşamada AH'nin tanısı büyük ölçüde fiziksel ve nörolojik incelemelere ve nörofizyolojik değerlendirmelere dayanmaktadır⁷⁵. Klinik olarak AH tanısı konulması için tanı ölçütlerinden biri; Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRDA), diğeri; Tanısal ve İstatistiksel El kitabıdır (DSM IV)⁷⁶ (Şekil 9). Hastalar ve aileleri üzerindeki yükü ve sosyal ve ekonomik masrafları azaltmak için hastalığı daha erken teşhis eden tanı belirteçleri bulmak için önemli çaba sarf edilmektedir. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR) ve Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) gibi nörogörüntüleme yöntemleri araştırmacılara erken evrelerde Alzheimer tanısı koymasına olanak sağlamak için geliştirilmiştir⁷⁷.

- A. Aşağıdakilerden her ikisinin bulunması ile belirli çoğul bilişsel yetersizliğin gelişmesi
1. Bellek bozukluğu (yeni bilgileri öğrenme ya da daha önceden öğrenilmiş bilgileri anımsama yetisinde bozulma)
 2. Aşağıdaki bilişsel bozukluklardan birinin ya da daha fazlasının bulunması
 - Afazi (dil bozukluğu)
 - Apraksi (motor işlevlerde bozukluk olmamasına rağmen motor aktiviteleri yerine getirmede bozukluk)
 - Agnozi (duyu işlevlerinde bozukluk olmamasına karşın nesnelere tanıyamama ya da tanımlayamama)
 - Yönelimsel işlevlerde bozukluk (organize etme, sıraya koyma, tasarlama, soyutlama)
- B. A1 ve A2 tanı ölçütlerindeki bilişsel bozuklukların kişinin toplumsal, sosyal günlük işlevselliğinde bozulma ya da önceki işlevsellik düzeyinde azalmaya sebep olması
- C. Hastalığın yavaş, insi, aşama aşama oluşu ve sürekli bir bilişsel azalma
- D. Hastaların bilişsel kapasitesindeki azalmanın santral sinir sistemini ilgilendiren hastalıklara (serebrovasküler olay, Parkinson hastalığı, subdural hematoma, beyin tümörü, hidrosefali) demansa yol açabilecek sistemik durumlara (hipotiroidizm, vitamin B12 eksikliği, hipoglisemi) ya da madde bağımlılığına bağlı olmaması
- E. Hasta deliryum tablosunda olmamalı
- F. Hastanın klinik durumu başka psikiyatrik bozukluklarla (şizofreni, majör depresyon) açıklanamamalıdır.

Şekil 9. AH'nin tanı kriterleri⁴⁴

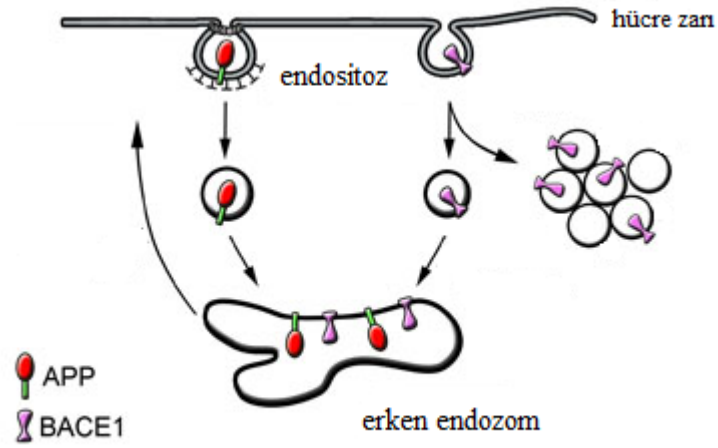
Alzheimer hastalığının ilerlemesinin durdurulması için şu anda mevcut bir tedavi bulunmamaktadır. Ancak semptomların giderilmesinde kullanılan Amerika Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay almış 5 adet ilaç bulunmaktadır. Bunlardan 3 tanesi donapezil, galantamin ve rivastigmin kolinesteraz inhibitörüdür⁷⁸. Bu ilaçlar öğrenme ve hafıza için oldukça önemli nörotransmitter bir madde olan asetilkolin molekülünün bozunmasını önler. Böylece asetilkolin seviyesi yüksek tutularak sinir hücreleri arasındaki iletişim desteklenmiş olur. FDA onaylı 4. ilaç ise memantindir. Memantin, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistidir. Öğrenme ve hafızada önemli rol oynayan önemli bir nörotransmitter olan glutamatın aktivitesini düzenler⁷⁹. NMDA reseptörlerine glutamatın bağlanması kalsiyumun hücre içine girişine izin verir. Bu süreç öğrenme ve hafızanın yanı sıra hücre sinyalizasyonu için önemlidir. AH'de zarar görmüş hücrelerden yüksek miktarda glutamat salgılanır ve kalsiyuma aşırı derecede maruziyet ortaya çıkar. Böylece hücre hasarı hızlanır. Memantin NMDA reseptörlerini kısmen bloke ederek bu yıkım zincirini engellemektedir. FDA onaylı 5. tedavi ise memantin ile donapezilin kombinasyonudur. Kolinesteraz inhibitörlerinin ve memantin etkisi popülasyonlar arasında değişkenlik göstermektedir⁸⁰.

Son yıllarda birçok potansiyel Alzheimer ilacı klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir ve bazı ilaçların da klinik çalışmaları devam etmektedir. AH ile ilgili çalışmalarda β -amiloide biçilen önemli patojenik rol nedeniyle, özellikle beyindeki β -amiloid miktarını azaltmaya yönelik ilaçlar üzerine yoğun bir şekilde odaklanılmıştır.

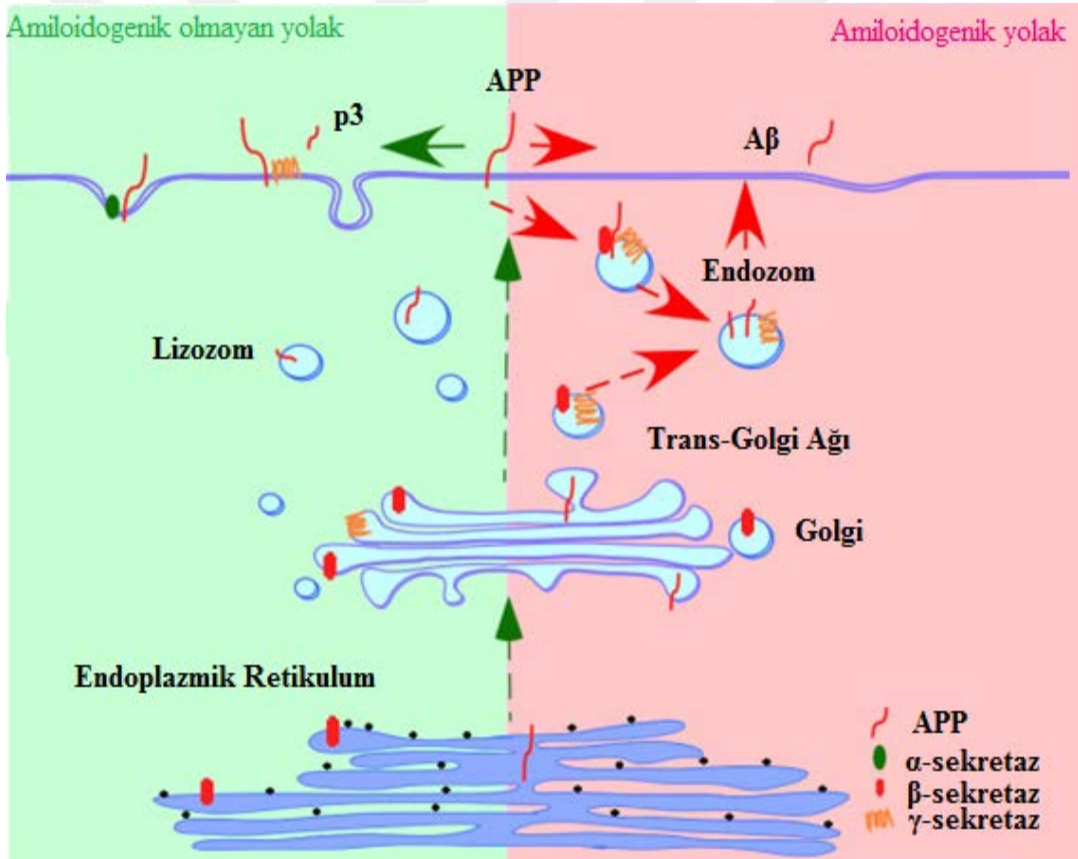
Bu tip ilaç sınıflarından biri, APP'nin kesiminde rol oynayan proteazları hedefleyen ilaçlardır. Başka bir strateji ise immün sistem aracılığıyla β -amiloidin temizlenmesini indüklemektir. Umut vadeden diğer bir strateji ise nörofibrilar yumakların oluşumuna yol açan anormal tau proteinini hedefleyen ilaçların geliştirilmesidir. AH için diğer tedavi edici stratejiler araştırılmaya devam etmektedir, ancak henüz hiçbir büyük ölçekli başarı elde edilememiştir⁷⁵.

2.1.6. BACE1 (β -Sekretaz 1) Enzimi

β -Sekretaz enzimi 1999 yılında birbirinden bağımsız 5 farklı araştırma grubu tarafından keşfedilmiştir. 2000'li yıllarda ise β -sekretaz özelliklerinin tümünü taşıyan ve BACE1 olarak adlandırılan yeni bir transmembran aspartik asit proteaz enzimi tanımlanmıştır. Dolayısıyla BACE1 enzimi ile β -sekretaz olarak tanımlanan enzim arasında herhangi bir farklılığın bulunmadığı da anlaşılmıştır. BACE1 enzimi, peptid benzeri aspartil proteaz ailesinin bir üyesidir. BACE1 enzimi temelde düşük pH'da optimal aktivite göstermesine uyumlu biçimde, APP ile birlikte Golgi aparatı ve geç endozomlarda yerleşmiştir. Enzimin aktif bölgesi, bu kompartımanların lümeninin içindedir. APP'nin β -Sekretaz tarafından kesimi bu komponentlerin tümünde gerçekleşebileceği bildirilmiştir. Ayrıca BACE1 hücre membranından tekrar erken endozomlara alınabilir ve tekrar hücre yüzeyine geri dönebilir¹⁰. (Şekil 10) APP'nin büyük çoğunluğu Golgi kompleksinde yerleşmiştir, kalan az miktardaki APP ise membranda yerleşmiştir. Hücre membranında bulunan APP'nin büyük çoğunluğu ise α -sekretaz ile amiloidogenik olmayan yolda kesilirken, hücre içinde bulunan APP ise BACE1 tarafından amiloidogenik yola aracılığıyla kesilir⁸¹ (Şekil 11). BACE1, sonuçta AH'ye sebep olan olaylar zincirinde görevli ilk ve önemli enzimdir. Sürekli olarak ifade edilmesine rağmen, AH'den etkilenen bireylerin beyinlerinde ve serebrospinal sıvılarında (beyin-omirilik sıvısı) artan seviyelerde bulunduğu gösterilmiştir¹⁰. Böylece BACE1 Alzheimer Hastalığı için ilaç geliştirmede önemli bir hedef haline gelmiştir⁸².



Şekil 10. BACE1 enziminden hücre yüzeyinden endositoz ile alınması

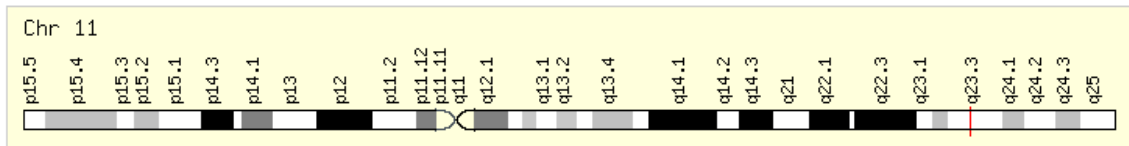


Şekil 11. BACE1 enziminin kesimi ve hücre trafiği⁸¹

Farelerde BACE1'in fonksiyonu bozulduğunda, beyinlerinde Aβ, sAPPβ ve CTFβ üretiminde bozulmalar gözlenmiştir. Ayrıca AH'li hastaların frontal kortekslerinde BACE1 proteini miktarında ve aktivitesinde önemli bir artış gözlenmiştir ve beyinde Aβ

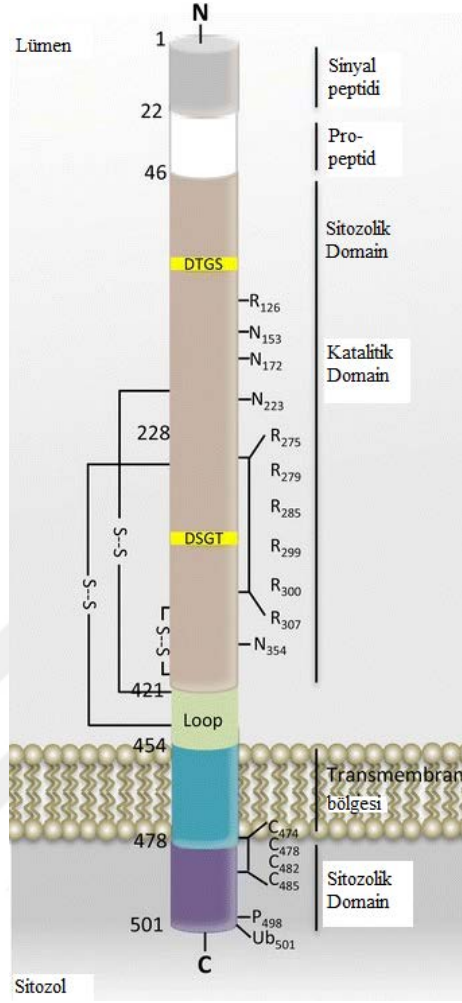
miktarı ile BACE1 miktarı arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur⁸⁴. BACE1 knock-out farelerden elde edilen veriler, beyinlerindeki BACE1 enziminin in vivo olarak APP'nin amiloidogenik yolak aracılığıyla kesiminden sorumlu olduğunu göstermiştir. BACE1 enzimi, stabil olarak APP'yi aşırı eksprese eden hücre hattına transfekte edildiğinde, β -sekretaz aktivitesinde önemli bir artış gözlenmiştir. BACE1'in transfeksiyonunun aksine, APP'yi aşırı eksprese eden hücrelerin BACE1 antisense oligonükleotidleri ile muamelesi, BACE1 mRNA düzeyini azalttığı ve β -sekretaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Null allel formundaki BACE1-/- farelerde yapılan ilk çalışmalarda, BACE1 ekspresyonunun yokluğunun embriyonik gelişime zarar vermediği veya yetişkin knock-out farelerin morfolojisini, fizyolojisini, biyokimyasını ve davranış özelliklerini değiştirmedeği gösterilmiştir. BACE1 yokluğunun, in vivo olarak iyi bir şekilde tolere edilebildiği ve embriyonik, post-natal veya yetişkin farelerde istenmeyen bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Ancak, daha sonra BACE1-/- farelerde yapılan daha kesin davranışsal çalışmalarda, bilişsel ve duygusal fonksiyonlarda anormallikler gösterilmiştir. BACE1-/- fareler hem mekânsal hem de referans bellekte bozukluklar sergilemişlerdir. Bu veriler BACE1'in normal hipokampal hafıza süreçleri için gerekli olduğu ve dolayısıyla BACE1 aracılığıyla beyinde A β üretimi, A β 'nin APP metabolizmasının toksik bir yan ürünü olmaktan ziyade fizyolojik bir işlevinin olduğu olasılığını artırmaktadır. BACE1 aktivitesinin tamamen engellenmesi, belirli istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir. BACE1 düzeyinin kısmi azaltılması ise bilişsel kusurları ve A β birikimi gibi amiloid nöropatolojileri düzeltebildiği gösterilmiştir⁸⁵.

BACE1 geni 11 kromozomun q23.3 bölgesi üzerindeki ~30 kilobaz (kb) alanı kaplar⁸⁵. (Şekil 12.)



Şekil 12. BACE1 enzimini kodlayan genin 11. Kromozomdaki konumu⁸⁶.

BACE1 geni, 24 aa'lik bir sinyal peptidi ve bu peptidi takip eden 24 aa'lik bir proprotein domainini içeren 501 aa'lik bir proteini kodlar⁸⁵ (Şekil 13).



Şekil 13. BACE1 enziminin temel yapısı⁶⁵.

BACE1 enzimi, iki korunmuş aspartik asit proteaz aktif bölge domainine sahiptir. Bu domainleri bir transmembran domain ve 24 aa'lık bir C-terminal sitoplazmik kuyruğu takip eder. İki proteaz aspartik aktif bölgesi arasındaki 25. ve 44. aa'ler BACE1'in doğru katlanması için önemlidir. İmmün boyama ile BACE1 enziminin büyük çoğunluğunun Golgi ve endozomlara yerleştiği gösterilmiştir. BACE1 başlangıçta pre-proprotein olarak eksprese edilir ve daha sonra ko-transkripsiyonel olarak N-glikozillenir. ER'de ~60 kDa'lık olgun olmayan BACE1 üretilir, propeptid kesimi ve daha kompleks glikozillenme geçirdikten sonra, Golgi'de ~70 kDa'lık olgun BACE1 üretilir⁸⁵. BACE1 enziminin APP dışında birçok farklı substratı da bulunmaktadır. Miyelinleşmenin düzenlenmesinde görevli protein neuregulin 1 (NRG-1), lipoprotein reseptör-ilişkili protein (LRP), β -galaktosidaz, α -2,6-sialil transferaz

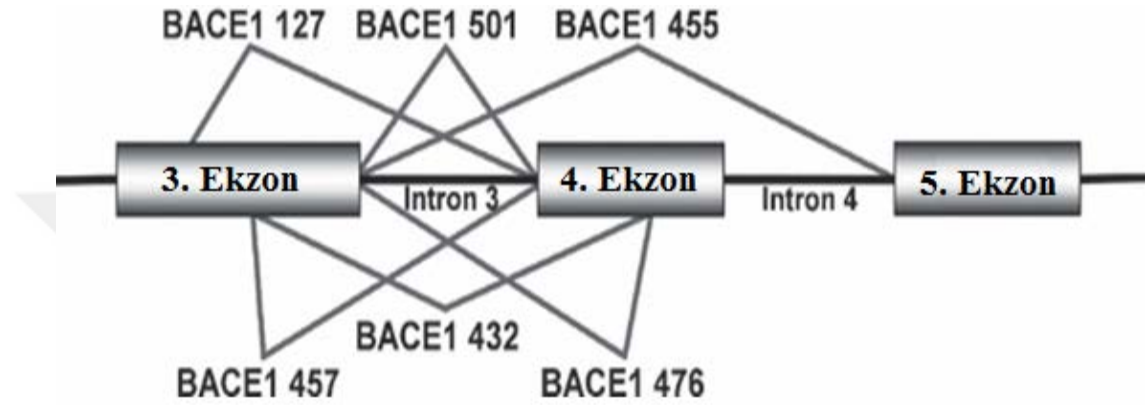
(ST6-Gal1), P-selektin Glikoprotein Ligand-1 (PSGL-1), Voltaj-Kapılı Sodyum Kanallarının β -Alt Birimi (VGSC β) ve İnterlökin-1 Reseptör II (IL-1R2) bunlardan bazılarıdır⁴⁷.

2.1.6.1. BACE1 Enziminin İzofomları

BACE1 mRNA'sı pankreasta oldukça yüksek seviyede, beyinde orta seviyede ve birçok periferal dokuda düşük düzeyde olduğu bulunmuştur. Ancak β -sekretaz aktivitesi sadece beyinde en yüksektir, pankreasta belirlenemez seviyededir. Pankreasta bu BACE1 mRNA'sının yüksek ekspresyonu ve düşük β -sekretaz aktivitesinin şaşırtıcı olduğu düşünülmüştür⁸⁷. Ancak, daha sonraki çalışmalarda, pankreastaki BACE1 mRNA transkriptinden alternatif kırılma sonucu farklı izofomlar olduğu gösterilmiştir. BACE1'in normal kırılması, BACE1₅₀₁ olarak adlandırılan tam uzunluktaki (501 aminoasit) aktif proteinin üretimi ile sonuçlanır. BACE1'in alternatif kırılması enzim aktivitesi oldukça düşük protein izofomlarının oluşumu ile sonuçlanır. BACE1 pre-mRNA'sının alternatif kırılması 3. Ekzon içindeki alternatif 5' kırılma bölgesinin ve/veya 4. ekzon içindeki alternatif 3' kırılma bölgesinin kullanımı ile meydana gelir. Bu alternatif ve normal kırılma bölgelerinin çeşitli kombinasyonları ile 476, 457 ve 432 aminoasit uzunluklarında kırılma varyantları oluşur⁸. Pankreasta ilk tanımlanan BACE1 varyantında, 3. Ekzonun ucunda 132 nükleotid eksiktir ve BACE1₄₅₇ izoformu, 2 katalitik rezidü arasında yerleşen ve 4 glikozilasyon bölgesinden 2'sine sahip olan 44 aa'lik bir kısımdan yoksundur. Bu delesyonun proteinin yanlış katlanmasına sebep olduğu ileri sürülmüştür. Bu durum hücrede yanlış katlanmış proteinlerin bir kalite kontrol mekanizması olan ER içinde pro-enzimatik formda tutulduğu bilgisi ve BACE1₄₅₇ izoformunun ER'ye yerleşmiş olduğu gözlemi ile uyumludur¹⁰. Bodendorf ve arkadaşları ayrıca BACE1₄₅₇ izoformunun APP'nin amiloidogenik yolak aracılığıyla kesiminde rol oynamadığını göstermişlerdir⁸. BACE1₄₅₇ izoformunun beyinde üretilmesiyle ilişkili birbiri ile çelişen çalışmalar mevcuttur. Eehalt ve arkadaşları⁸⁸ ve Bodendorf ve arkadaşlarının yaptığı iki ayrı çalışmada, pankreasta aktif olarak bulunan BACE1₄₅₇ izoformunun beyinde bulunmadığını gösterirken^{8,88}, Tanahashi ve Tabira BACE1₄₅₇ izoformunun beyinde bulunduğunu göstermişlerdir⁸⁹. Bodendorf ve arkadaşları APP'yi aşırı derecede eksprese eden hücrelere BACE1₄₅₇'yi ko-transfekte ettiğinde, BACE1'in enzimatik

açından aktif olan formu BACE1₅₀₁'de olduğu gibi APP'nin amiloidogenik yolakla kesimini artırmadığını bildirmişlerdir⁸. Daha sonra Tanahashi ve Tabira insan beyinde BACE1₄₅₇ izoformuna ek olarak 2 yeni alternatif olarak kırpılmış izoform belirlemişlerdir. Bunlardan biri; BACE1₄₇₆ izoformu, transkriptin 4. Ekzonundaki ilk 25 aa'den (190-214. pozisyonundaki aa'ler) yoksundur. Diğeri; BACE1₄₃₂ izoformu, transkriptin 4. Ekzonundaki ilk 25 aa'in yanı sıra 3. Ekzonun sonundaki 44 aa'den (146-214. Pozisyonundaki aa'ler) yoksundur. BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformları tam uzunluktaki protein olan BACE1₅₀₁'de bulunan 4 glikozilasyon bölgesinin ikisinden yoksundur. Nöroblastoma hücrelerinin protein sentez inhibitörleri ile muamelesinden sonra indüklenen stres koşulları altında BACE1 ekspresyonunu ve aktivitesini inceleyen Tanahashi ve Tabira, alternatif kırpılma sonucu oluşan ve kısa bir şekilde sonlanan 4. bir BACE1 varyantı olduğunu keşfetmişlerdir. Bu yeni varyant BACE1₁₂₇ olarak adlandırılmıştır. BACE1₁₂₇ 3. Ekzon içindeki kırpılma donör bölgesinin kullanımı ile oluşturulur. Bu kırpılma bölgesinin kullanımı erken bir sonlanma kodonunun oluşumuna ve non-sense aracılıklı mRNA bozunması (NMD) olarak bilinen bir süreçle, protein kodlayan dizilerin %75'inin eliminasyonuna sebep olur. BACE1₁₂₇, 2. aspartik proteaz bölgesini, iki N-bağlı glikozilasyon bölgesini, transmembran domainini ve C-terminal sitoplazmik kuyruğunu içeren aa'lerden yoksundur. BACE1₁₂₇ β-sekretaz aktivitesine sahip değildir ve pro-peptid çıkarma işlemi geçirilmeden ER'de tutulur. AH hastalarında ve sağlıklı kontrollerin beyinlerinde düşük düzeyde BACE1₁₂₇ belirlenmiştir. Ancak bu varyantın hastalığa katkısı belirlenememiştir⁹⁰. Mowrer ve Wolfe, dokularda çok düşük konsantrasyonda üretilen ve 4. Ekzonunu içermeyen 5. bir BACE1 kırpılma varyantı olduğunu bildirmişlerdir. Bu varyant BACE1₄₅₅ olarak adlandırılmıştır. 3. intron-4. ekzon bağlantısındaki normal 3' kırpılma bölgesinin ve 4. İntron-5. Ekzon bağlantısındaki normal 5' kırpılma bölgesinin kullanılması sonucu oluşur. Tam uzunluktaki BACE1₅₀₁ proteininde bulunan 46 aa'den yoksundur. BACE1₄₅₅ izoformu tüm dokularda belirlenmiştir, ancak beyinle karşılaştırıldığında pankreasta yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur⁹. Tüm 5 BACE1 kırpılma varyantı, değişen düzeylerde de olsa beyin dokusunda belirlenmiştir¹⁰ (Şekil 14). BACE1₄₇₆, BACE1₄₅₇, BACE1₄₅₅ ve BACE1₄₃₂ izoformlarının aktivitesi, tam uzunluktaki BACE1₅₀₁'in aktivitesi ile karşılaştırıldığında %80'e kadar daha düşüktür. Mowrer ve Wolfe spesifik kırpılma bölgelerini engelleyen anti-sense oligonükleotidler

kullanarak alternatif kırılma bölgelerinin kullanımını artırmışlardır. 3. intron- 4. ekzon bağlantısındaki normal 3' kırılma bölgesinin inhibisyon, tam-uzunluktaki BACE1₅₀₁'in mRNA düzeyini azaltarak, BACE1₄₇₆ ve BACE1₄₃₂ mRNA düzeyini önemli ölçüde artırmıştır. Kırılma varyantlarındaki bu önemli artış, istenilen etkiyi oluşturmuştur ve antisense ile muamele edilen hücrelerden üretilen A β miktarını önemli ölçüde azaltmıştır⁹.



Şekil 14. BACE1 pre-mRNA'sında BACE1 izoformlarının oluşması için kullanılan kırılma bölgeleri¹¹.

Yapılan çalışmalarda BACE1'in kırılmasının minör mutasyonlara hassas olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 4. ekzondaki alternatif 3' kırılma bölgesinde meydana gelen mutasyon 4. ekzonun atlanmasında önemli bir artışa sebep olmuştur. Bu iki kırılma olayı, bir dereceye kadar birbiriyle bağlantılı olabilir. Çünkü, 4. ekzondaki 3' kırılma bölgesinin inhibisyonunun 4. intron-5. ekzon bağlantısındaki 3' kırılma bölgesinin tanınmasını artırdığı gösterilmiştir, böylece BACE1₄₅₅'de bir artış ile eş zamanlı BACE1₅₀₁'de azalış gözlenmiştir¹¹.

BACE1'in alternatif kırılmasını düzenleyen cis-acting ve trans-acting elementler hakkında çok az şey bilinmektedir. BACE1'de bulunan Guanin tekrarları G-kuadrupleks yapısına katlanabildiği ve 3. ekzonda yer alan alternatif 5' kırılma bölgesinin seçimini düzenleyebildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu bölgeye heterojen nükleer ribonükleoprotein H (hnRNP H) protein-RNA kompleksinin bağlanabildiği ve en aktif olan tam uzunluktaki BACE1₅₀₁'in üretimini artırdığı gösterilmiştir. hnRNP H'nin knock-down edilmesi ile A β ₄₀'ın üretimini düşürdüğü bildirilmiştir⁹¹.

BACE1'in alternatif kırılması belirli hücrel koşullar altında değişebilir ve BACE1 kırılmasındaki değişimler hücrelerdeki A β üretimini etkileyebilir. Böylece BACE1 alternatif kırılmasının düzenlenmesi, AH'nın tedavisi için potansiyel bir terapötik strateji olabilir. Tam uzunluktaki BACE1₅₀₁ ile karşılaştırıldığında, alternatif kırılma geçirmiş BACE1 transkriptleri oldukça azalmış bir enzim aktivitesi gösterdikleri için bireyler arasındaki BACE1 alternatif kırılmasındaki varyasyonlar, koruyucu veya patojenik olarak A β üretiminde farklılıklar ile sonuçlanabilir⁸⁵.

2.2. Histon Deasetilazlar (HDAC) ve İnhibitörleri

Epigenetik bilimi, bir genin nükleotid dizisinde herhangi bir değişim meydana gelmeksizin, gen ifadesinde meydana gelen değişimleri incelemektedir. Epigenetik modifikasyonlar, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Epigenetik değişimlerden sorumlu olan, histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu, kromatinin yoğunluğunu etkileyerek ökaryot hücrelerinin transkripsiyonunda önemli rol oynar. Histon veya histon olmayan proteinlerin asetilasyon durumu, Histon Deasetilaz (HDAC) ve Histon Asetil Transferaz (HAT) enzimlerinin koordinasyonu ile sağlanır. HAT enzimleri, histonlardaki lizin rezidülerine asetil grupları eklerken, HDAC enzimleri ise bu asetil gruplarını uzaklaştırır. Histon asetilasyonu, kromatin yapısının gevşemesi, transkripsiyon düzenleyicilerinin DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanması ve böylece transkripsiyon aktivasyonu ve DNA hasar onarımı ile ilişkilidir. Diğer yandan histon deasetilasyonu, kromatinin yoğunlaşmasına ve transkripsiyonun baskılanmasına sebep olur. Hem HAT hem de HDAC, gen ifadesi ve kontrol mekanizmasında rol oynarlar ve birçok alt birimden oluşan kompleksleri yönlendirirler⁹². Bu enzimler lizinlerin in vivo asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki dengeyi korur. Histonlarda meydana gelen asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki dengenin bozulmasının, yaşla ilişkili hafıza bozukluklarında ve AH patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir⁹³. Histon deasetilasyonunun düzeyini azaltmak için HDAC inhibitörlerine ait kemoterapik ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar farklı genlerin ekspresyonunu değiştirebilir. Böylece HDAC enzimlerinin AH tedavisi için terapötik hedef olabileceği ileri sürülmüştür⁹⁴.

HDAC enzimleri, gelişim, proliferasyon ve hücre ölümü gibi birçok biyolojik sürece doğrudan veya indirekt olarak katılabilir. İnsanlarda 18 HDAC enzimi

tanımlanmış ve 4 ana gruba ayrılmıştır. Sınıf I HDAC'leri temelde nükleerdir, lokalizasyonda görev alır ve sürekli olarak ifade edilirler. HDAC 1, 2, 3 ve 8 enzimleri bu gruba aittir. Sınıf II HDAC'leri 2 alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; Sınıf IIa ve Sınıf IIb'dir. Sınıf IIa HDAC4, 5, 7 ve 9 enzimlerini içerirken, Sınıf IIb ise HDAC6 ve 10 enzimlerini içerir. Sınıf IIa sitoplazma ve nükleus arasındaki göçte görevlidir, Sınıf IIb ise temelde sitoplazmada bulunur⁹³. Sınıf III HDAC'ler sirtuinler olarak bilinir ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD⁺) bağımlı enzimlerdir. Sınıf IV HDAC'ın tek bir üyesi bulunmaktadır; HDAC11. HDAC11 sınıf I HDAC ailesi ile benzerlik gösterir ve nükleusta yerleşmiştir⁹⁴.

İlk olarak anti-kanser ilacı olarak kullanılan HDAC inhibitörleri, histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ifadesini değiştirebilmekte, ayrıca transkripsiyon faktörleri ve tümör baskılayıcı proteinler gibi histon olmayan bazı proteinlerin asetilasyonunu artırarak ilgili genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Son yıllarda HDAC inhibitörlerinin AH ve Parkinson Hastalığı gibi birçok nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıkta, sinaptik plastisiteyi, öğrenme ve hafıza yeteneğini artırarak nörokoruyucu rol oynadığı ileri sürülmektedir. Birkaç HDAC inhibitörünün FDA onayını alarak, kanser tedavisinde klinik olarak kullanıma başlamasıyla birçok HDAC inhibitörü belirlenmiştir ve bunlardan bir kısmının klinik öncesi veya klinik çalışmaları devam etmektedir. HDAC inhibitörleri doğal kaynaklardan purifiye edilebilir veya sentezlenebilir^{93,94}.

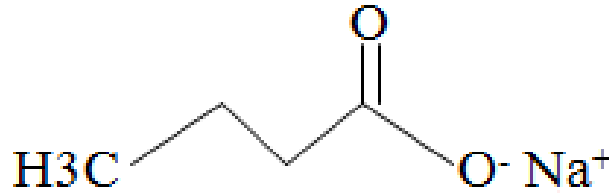
2.2.1. HDAC İnhibitörleri ve AH

Son yıllarda birçok HDAC inhibitörü geliştirilmiştir. Klinik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ve seçici olmayan HDAC inhibitörler; valproik asit, Trikostatın A, sodyum-fenil bütirat ve vorinostatdır. Bu inhibitörler çinko bağımlı-HDAC Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf IV enzimleri ile etkileşime girerler. Valproik asit İsveç mutasyonuna sahip APP₇₅₁ geni ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde A β peptidi oluşumunu inhibe etmiştir. Ayrıca valproik asit AH transgenik farelerde, γ -sekretazı inhibe ederek A β plaklarını ve hafıza ile ilgili bozuklukları önemli ölçüde azaltmıştır. 4-fenil bütiratın transgenik AH model farelerde tau proteininin fosforilasyonunu azalttığı belirlenmiştir. 4-fenil bütirat ayrıca nöron içindeki A β birikimini azaltarak, hafıza bozukluklarını tersine çevirmiştir. Ayrıca seçici olmayan bir HDAC inhibitörü olan Trikostatın A

verilen hayvanların da uzun dönem hafıza bozukluklarında iyileşme gösterdiği belirlenmiştir. HDAC inhibitörlerinin AH fare modellerinde hafızayı iyileştirmesi göz önünde bulundurulduğunda, HDAC inhibitörleri AH'li hastalarda bilişsel fonksiyonların korunmasında alternatif bir ilaç olabilir. Ancak, AH patogenezinde HDAC ile ilişkili hücresel sinyal mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir⁹⁴.

2.2.2. Sodyum Bütirat

Bütirat/Bütirik asit, besinsel fibrillerin, anaerobik bakterial fermantasyonu sonucu üretilen ve toksik olmayan kısa zincirli bir yağ asididir. Sodyum bütirat (NaB) ise bütirik asidin sodyum tuzudur⁹⁵ (Şekil 15). Sodyum bütirat, HDAC inhibitörlerinin bir üyesidir. Sodyum bütirat, diğer HDAC inhibitörleri gibi histon asetilasyonunu değiştirebilir ve böylece birçok genin ekspresyonunu etkileyebilir⁹⁶.



Şekil 15. Bütirik asitin sodyum tuzunun (NaB) kimyasal yapısı⁹⁷

Sodyum bütirat, en çok çalışılan histon deasetilaz inhibitörlerinden biridir. Kromatin modifikasyonları sayesinde gen ekspresyonunu değiştirerek umut vadeden bir kanser ajanı olarak ortaya çıkmıştır. Sodyum bütiratın, görece düşük konsantrasyonlarda hücre çoğalmasının inhibisyonu ve farklılaşmanın indüklenmesi gibi kültüre edilmiş memeli hücreleri üzerinde birçok farklı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, NaB'ın meme kanseri hücreleri, insan kolon kanseri hücre hattı ve HeLa servikal karsinoma hücre hattı gibi birçok farklı kanser hücresinde apoptozu indükleyebildiğini gösteren çok sayıda kanıt vardır¹³. Hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, büyümeyi inhibe etme ve apoptozu indükleyebilme aktivitesi nedeniyle, sodyum bütirat tek başına veya diğer anti-kanser ajanlarla birlikte birçok malignan tümörü tedavi etmek için

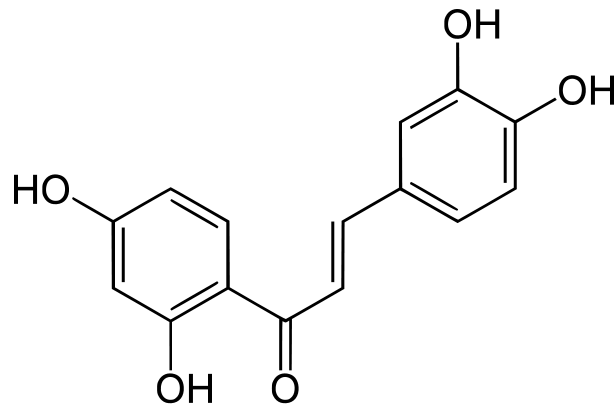
kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Ancak NaB'nin klinik kullanımı, etki mekanizması tam olarak bilinmediği için sınırlıdır⁹⁸.

KM670/671NL mutasyonlu APP'yi ve L166P mutasyonlu PS1'i birlikte eksprese eden APP/PS1-21 fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada 2 yaşındaki farelerin agresif AH patolojisi göstermeleri sağlanmıştır. Uzun süreli (6 haftalık) NaB tedavisinin ileri evrelerde verildiğinde bile hafızayı iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu modelde hafıza bozukluklarının geriye döndürülmesi, histon asetilasyonun hedeflenmesi ve sonuç olarak öğrenme ile ilgili genlerin ekspresyonu artışı ile bağlantılıdır⁹⁹.

2011'de yapılan bir çalışmada sodyum bütiratın, Alzheimer hastalığının patolojisinde nörofibrilar yumakların oluşumunda rolü olan ve merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde bulunan Tau proteinin, hastalıkta artan kırılma varyantının ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur¹². Bazı HDAC inhibitörlerinin de birçok genin alternatif kırılmasını etkilediği belirlenmiştir¹¹.

2.2.3. Bütein

Bütein polifenolik bir bileşiktir ve flavonoid ailesine aittir (Şekil 16). Bitkilerden elde edilebildiği gibi laboratuvar da sentezlenebilir. Bütein, 3,4,2',4'-tetrahidroksikalkon olarak da adlandırılmaktadır¹⁰⁰.



Şekil 16. Büteinin kimyasal yapısı¹⁰¹

Bütein *Rhus verniciflua* ağacının yapraklarında bulunur. Bütein içeren bitkiler çin tıbbında kullanılmaktadır¹⁰². Bütein, antioksidan, anti-adipojenik, apoptoz indükleyici olma özelliği gibi birçok farklı biyolojik fonksiyona sahiptir. Büteinin kanser gelişimi ve ilerlemesini engellediği bilinmektedir ve ayrıca kolon adenosarkoma hücreleri,

lösemi hücreleri, lenfoma hücreleri, multiple miyeloma hücreleri, meme kanseri hücreleri, osteosarkoma hücreleri, hepatoselüler karsinoma hücreleri, prostat kanseri hücreleri ve nöroblastoma hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Buteinin ayrıca tümör oluşum süreçlerinde koruyucu rol oynayabileceği ileri sürülmüştür¹⁴. Buteinin ayrıca doğal kalkanlar içinde en iyi HDAC inhibisyonu sağladığı ve hem HDAC inhibisyonu hem de TNF α (hücre ölüm faktörü alfa) indüklü NF- κ B (nükleer faktör kapa B) inhibisyonu yaparak ikili etkiye sahip olduğu bildirilmiştir¹⁰³.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine 5 mM ve 10 mM sodyum bütirat ve 2 µM ve 10 µM bütein uygulaması yapılmıştır. Bu kimyasalların SH-SY5Y hücrelerindeki BACE1 geninin izoformlarında meydana getirdiği ekspresyon değişiklikleri incelemeye çalışıldı. Çalışmalar Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Labartuvar olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Araç Ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler markaları ile birlikte aşağıda verilmiştir;

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

1. Besi Ortamı DMEM/F12 (HAM) 1:1 (Biological Industries)
2. Bütein (Abcr)
3. DEPC su (İnvitrogen)
4. Dimetilsülfoksit (DMSO) (Mrck)
5. Etanol (Merck)
6. Fetal Bovin Serum (FBS) (Biowest)
7. High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Applied Biosystem)
8. İzopropanol (Mrck)
9. Kloroform (Mrck)
10. L-glutamin (Biowest)
11. Penisilin/Streptomisin (PS) (Biowest)
12. Plate kapağı (Applied Biosystem)
13. Sodyum Bütirat (Across Organics)
14. Sybr Green Master Mix (Applied Biosystem)
15. Tripsin/EDTA (Lonza)
16. Trizol Reagent (Sigma)
17. 96-kuyucuklu plate (Applied Biosystem)

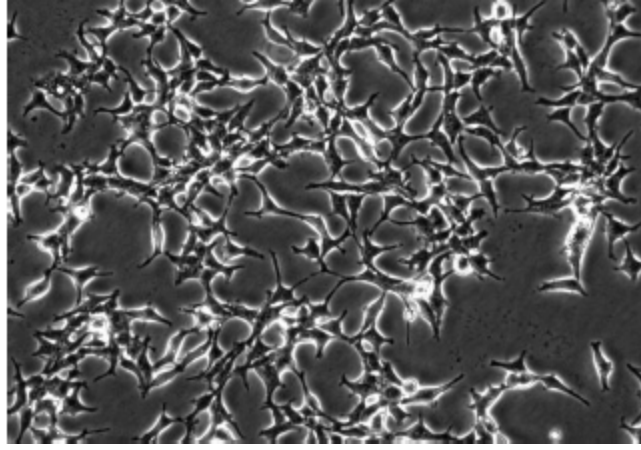
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Buzdolabı (Arçelik)
2. Işık mikroskobu (Olympus)
3. İnkübatör (nemlendirilmiş ve %5 CO₂'li ortam, Eppendorf marka)
4. İnvirt mikroskop (Olympus)
5. Steril enjektörler (2 ml'lik, 5 ml'lik, 10 ml'luk, 20 ml'lik)
6. Steril kabin (Kojair)
7. Steril kültür flaskı (Thermo Scientific)
8. Soğutmalı santrifüj
9. Thermal cyclers (Applied Biosystem)
10. Vorteks

3.2. Yöntem

3.2.1. SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri

SH-SY5Y, metastatik bir kemik tümöründen 1970'de elde edilen SK-N-SH insan nöroblastoma hücre hattının seri şekilde izole edilmiş 3 nöroblast klonlarından (SH-SY, SH-SY5, SH-SY5Y) biridir. Hücreler ılımlı derecede dopamin beta hidroksilaz aktivitesi gösterir. Glutamati nörotransmitter olan GABA'ya dönüştürebilirler. SH-SY5Y hücrelerinin 1×10^6 hücre/cm²den daha fazla bir saturasyon yoğunluğuna sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu hücreler yapışan ve yüzen hücrelerin karışımı olarak büyür¹⁰⁴. SH-SY5Y AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklarla ilgili çalışmalarda in vitro model olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler sinaptik yapılara sahiptir, aksonal taşınma gerçekleştirirler ve nöronlara özgü genleri eksprese edebilirler. AH'de tau ve mikrotübüllerin rolünü araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu hücre hattı AH'nin progresyonunun altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında ve ilaç geliştirme çalışmalarında da kullanılmaktadır¹⁰⁵ (Şekil 17). Çalışmada kullanılan SH-SY5Y hücre hattı Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI'ndan temin edilmiştir.



Şekil 17. SH SY5Y hücrelerinin mikroskopta 10x büyütmedeki görüntüsü¹⁰⁶

3.2.2. SH SY5Y Hücrelerinin Büyüme Ortamının Hazırlanması

SH SY5Y hücrelerinin büyüme ortamının hazırlanması için çizelge 2’de gösterilen hacimde malzemeler kullanılmıştır:

Çizelge 2. SHSY57 hücrelerinin büyüme ortamının içeriği

Malzemeler	%	100 ml ortam
DMEM/F12 1:1	%88	88 mL
Fetal Bovin Serum (FBS)	% 10	10 mL
L-Glutamin	% 1	1 mL
Penisilin/Streptomisin	% 1	1 mL

88 mL DMEM/F12 besi ortamından alınarak steril bir kaba aktarıldı. Üzerine 10 mL FBS ilave edildi. 1 mL L-Glutamin 0.22 µl’lik filtreden geçirilerek kaba ilave edildi. 1 mL Penisilin/Streptomisin (PS) eklenerek, besin ortamının homojen dağılması için birkaç kez pipetaj yapıldı. Cam şişelerin ağzı parafilm ile sarılarak kullanılabileceği kadar +4°C’ de saklandı.

3.2.3. Kimyasallar için Stok Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.3.1. 5 mM Sodyum Bütirat (NAB) İçin 1M Stok Çözeltisinin Hazırlanması

0,33 g NaB hassas terazide tartıldı. 120 µl DMSO ile çözüldü. Elde edilen çözeltiliye son hacim 3 ml olacak şekilde PBS (Fosfat Tamponlu Tuz) çözeltisi eklendi.

3.2.3.2. 1 mM Sodyum Bütirat (NAB) İçin 1M Stok Çözeltisinin Hazırlanması

0,33 g NaB hassas terazide tartıldı. 600 µl DMSO ile çözüldü. Elde edilen çözeltiye son hacim 3 ml olacak şekilde PBS eklendi. Sodyum Bütirat için iki farklı stok çözeltisinin hazırlanmasının sebebi, farklı konsantrasyonlar için hücre kültürüne eklenen farklı hacimlerde DMSO oranının farklı olacak olmasıdır. Bu şekilde DMSO'dan kaynaklı gen ekspresyon farklılığının önüne geçilmiştir.

3.2.3.3. 0,1 mM Bütein Stok Çözeltisinin Hazırlanması

0,014 mg Bütein hassas terazide tartıldı. 500 µl DMSO ile çözüldü (1.stok çözelti = 10 mM). Bu 1. Stok çözeltiden 20 µl alınarak üzerine 1980 µl PBS eklendi. (2.stok çözelti = 0,1 mM) Bütein ile muameleler 2. Stoktan alınarak yapıldı. $M1.V1=M2.V2$ formülü kullanılarak her bir kuyudaki son konsantrasyon 2 µM ve 10 µM olacak şekilde eklenmesi gereken miktarlar belirlendi.

3.2.4. SH SY5Y Hücre Hattının Çözülmesi

1. Su banyosu önceden 37 °C'ye ayarlandı. Önceden hazırlanmış ve +4 °C'de saklanmakta olan besin ortamı 37 °C'de ısıtıldı.
2. 25 cm²'lik hücre kültür flasks etiketlendi ve 5 ml hazırlanan büyüme ortamından eklendi. Dondurma tüpü içindeki hücreler -80 °C'lik dolaptan çıkarılarak hızlıca 37 °C'de çözüldü.
3. Çözülen hücreler pipetaj yapılarak 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10 mL büyüme ortamı eklendi. 1500 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, dipte kalan pelet için 5 ml taze büyüme ortamı eklenerek pipetaj yapıldı.
4. Hücre süspansiyonu, daha önceden hazırlanmış olan 25 cm²'lik kültür kaplarına aktarıldı. Flasks mikroskop altında incelendi ve 37 °C'de %5 CO₂ bulunan inkübatöre yerleştirildi. 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri ve yüzeye yapışmaları mikroskopta kontrol edildi.

3.2.5. Hücrelerin Pasajlanması

1. Hücreler kültür kabı içinde yeterli yoğunluğa ulaştığı belirlendiğinde, büyüme ortamı flasktan uzaklaştırıldı. Hücreler steril PBS (Fosfat Buffer Salin) ile yıkandı.
2. 25 cm²'lik hücre kültür flasklarına 1'er mL önceden 37 °C'de ısıtılmış Tripsin /EDTA çözeltisi eklendi. Kültür kabının tabanına hafifçe vurularak hücrelerin kalkması sağlandı Hücrelerin tabandan yeterince ayrılamaması durumunda kültür kapları 2-3 dk'yı geçmeyecek şekilde 37°C'de inkübatörde bekletildi.
3. Mikroskop altında hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı gözlemlendiğinde kültür kaplarına Tripsin/EDTA hacmi kadar büyüme ortamı eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra hücreler 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

3.2.6. Hücrelerin Sayımı

1. Homojen hale getirilmiş hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 180 µl büyüme ortamından eklendi. Bu şekilde hücre süspansiyonu 10 kat seyreltilmiş oldu. (1:10)
2. Seyreltilmiş hücre çözeltisinden 10 µl alınarak Thoma lamı ve lamel arasındaki boşluğa uygulandı. Işık mikroskopunda hücreler sayıldı. 4 farklı alan sayılarak ortalaması alındı. Mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Hücre/mL} = \text{Ortalama Sayım Değeri} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10^4$$

3. Bu formüle göre, her bir 6-kuyucuklu platede bulunan 2 ml besiyortamı içeren kuyuya 250 bin sayıda hücre gelecek miktarda hücre süspansiyonu eklenerek ekim yapıldı. Her bir kuyuda, %80 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında (yaklaşık 1 gün sonra) besiyeri değiştirildi ve kimyasal uygulaması yapıldı.

Kontrol grubuna hiçbir muamele yapılmadı.

DMSO grubuna 0.2 µl DMSO eklendi.

1 mM sodyum bütirat için; 1 M sodyum bütirat stok çözeltisinden 2 µl alınarak 2 mL'lik besiyerine eklendi. Eklenmeden önce besiyerinden 2 µl alınarak uzaklaştırıldı.

5 mM sodyum bütirat için; 1 M sodyum bütirat stok çözeltisinden 10 µl alınarak 2 mL'lik besiyerine eklendi. Eklenmeden önce besiyerinden 10 µl alınarak uzaklaştırıldı.

2 µM bütein için; 0.1 mM konsantrasyonundaki 2. Stoktan 40 µl alınarak 2 mL'lik besiyerine eklendi. Eklenmeden önce besiyerinden 40 µl alınarak uzaklaştırıldı.

10 µM bütein için; 0.1 mM konsantrasyonundaki 2. Stoktan 200 µl alınarak 2 mL'lik besiyerine eklendi. Eklenmeden önce besiyerinden 200 µl alınarak uzaklaştırıldı.

3.2.7. RNA İzolasyonu

1. Muamelenin yapılmasından 24 saat geçtikten sonra, 6 kuyucuklu plateden hücre büyüme ortamı uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk başına 1 mL Trizol eklendi. Bir gece +4 °C'de 1 gece inkübe edildi.
2. Ertesi gün, hücreler iyice homojenize olması için pipetaj yapılarak bir bir gece -20 °C'de bekletilmiş 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Bu şekilde homojenize edilen örneklerin nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrılması için oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi.
3. Ependorf tüpe 200 µl Kloroform eklendi. Tüp 15 kere elde kuvvetle alt üst edildi. Oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildikten sonra örnekler +4 °C'de 13.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi.
4. Karışım 3 faza ayrıldı. RNA yoğun olarak en üstteki sıvı fazdadır ve bu faz yaklaşık total hacmin yarısı kadardır. Tüp 45°'lik açı ile tutularak en üstteki sıvı fazdan 400-450 µl alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.
5. Ependorf tüpe 500 µl %100 izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1-2 kere ters yüz edildikten sonra 4-5 sn vortekslendi. Örnekler +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. RNA peleti kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Peletin üzerine 1 mL %75 etanol eklendi. %75 etanolün hazırlanması sırasında DEPC ile muamele edilmiş ultra saf su kullanıldı. RNA örneği kısa süreli vortekslendi ve +4 °C'de 5 dk 7500 rpm'de santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldı.
7. Pelet üzerinde ikinci kez 1 mL %75 etanol eklendi, kısa bir vorteksin ardından örnekler +4 °C'de 5 dk 7500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant

uzaklaştırıldı. RNA peleti 5-10 dk havada kurutuldu. Çözünürlüğünü kaybetmemesi için peletin tamamen kurummasına izin verilmedi.

8. Peletin miktarına göre 20-50 µl DEPC su eklendi. Örnekler, 55 °C’de 10 dk inkübe edildi. Kısmen çözülmüş RNA’nın konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} oranı nanodrop yardımıyla ölçüldü ve saflık oranları belirlendi.

3.2.8. cDNA Eldesi

RNA örneklerinden cDNA elde etmek için Applied Biosystems High- Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon kiti kullanıldı. Reaksiyon hazırlandığı süre boyunca buz üzerinde çalışıldı. 20 µL’lik reaksiyon için kullanılacak olan 2x Reverse-Transkripsiyon Master mix bileşenleri ve hacimleri Çizelge 3’de gösterilmiştir;

Çizelge 3. Reverse transkripsiyon için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim/Reaksiyon (µL)
10x Tampon	2.0
25x dNTP (100 mM)	0.8
10x RT Rastgele Primerler	2.0
MultiScribe Revers Transkriptaz	1.0
Nükleaz içermeyen su	4.2
Reaksiyon başına Toplam	10.0

Her bir grubun 20 µL reaksiyon başına eklenecek RNA miktarı 1,5 µg olacak şekilde hesaplanmıştır.

cDNA Revers Transkripsiyon PCR reaksiyonlarını hazırlamak için,

1. Her bir tüpe 10 µL 2x RT master mix eklendi.
2. Her bir tüpe 10 µL RNA örneği eklenerek birkaç kez pipetaj yapıldı.
3. Tüpler kapatıldı.
4. Tüpler, bileşenlerin tabana çökmesi ve hava kabarcıklarının elimine edilmesi için kısa bir santrifüj yapıldı.
5. Termal Cycler’a yükleme yapılana kadar tüpler buz üzerinde bekletildi.
6. Termal Cycler’da PCR koşulları Çizelge 4’deki gibi ayarlandı;

Çizelge 4. Revers transkripsiyon reaksiyonunun aşamaları

	1. aşama	2. aşama	3. aşama	4. aşama
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dk	120	5	∞

7. Reaksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı.
8. Reaksiyon tüpleri Termal Cyclus'a yüklendi ve reaksiyon başlatıldı.

3.2.9. Real-Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu

Real-Time PCR, amplifikasyon meydana geldikçe bir örnekte bulunan transkriptlerin miktarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Özel olarak bilgisayara bağlı bir termal cyclus ile görüntülenmesini gerektiren floresan bir boyanın kullanılması ile geleneksel PCR yönteminden farklılaşır. Genellikle ürünün miktarı, reportör boyanın verdiği floresan ışığa ile doğrudan ilişkilidir¹⁰⁷. Reaksiyon ilerledikçe ürün miktarı belirlendiği için, Real-Time PCR yönteminin hassasiyeti yüksektir. Floresan boya olarak birçok ajan kullanılabilir. Çalışmamızda SYBR green kullanarak Real-Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. SYBR green, baz çiftleri arasına girerek çift zincirli DNA'ya bağlanır. SYBR green reaksiyon karışımına eklendiğinde, termocycler döngüler boyunca ilerledikçe (denatürasyon, annealing ve uzama) ve yeni ampliconlar Taq polimerazlar tarafından sentezlendikçe, SYBR green boyası çift zincirli DNA'ya bağlanır. SYBR green DNA'ya bağlandığında ışığa verir. Işığa miktarı ölçülerek istenen genin ekspresyonu belirlenir¹⁰⁸.

Çalışmamızda BACE1₅₀₁, BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformları için Real-Time PCR Reaksiyonunda kullanılmak üzere Primer BLAST ve OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA technologies) programları yardımıyla dizayn edilen primer dizileri Çizelge 5'de belirtildiği gibidir^{109,110}:

Çizelge 5. Hedef genlere özgü dizayn edilen primer çiftleri

<i>GAPDH (House keeping gen- Kontrol geni)</i>	F: AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT
	R: CCCCACTTGATTTTGGAGGGA
<i>BACE1₅₀₁</i>	F: TCTTCATCAACGGCTCCAAC
	R: GAGAAGAGGTTGGGAACGTG
<i>BACE1₄₅₇</i>	F: GGAAGGGTGTGTATGTGCCC
	R: GAGTCGTCAGGCAGGTCG
<i>BACE1₄₃₂</i>	F: GGAAGGGTGTGTATGTGCCC
	R: CACCACAAAGCAGGTCGGT

F: Forward primer R: Reverse primer

96 kuyucuklu reaksiyon plate'inin her bir kuyucuğuna eklenen reaksiyon bileşenleri Çizelge 6'de belirtildiği gibidir:

Çizelge 6. SYBR green Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler

Sybr Green Master mix	12,5 µl
Su	9 µl
Forward primer	1,25 µl
Reverse primer	1,25 µl
Cdna	1 µl
Toplam	25 µl

96 kuyucuklu reaksiyon plate'ı hazırlandıktan sonra üstü optik yapışkan film ile hava kaparcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Plate, santrifüjde kısa bir döndürmenin ardından thermal cycler cihazına yerleştirildi. PCR koşulları Çizelge 7'deki gibi olacak şekilde ayarlandı:

Çizelge 7. Real-Time PCR reaksiyonunun aşamaları

<i> Holding Aşaması</i>	50 °C’de 2 dk
	95 °C’de 10 dk
<i> Döngü Aşaması (40 döngü)</i>	95 °C’de 15 sn
	60 °C’de 1 dk
<i> Melting Curve Aşaması</i>	95 °C’de 15 sn
	60 °C’de 1 dk
	95 °C’de 30 sn
	60 °C’de 15 sn

3.2.10. Real-Time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yapılan real time PCR sonucunda Ct değerleri elde edilir. Bu değerlerin analiz edilmesi ve böylece istenen genin görece kantifikasyonunu belirlemek için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılır. Ct değeri, reaksiyon eğrisi ile threshold çizgisinin kesiştiği noktaya karşılık gelir. Bu nokta, çözültide istenen nükleik asidin amplifiye olmaya başladığı ve floresan sinyalinin belirlendiği döngü sayısını gösterir. Daha düşük Ct değeri, örnek içinde istenen genin transkript miktarının yüksek olduğunu gösterirken, yüksek Ct değeri ise bu transkript miktarının düşük olduğunu gösterir¹¹¹. Her bir gen için deney ve kontrol gruplarından alınan cDNA örnekleri duplike olarak çalışılmıştır ve bu reaksiyonlardan elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak kullanılmıştır. Referans gen olarak da bir housekeeping gen olan GAPDH geni kullanılmıştır. BACE1₅₀₁, BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformlarına ait gen ekspresyon değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir¹¹²;

Deney Grubu $\Delta Ct = Ct \text{ Hedef gen} - Ct \text{ Referans gen}$

Kontrol grubu $\Delta Ct = Ct \text{ Hedef gen} - Ct \text{ Referans gen}$

$\Delta\Delta Ct = \text{Deney Grubu } \Delta Ct - \text{Kontrol grubu } \Delta Ct$

Ekspresyon değeri = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

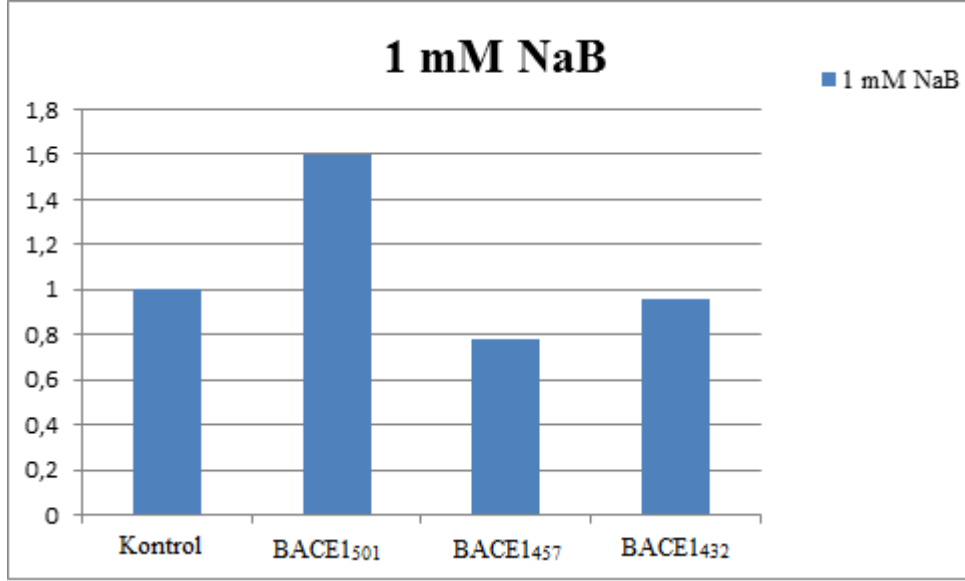
3.2.11. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler, SPSS 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır¹¹³. Tüm deney düzeneği 3 kez tekrar edilmiştir. Her bir BACE1 izoformu için sodyum bütirat ve büteinin dozları arasında anlamlı fark olup olmadığı, non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak tanımlanmıştır.

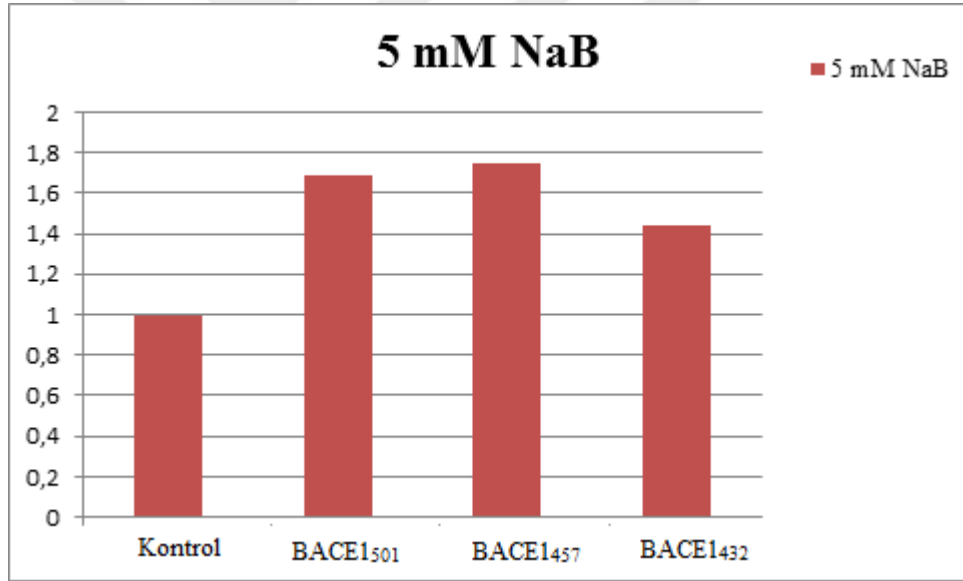


4. BULGULAR

Çalışmamızda SH SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. -80 °C’de saklanan hücreler, çözündürme işleminden sonra, yöntem kısmında belirtildiği şekilde çözündürülmüş ve ilgili besiyerinde büyütülmüştür. Ekimlerinden yaklaşık bir gün sonra, yeterli sıklığına ulaşan hücrelere pasajlama işlemi yapılarak 6 kuyucuklu bir plate ekilmiştir. Hücreler ekimleri yapılmadan önce sayılarak her bir kuyuya 250.000 hücre ekilmesi sağlanmıştır. Platelere %70 sıklığına ulaştığında -ekimden yaklaşık 1 gün sonra- her bir kuyuya sırasıyla 1mM ve 5 mM konsantrasyonlarda sodyum bütirat, ve 2 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda bütirin uygulaması yapılmıştır. Kontrol olarak %0.02 konsantrasyonda DMSO uygulaması yapılmış bir grup kullanılmıştır. Kontrol grubunda DMSO’nun kullanılması özellikle bütirin sadece DMSO’da çözünmesinden kaynaklıdır. Buradan hareketle, besiyerindeki DMSO oranı %0.02’yi geçmeyecek şekilde, Sodyum bütirat da, DMSO’da çözülmüştür. Tüm bu 6 gruptan, 1 gün süreyle muameleden sonra RNA izolasyonu yapılmış ve revers transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA’ya çevirilmiştir. BACE1 enziminin izoformları olan BACE1₅₀₁, BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ için dizayn edilen primerler kullanılarak, histon deasetilaz inhibitörleri olan sodyum bütirat ve bütirin bu izoformların miktarında meydana getirdikleri değişimler incelenmiştir. Bu incelemeler Sybr Green karışımının kullanıldığı Real-Time PCR reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR sonuçları $\Delta\Delta C_t$ yöntemi yardımıyla analiz edilmiştir. Bu deney düzeneği 3 kez tekrar edilmiştir. Sonuçların anlamlılığı, dağılım normal olmadığı için non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. 1mM ve 5 mM sodyum bütirat konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca 2 µM ve 10 µM bütirin konsantrasyonları arasında da anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0.05$)



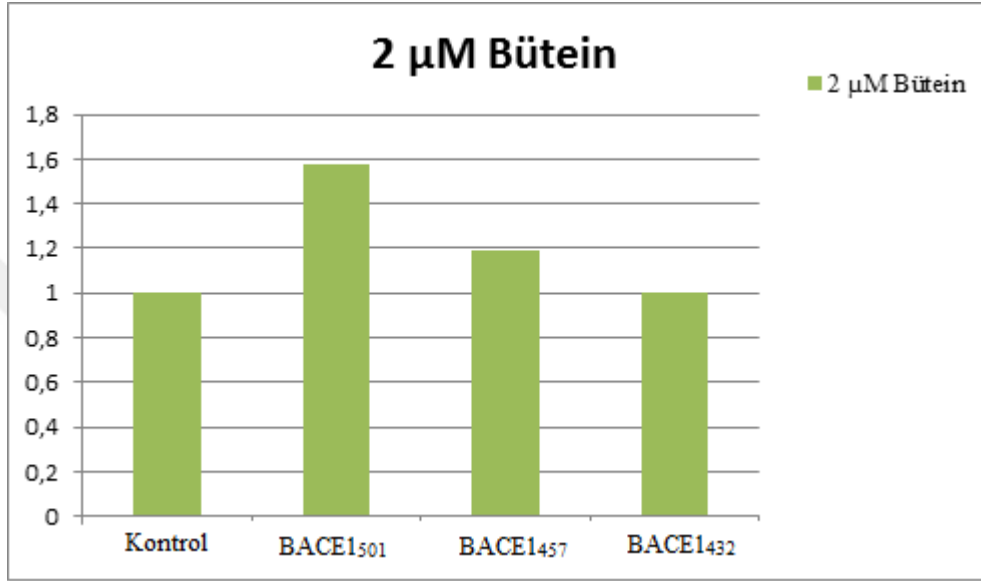
Şekil 18. 1 mM Sodyum Bütirat konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları



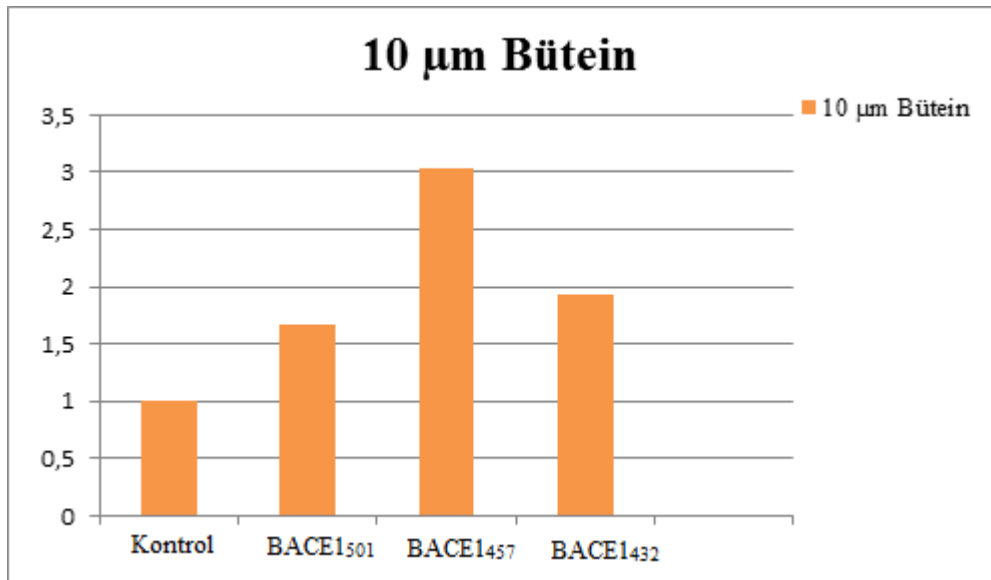
Şekil 19. 5 mM Sodyum Bütirat konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları

Sodyum bütiratın 1mM'lık düşük ve 5 mM'lık yüksek konsantrasyonları kontrole göre BACE1₅₀₁ izoformunun ekspresyonunu artırmıştır ve ayrıca sodyum bütiratın düşük ve yüksek konsantrasyonları BACE1₅₀₁ izoformunun ekspresyonunu eşit düzeyde artırmıştır. Sodyum bütiratın 1 mM'lık düşük dozu BACE1₄₅₇ izoformunun ekspresyonunu düşürmüştür, 5 mM'lık yüksek dozu BACE1₄₅₇ izoformunun ekspresyonunu artırmıştır. Aynı şekilde, Sodyum bütiratın 1 mM'lık düşük dozu

BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu görece az miktarda düşürürken, 5 mM'lık yüksek dozu kontrole göre BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu artırmıştır (Şekil 18, Şekil 19). Ancak yapılan istatistiksel analizde 1 mM ve 5 mM sodyum bütiratın BACE1₅₀₁, BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformlarının ekspresyon düzeylerinde meydana gelen bu farklılıkların anlamlı olmadığı belirlenmiştir. ($p>0.05$).



Şekil 20. 2 µM Bütein konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları



Şekil 21. 10 µM Bütein konsantrasyonunda BACE1 izoformlarının ortalama ekspresyonları

Büteinin 2 μ M'lık düşük ve 10 μ M'lık yüksek konsantrasyonları kontrole göre BACE1₅₀₁ izoformunun ekspresyonunu artırmıştır. Şaşırtıcı biçimde bu artış miktarları, Sodyum bütiratın 1 mM'lık düşük ve 5 mM'lık yüksek konsantrasyonunun BACE1₅₀₁ izoformunun üzerinde yapmış olduğu artış miktarı ile yaklaşık olarak aynıdır.

Büteinin 2 μ M'lık düşük konsantrasyonu kontrole göre BACE1₄₅₇ izoformunun ekspresyonunu bir miktar artırmıştır, ancak 10 μ M'lık yüksek konsantrasyonu BACE1₄₅₇ izoformunun ekspresyonunu 3 kat artırmıştır. Büteinin 2 μ M'lık düşük konsantrasyonu BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu değiştirmezken, 10 μ M'lık yüksek konsantrasyonu BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu yaklaşık 2 kat artırmıştır (Şekil 20, Şekil 21). Ancak yapılan istatistiksel analizde 2 μ M ve 10 μ M sodyum bütiratın BACE1₅₀₁, BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformlarının ekspresyon düzeylerinde meydana gelen bu farklılıkların anlamlı olmadığı belirlenmiştir. ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Dünya nüfusu hızla yaşlandıkça, bugün 35 milyon olan demanslı insan sayısının 2030 yılına kadar 65 milyona kadar artması beklenmektedir. AH multifaktöriyel bir hastalık olup, bilinen tek bir sebebi yoktur¹⁸. Bu hastalığın başlangıcı ve seyri ile ilişkili birçok risk faktörü olmakla birlikte AH'ye yakalanmada en büyük risk faktörü ileri yaştır¹¹⁴. AH'nin kesin bir tedavisi yoktur ve ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Mevcut ilaçlar, AH sonucu ortaya çıkan semptomları yatıştırmaya yöneliktir, hastalığın seyrini yavaşlatma ve durdurabilme özelliğine sahip değildir⁷⁶. En çok üstünde durulan tedavi stratejisi ise, beyinde A β birikimini azaltmayı hedef alan yaklaşımlardır. Bu yaklaşım, biriken A β 'nin hücre içinde apoptoza giden yolları etkilediğini ve dolayısıyla AH'nin patogenezi başlattığını ileri süren A β kaskat hipotezini esas alır⁶³. Bu nedenle APP işlenmesindeki temel rollerinin belirlenmesinden bu yana, sekretazlar AH'nin tedavisi için olası bir hedef haline gelmiştir. APP'nin kesiminin ilk basamağında rol oynayan A β oluşumuna sebep olan β -sekretaz ve A β oluşumuna sebep olmayan α -sekretaz arasında yarışma söz konusudur³³. Dolayısıyla β -sekretaz enzimi olan BACE1, AH tedavisi için önemli bir hedef olarak tanımlanmış olup bu enzimin inhibisyonu A β üretimini ilk aşamalarda engellemektedir. Ancak BACE1-/- (null allel) farelerde yapılan ileri davranış çalışmalarında farelerin mekânsal hafızalarında bozulmalar olduğu gösterilmiştir. Böylece BACE1'in normal hipokampal hafıza süreçleri için gerekli olduğuna dair kanıtlar artmıştır⁸⁵.

Kromatin modifikasyonları pre-mRNA kırılmasında önemli rol oynar¹³. HDAC ve HAT enzimleri, büyüme, gelişme ve hücre fonksiyonların sürdürülmesinde görevli birçok genin ekspresyonunun düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Bu epigenetik düzenlenmelerde meydana gelen gen ekspresyon değişimlerinin yaşla ilişkili hafıza bozuklukları ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir⁹⁹. HDAC enzimleri, histon asetilasyon seviyesini düzenleyerek hafıza, bilinç ve AH patolojisinde görevli bazı genlerin ekspresyonunu değiştirebilmektedir. Bu nedenle kompleks hastalıkların tedavisi konusunda yapılan çalışmalarda sodyum bütirat, vorinostat gibi birçok HDAC inhibitörünün kullanımı gündeme gelmiş olup bu konudaki çalışmalar halen devam etmektedir⁹³. Çalışmamızda kullandığımız HDAC inhibitörleri olan sodyum bütirat ve büteinin, birçok farklı yolak üzerinde geniş etkiler

sahip olduğu belirlenmiş olup birçok kanser hücre hattındaki uygulamalarda hücre çoğalmasını inhibe etme, apoptozu indükleme gibi etkilerinin yanı sıra model organizma çalışmalarında immün baskılama ve anti-inflamatuar özelliklerine de sahip olduğu belirlenmiştir^{96,102}. Ayrıca birçok çalışma HDAC inhibitörleri kullanarak histon asetilasyonunu hedeflemenin AH hayvan modellerine uygulandığında, bilişsel kusurları ve hafıza bozukluklarını iyileştirebildiği de gösterilmiştir⁹⁹. AH'nin patogenezinden birinci derece sorumlu olduğu düşünülen A β ile indüklenmiş model hayvanlarda, oluşan nörotoksisiteyi tersine çevirmede HDAC inhibitörlerinin kullandıkları alternatif birkaç yolak belirlenmiştir. Bunlardan birincisi, HDAC inhibitörlerinin A β tarafından indüklenmiş tau hiperfosforilasyonunu inhibe edebileceğini ileri sürerken, ikincisi ise HDAC inhibitörlerinin hafıza ve öğrenmede görevli genlerin ekspresyonunu düzenleyebileceğini ileri sürmektedir⁹⁴. HDAC inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmamız 2. görüş esas alınarak dizayn edilmiştir.

Sodyum bütirat gibi seçici olmayan HDAC inhibitörleri ile tedavinin yaşlanma, beyin hasarları ve nöronal kayıpların araştırılması için kullanılan hayvan modellerinde hafıza fonksiyonunu iyileştirdiği bulunmuştur⁹⁹. Ancak bu inhibitörlerin AH'nin tedavisinde kullanılmadan önce çözülmesi gereken bazı sorunlar vardır. Bu sorunlar, hangi HDAC sınıfının ve hangi epigenetik değişimlerin AH ile ilişkili olduğu ve dolayısıyla hangi seçici HDAC inhibitörünün AH'yi tedavi etmek için kullanılabileceğidir⁹⁴.

Bu doğrultuda çalışmamızın amacı, HDAC inhibitörlerinin AH'nin patogenezinde önemli rol oynayan BACE1 geninin alternatif kırılmasını etkileyip etkilemediğini araştırmaktır.

BACE1 geni, 9 ekzondan oluşmakla birlikte bu genin mRNA'sı alternatif kırılma geçirmektedir. BACE1 mRNA'sının sadece intronların çıkarılıp ekzonların birleştirildiği normal kırılma geçirmesiyle 501 aminoasit uzunluğunda aktif protein olan BACE1₅₀₁ oluşmaktadır. 3. ekzon içindeki alternatif 5' kırılma bölgesinin ve/veya 4. ekzonun alternatif 3' kırılma bölgesinin kullanıldığı BACE1 mRNA'sının alternatif kırılması ile bu enziminin 476, 457, 455, 432 ve 127 aminoasit uzunluğunda 5 farklı izoformu oluşmaktadır. Oluşan bu izoformların aktivitesinin tam uzunluktaki tehlikeli versiyon olan BACE1₅₀₁ ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu saptanmıştır. BACE1 geninin knock-out edilerek tamamen etkisinin yok edilmesinden ziyade,

aktivitesinin azaltılması ve bunun da alternatif kırılma sonucu oluşan izoformların miktarındaki artış ve tam uzunluktaki BACE1₅₀₁ versiyonunun miktarındaki azalış aracılığıyla meydana gelmesi, AH'nin tedavisi için bir çözüm olabileceği düşünülmektedir¹⁰. BACE1'in alternatif kırılmasını indükleyecek ilaçlar veya ajanlar üzerinde yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Birçok genin alternatif kırılmasının ise histon deasetilaz aktivitesi tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Bu genlerden en dikkat çeken ise, AH'nin patogenezinde rol oynayan tau'yu kodlayan genidir. HeLa hücre hattında yapılan bu çalışmaya göre, sodyum bütiratın hastalık patogenezinde artan izoformunun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir¹³. Ancak BACE1 geninin alternatif kırılmasını etkileyen mekanizmalar hakkında bir bulguya rastlanmamıştır. Ayrıca BACE1 geni içinde, bu genin alternatif kırılmasını artıran veya azaltan düzenleyici bölgeler kısmen belirlenmiştir¹¹. Ayrıca belirlenen bu bölgelere bağlanan alternatif kırılmada görev alan proteinler tanımlanmıştır. Guanince zengin dizilerin BACE1 geninin 3. Ekzonunda yerleşmiş olan 5' alternatif kırılma bölgesinin kullanımını düzenlemekte olduğu gösterilmiştir. Guanince zengin tekrarlar G-kuadrupleks yapısı oluşturarak kırılma mekanizmasında rol oynayan hnRNP H kompleksinin bu yapıya bağlanmasını sağlamaktadır. hnRNP H'nin bu G-kuadrupleks yapıya bağlanması AH'nin patogenezinde tehlikeli versiyon olan BACE1₅₀₁ izoformunun üretimini artırmaktadır. hnRNP H'nin knock-out edilmesi ile Aβ miktarının azaldığı gösterilmiştir⁹¹. Ancak bu kırılmada görev alan proteinlerin, BACE1 geni üzerindeki düzenleyici bölgelere bağlanmalarını artıracak veya azaltacak faktörler hakkında literatürde hiçbir bilgiye rastlanmamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak, bu çalışmada HDAC inhibitörlerin BACE1'in alternatif kırılmasını artırıp artırmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmanın asıl hedefi, kimyasal madde olarak sodyum bütirat ve büteinin farklı konsantrasyonlarının tehlikeli olan BACE1₅₀₁ ve masum olan BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformları üzerindeki etkisini araştırmaktır. Bu perspektifle bakıldığında, genel olarak sodyum bütiratın 1 mM'lık düşük konsantrasyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BACE1₅₀₁ ekspresyonunda belirgin bir değişiklik yapmazken, BACE1'in masum sayılabilecek BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ izoformlarında belirgin bir düşüş saptanmıştır. Oysa BACE1₅₀₁'in kullanılan sodyum bütirat aracılığıyla masum olan BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ gibi BACE1 izoformlarının ekspresyonlarını artırması ve bu şekilde artan

masum BACE1 versiyonlarının hastalıktan sorumlu BACE1₅₀₁ ile bir kompetisyon oluşturabileceğini kurgulamıştık. Ancak 1mM sodyum bütirat konsantrasyonunda düşmesini beklediğimiz BACE1₅₀₁ ekspresyonu artarken, artmasını beklediğimiz masum izoformlar olan BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂'nin azaldığını gözlemledik. Ancak tüm bu ekspresyon farklılıklarının istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda belirlenen sodyum bütiratın histon modifikasyonları üzerindeki yaptığı etkinin beklentimiz doğrultusunda etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda HDAC inhibitörü olarak kullandığımız sodyum bütirat ve bütinin AH'den birinci dereceden sorumlu izoformu ve iyi izoformlarının gen ifade düzeyleri bakımından beklentimiz yönde değiştirmedeği saptanmıştır.

Çalışmada etkisi araştırılan sodyum bütirat ve bütinin AH'den sorumlu BACE1₅₀₁'in etkisini azaltmaktan ziyade artırdığı belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle histon modifikasyonları üzerindeki etkisi son çalışmalarda rapor edilen sodyum bütiratın BACE1₅₀₁'in ekspresyonu beklenenin aksine artırmıştır. Bu durum, Alzheimer ve diğer kompleks hastalıklarda rol oynayan hedef genlerin ekspresyonunu istenildiği gibi değiştirmede önemli bir problemdir. AH patogeneğinde rol oynamayan BACE1₄₅₇'nin pankreas dokusunda oldukça yüksek derecede eksprese edildiği belirlenmiştir¹². Alternatif kırılma insan genlerinin %95'inde gerçekleşen bir mekanizmadır ve dokuya spesifik doğası gereği dokunun ihtiyaçları doğrultusunda farklı izoformları oluşturabilme yeteneğine sahiptir¹¹⁵. Dolayısıyla pankreasta BACE1₄₅₇ baskın izoform iken beyinde tam uzunluktaki zararlı versiyon olan BACE1₅₀₁ baskın izoform olması, beyin dokusunda enzimatik olarak daha aktif olan BACE1₅₀₁'in nörogenez ve bilişsel süreçlerde önemli görevleri olduğu ve pankreas dokusunda enzimatik aktivitesi daha düşük olan BACE1₄₅₇'nin bu dokudaki hücrelerin görevlerinin yerine getirilmesinde yeterli olduğunu düşündürmektedir¹². Çalışmamızın amacı, pankreas dokusunda BACE1₄₅₇'nin ekspresyonunun yüksek ve BACE1₅₀₁'in ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu BACE1 izoform paterninin beyin dokusunda indüklenip indüklenemeyeceğini araştırmaktır. Bu doğrultuda, çalışmada HDAC inhibitörleri olan sodyum bütirat ve bütinin bu etkiyi oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin nöron benzeri hücreler olduğu göz önünde bulundurulduğunda, BACE1₅₀₁'in ekspresyonunda görülen artışın miyelinleşme gibi

nöronal hücre süreçlerinde önemli rol oynayan güçlü 5' düzenleyici bölgedeki dominant etki ile meydana geldiği düşünülebilir⁴⁷.

Ayrıca farklı konsantrasyonlarda uygulanan büteinin de beklentimiz doğrultusunda etki oluşturmadığını belirledik. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda büteinin, tam uzunluktaki zararlı form olan BACE1₅₀₁ ekspresyonunu düşürürken, masum izoformlar olan BACE1₄₅₇ ve BACE1₄₃₂ ekspresyonlarını artırmasını amaçlamıştık. Ancak ne sodyum bütirat ne de büteinin değişen konsantrasyonlarının, bu etkiyi gerçekleştirmediğini belirledik.

Tüm bu veriler doğrultusunda, seçtiğimiz histon deasetilaz inhibitörleri olan sodyum bütirat ve bütein, BACE1 enziminin izoformları üzerinde beklenen etkiyi göstermemiştir. Şu anda histon asetilasyonu/deasetilasyonunu hedefleyen ilaçlar bazı kompleks hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu stratejinin dezavantajlarından biri, spesifik genleri hedeflemekten ziyade etkisini genom ölçeğinde göstermesidir, çünkü birçok histon deasetilaz inhibitörü seçici değildir¹¹⁶. HDAC inhibisyonunun memeli genlerinin yaklaşık %2'sinin ekspresyonunu değiştirdiği tahmin edilmektedir¹¹⁷. Böylece birçok genin ekspresyonu HDAC inhibitörleri tarafından etkilenmez. Çalışmamızda BACE1'in alternatif kırılma sonucu oluşan izoformlarda anlamlı değişim olmamasının, sodyum bütirat ve büteinin BACE1 mRNA'sının alternatif kırılmasında görev alan ilgili genleri de etkilememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma BACE1'in alternatif kırılmaya indüklenmesinin, seçici olmayan HDAC inhibitörlerinden ziyade hedefe özgü bir etki oluşturacak seçici ajanlar kullanılmasının daha iyi bir yaklaşım olacağını ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler 24 saat boyunca 1 mM ve 5 mM sodyum bütirat ve 2 μ M ve 10 μ M bütein ile muamele edilmiştir. Kontrol grubuna da DMSO uygulaması yapılmıştır. Her bir grup moleküler biyolojik açıdan değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. 1 mM ve 5 mM sodyum bütirat muamelesi BACE1₅₀₁ izoformunun ekspresyonu artırmıştır. 1 mM sodyum bütirat muamelesi BACE1₄₅₇ izoformunun ekspresyonunu azaltırken ve 5 mM sodyum bütirat BACE1₄₅₇ ekspresyonunu artırmıştır. Ayrıca 1 mM sodyum bütirat muamelesi BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu azaltırken ve 5 mM sodyum bütirat BACE1₄₃₂ ekspresyonunu artırmıştır. Ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$).
2. 2 μ M ve 10 μ M bütein BACE1₅₀₁ izoformunun ekspresyonu artırmıştır. 2 μ M ve 10 μ M bütein BACE1₄₅₇ izoformunun ekspresyonunu artırmıştır. 2 μ M bütein BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu değiştirmezken 10 μ M bütein BACE1₄₃₂ izoformunun ekspresyonunu artırmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$).

Elde edilen sonuçların, A β miktarı yüksek Alzheimer modellerinde daha detaylı karşılaştırılması yapılabilir. Bu Alzheimer modelleri, transgenik fareler, transgenik farelerin beyinlerden elde edilen primer hücre kültürleri veya transfeksiyon ile ekstra kopya APP geninin hücreye eklendiği hücre hatları olabilir. Alzheimer hastalığının tedavisi için, BACE1₅₀₁ uzunluktaki formundan ziyade, alternatif kırılması sonucu oluşan izoformlarının hedeflenmesi, kabul gören tedavi yaklaşımlarından biridir. Ancak bu çalışmadan ortaya çıkarılan sonuç şu ki; bu izoformların hedeflenmesi için HDAC inhibitörlerinin kullanılmasından ziyade, bu izoformların spesifik olarak hedeflenmesi daha mantıklı bir yaklaşım olacaktır. Bu sebeple hem Alzheimer modelleri ile çalışmak hem de BACE1 izoformlarının ekspresyonunun artırılması için hedefe yönelik kimyasalların ve\ veya yaklaşımların kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J.** Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract*, **2015**;24(1):1-10.
2. **Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB.** Alzheimer's disease: a review of recent developments. *Ann Afr Med*, **2011**;10(2):73-9.
3. **Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG.** Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord*, **2013**;6(1):19-33.
4. **Morrison AS, Lyketsos C.** The Pathophysiology of Alzheimer's Disease and Directions in Treatment. *Advanced Studies in Nursing*, **2005**;3(8):256-270.
5. **Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M.** An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*, **2010**;12(1):1-12.
6. **Marcinkiewicz M, Seidah NG.** Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem*, **2000**;75(5):2133-43.
7. **Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M.** Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, **1999**;286(5440):735-41.
8. **Bodendorf U, Fischer F, Bodian D, Multhaup G, Paganetti P.** A splice variant of beta-secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, **2001**;276(15):12019-23.
9. **Mowrer KR, Wolfe MS.** Promotion of BACE1 mRNA alternative splicing reduces amyloid β -peptide production. *The Journal of Biological Chemistry*, **2008**;283(27):18694-701.
10. **Holsinger RMD, Goense N, Bohorquez J, Strappe P.** Splice variant of the Alzheimer's disease beta-secretase, BACE1. *Neurogenetics*, **2013**;14(1):1-9.
11. **Mowrer KR, Wolfe MS.** Identification of a cis-acting element involved in the regulation of BACE1 mRNA alternative splicing. *J Neurochem*, **2009**;109(4):1008-16.
12. **Simmons D.** Epigenetic Influences and Disease. *Nature Education*, **2008**; 1(1):6.
13. **Hnilicová J, Hozeifi S, Dušková E, Icha J, Tománková T, Staněk D.** Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS One*, **2011**;6(2):e16727.
14. **Park JK, Cho CH, Ramachandran S, Shin SJ, Kwon SH, Kwon SY, Cha SD.** Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by phosphatidylinositol 3-kinase inhibition in the human cervical cancer cell-line. *Cancer Res Treat*, **2006**;38(2):112-7.
15. **Cho SG, Woo SM, Ko SG.** Butein suppresses breast cancer growth by reducing a production of intracellular reactive oxygen species. *J Exp Clin Cancer Res*, **2014**;33:51.
16. **Altın M.** Alzheimer tipi demans hastalarına bakım verenlerde tükenmişlik ve anksiyete. *Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi*, **2006**.

17. **Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E.** Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* **2009**;11(2):111-28.
18. **Mayeux R, Stern Y.** Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2012**;2(8).
19. **Alzheimer A.**Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat,* **1907**; 64: 146-8.
20. **Götz J, Ittner LM.** Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci,* **2008**;9(7):532-44.
21. Stages of Alzheimer Disease Erişim (http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp) 2017. Erişim Tarihi: 21.07.2017.
22. **Morrison AS, Lyketsos C.** The pathophysiology of Alzheimer's disease and directions in treatment. *Advanced Studies in Nursing,* 2005;3(8):256-270.
23. More Brain Changes. Erişim: (http://www.alz.org/braintour/healthy_vs_alzheimers.asp) 2017. Erişim Tarihi: 21.07.2017.
24. **Cacabelos R, Fernandez-Novoa L, Lombardi V, Kubota Y, Takeda M.** Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging. *Methods Find Exp Clin Pharmacol,* **2005**;27 Suppl A:1-573.
25. Alzheimer's and hallmarks of the disease. Erişim: (<http://dementiatoday.com/the-hallmarks-of-alzheimers>) 2017. Erişim Tarihi: 15.06.2017.
26. **Kok E.** Alzheimer's disease neuropathology and inflammation, a genetic and immunohistochemical study. Graduate thesis, University of Tampere, Finland, 2011.
27. **Zhang C.** Natural compounds that modulate BACE1-processing of amyloid-beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Discov Med,* **2012**;14(76):189-97.
28. **Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H.** Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem,* **2012**;120 Suppl 1:9-21.
29. **Gu L, Guo Z.** Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem,* **2013**;126(3):305-11.
30. **Crews L, Masliah E.** Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet,* **2010**;19(R1):R12-20.
31. APP processing, formation of A β , and the amyloid cascade hypothesis. Erişim: (<http://www.neurochem.su.se/english/research/2.14201/kerstin-iverfeldt-professor-1.54812/amyloid-cascade-1.54815>) 2017. Erişim Tarihi: 21.07.2017.
32. **Lichtenthaler SF, Haass C.** Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest,* **2004**;113(10):1384-7.
33. **Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ.** Alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun,* **2002**;299(3):373-6.
34. **Lichtenthaler SF.** α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem.* **2011**;116(1):10-21.
35. **Alzheimer A.** Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Ges Neurol Psychiatr,* **1911**; 4: 356-385.

36. **Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis*, **2013**;33 Suppl 1:S123-39.
37. Oddo S. The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, **2008**;12(2): 363–373.
38. **Overk CR, Masliah E.** Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem Pharmacol*, **2014** 15;88(4):508-16.
39. **Cummings JL, Vinters HV, Jenaro F.** *The neuropsychiatry of Alzheimer's disease and related dementias*. 1nd Ed., London: CRC Press Taylor and Francis Group, **2003**:59.
40. **Öztürk GB, Karan MA.** Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, **2009**;22(3):36-45.
41. **Athan ES, Williamson J, Ciappa A, Santana V, Romas SN, Lee JH, Rondon H, Lantigua RA, Medrano M, Torres M, Arawaka S, Rogaeva E, Song YQ, Sato C, Kawarai T, Fafel KC, Boss MA, Seltzer WK, Stern Y, St George-Hyslop P, Tycko B, Mayeux R.** A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. *JAMA*, **2001**;286(18):2257-63.
42. APP mutations. Erişim: (<http://www.alzheimer-adna.com/APP/APPmutations.html>) 2017. Erişim Tarihi: 02.08.2017.
43. **Barage SH, Sonawane KD.** Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. **2015** Aug;52:1-18.
44. **Karaduman T.** Alzheimer hastalarında PSEN1 geni mutasyonu taraması ve APOE genotiplendirmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2014.
45. **Tanzi RE.** The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2012**;2(10).
46. Understanding genetics and Alzheimer's disease. Erişim: (http://www.alzheimer.ca/~media/Files/national/Research/understanding_genetics_e.pdf) 2017. Erişim Tarihi: 17.06.2017.
47. **Cole SL, Vassar R.** The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Curr Genomics*, **2007**;8(8):509-30.
48. **Liu CC1, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G.** Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*, **2013**;9(2):106-18.
49. **Mahley, R.W.** Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, **1988**;240, 622–630.
50. **Karch CM, Goate AM.** Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*, **2015**;77(1):43-51.
51. **Barber RC.** The Genetics of Alzheimer's Disease. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*, **2012**; 1-14.
52. **Saito S, Ihara M.** Interaction between cerebrovascular disease and Alzheimer pathology. *Curr Opin Psychiatry*, **2016**;29(2):168-73.
53. **Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S.** Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**;100(7):4162-7.

54. **Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E.** Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci*, **2009**;11(2):111-28.
55. **Merchant C, Tang MX, Albert S, Manly, Stern Y, Mayeux R.** The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease. *Neurology*. **1999**;52:1408–1412.
56. **Koponen S1, Taiminen T, Kairisto V, Portin R, Isoniemi H, Hinkka S, Tenovuo O.** APOE-epsilon4 predicts dementia but not other psychiatric disorders after traumatic brain injury. *Neurology*, **2004**;63(4):749-50.
57. **Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A.** Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **2003**;74(7):857-62.
58. **Qiu C., Bäckman L., Winblad B., Agüero-Torres H., Fratiglioni L.** The influence of education on clinically diagnosed dementia: incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch Neurol*, **2001**;58:2034–2039.
59. **Ngandu T, von Strauss E, Helkala EL, Winblad B, Nissinen A, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M.** Education and dementia: what lies behind the association? *Neurology*. **2007**;69:1442–1450.
60. **Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W.** Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med*, **2006**;144:73–81.
61. **Rovio S, Kåreholt I, Helkala EL, Viitanen M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M.** Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, **2005**;4:705–711.
62. **Contestabile, A..** The history of the cholinergic hypothesis. *Behav. Brain Res*, **2011**; 221: 334–340.
63. **García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J.** Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and β -Amyloid. *Front Mol Neurosci*. **2011**;4:22.
64. **Karran E, Mercken M, De Strooper B.** The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **2011**;10(9):698-712.
65. **Vassar RI.** BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, **2014**;6(9):89.
66. **Gooch MD, Stennett DJ.** Molecular basis of Alzheimer's disease. *Am J Health Syst Pharm*, **1996**;53(13):1545-57.
67. **Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA.** Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*, **2004**;10 Suppl:S2-9.
68. **Butterfield DA.** Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*, **2002**;36(12):1307-13.
69. **Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **2000**;21(3):383-421.

70. **Reiss AB.** Cholesterol and apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, **2005**;20(2):91-6.
71. **Launer LJ, White LR, Petrovitch, H, Ross GW, Curb JD.** Cholesterol and neuropathologic markers of AD: A population-based autopsy study. *Neurology*, **2001**;57:1447-1452.
72. **Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K, Ojala J.** ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*, **2009**;6:41.
73. **Saido T, Leissring MA.** Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2012**;2(6):a006379.
74. **Wang H, Saunders AJ.** The role of ubiquitin-proteasome in the metabolism of amyloid precursor protein (APP): implications for novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Discov Med*, **2014**;18(97):41-50.
75. **Korolev IO.** Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 2014;04(Fall):24-33.
76. **Özkay ÜD, Öztürk Y, Can ÖD.** Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, **2011**;18(1):35-42.
77. **Sadigh-Eteghad S, Majdi A, Farhoudi M1, Talebi M, Mahmoudi J.** Different patterns of brain activation in normal aging and Alzheimer's disease from cognitional sight: meta analysis using activation likelihood estimation. *J Neurol Sci*, 2014;343(1-2):159-66.
78. Current Alzheimer's disease. Erişim: (http://www.alz.org/research/science/alzheimers_disease_treatments.asp) 2017. Erişim Tarihi: 17.06.2017.
79. Medication for memory loss. Erişim: (http://www.alz.org/alzheimers_disease_standard_prescriptions.asp) 2017. Erişim Tarihi: 17.06.2017.
80. FDA-approved treatments for Alzheimer's disease. Erişim: (http://www.alz.org/national/documents/topicsheet_treatments.pdf) 2017. Erişim Tarihi: 17.06.2017.
81. **Zhang X, Song W.** The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation. *Alzheimers Res Ther*, **2013**;5(5):46.
82. **Shimizu H, Tosaki A, Kaneko K, Hisano T, Sakurai T, Nukina N.** Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production. *Mol Cell Bio.*, **2008**;28(11):3663-71.
83. Going it alone—APP, BACE1 take distinct routes to endosome. Erişim: (<http://www.alzforum.org/news/research-news/going-it-alone-app-bace1-take-distinct-routes-endosome>) 2017. Erişim Tarihi: 17.06.2017.
84. **Ahmed RR, Holler CJ, Webb RL, Li F, Beckett TL, Murphy MP.** BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **2010**;112(4):1045-53.
85. **Cole SL, Vassar R.** The Alzheimer Disease β -secretase enzyme, bace1. *Molecular Neurodegeneration*, **2007**; 2: 22.
86. BACE1 gene. Erişim: (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=bace1>) 2017. Erişim Tarihi: 18.06.2017.

87. **Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, John V.** Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, **1999**;402(6761):537–540.
88. **Eehalt R, Michel B, Tonelli D, Zacchetti D, Simons K, Keller P.** Splice variants of the β -site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**;293:30–37
89. **Tanahashi H, Tabira T.** Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neurosci Lett*, **2001**;307(1):9–12.
90. **Tanahashi H, Tabira T.** A novel beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) isoform regulated by nonsense-mediated mRNA decay and proteasome-dependent degradation. *Neurosci Lett*, **2007**;428(2–3):103–108.
91. **Fisette JF, Montagna DR, Mihailescu MR, Wolfe MS.** A G-rich element forms a G-quadruplex and regulates BACE1 mRNA alternative splicing. *J Neurochem*, **2012**;121(5):763-73.
92. **Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA.** Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res*, **2007**;5(10):981-9.
93. **Kim HJ, Bae SC.** Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*, **2011**;3(2):166-79.
94. **Xu K, Dai XL, Huang HC, Jiang ZF.** Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*, **2011**;2011:143269.
95. **Zhuang YQ, Li JY, Chen ZX, Wang XZ.** Effects of sodium butyrate on proliferation and differentiation of human gastric carcinoma cell line AGS. *Ai Zheng*, **2008**;27(8):828-34.
96. **Paskova L, Trtkova KS, Fialova B, Benedikova A, Langova K, Kolar Z.** Different Effect of Sodium Butyrate on Cancer and Normal Prostate Cells. *Toxicol In Vitro*, **2013**;27 (5), 1489-1495.
97. Sodium Butyrate. Erişim: (https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_butyrate) 2017. Erişim Tarihi: 17.01.2017.
98. **Mu D, Gao Z, Guo H, Zhou G, Sun B.** Sodium butyrate induces growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer DU145 cells by up-regulation of the expression of annexin A1. *PLoS One*, **2013**;8(9):e74922.
99. **Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, Sananbenesi F, Fischer A.** Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J Alzheimers Dis*, **2011**;26(1):187-97.
100. **Wang Y1, Chan FL, Chen S, Leung LK.** The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sci*, **2005**;77(1):39-51.
101. Butein. Erişim: (<https://en.wikipedia.org/wiki/Butein>) 2017 Erişim Tarihi: 17.01.2017.
102. **Yang PY, Hu DN, Lin IC, Liu FS.** Butein Shows Cytotoxic Effects and Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. *Am J Chin Med*. **2015**;43(4):769-82.
103. **Orlikova B, Schnekenburger M, Zloh M, Golais F, Diederich M, Tasmemir D.** Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF- κ B. *Oncol Rep*, **2012**;28(3):797-805.

104. SH SY5Y cell line. Erişim: (https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx?geo_country=tr#characteristics) 2017. Erişim Tarihi: 23.07.2017
105. **Carolindah MN, Rosli R, Adam A, Nordin N.** An Overview Of In Vitro Research Models For Alzheimer's Disease (AD). *Regenerative Research*, 2(2) 2013 8-13.
106. **Seçme M.** Oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında çeşitli hücreyel yolaklardaki etkisinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, 2014.
107. Introduction to SYBR Green Real Time PCR. Erişim: (<http://www.sabiosciences.com/newsletter/validating.pdf>) 2017. Erişim Tarihi: 23.07.2017.
108. **Thornton B, Basu C.** Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2011;39(2):145-54.
109. Oligoanalyzer tool. Erişim: (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) 2015. Erişim Tarihi: 10.12.2015.
110. Primer designing tool. Erişim: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 2015. Erişim Tarihi: 10.12.2015
111. What is the Ct value? Erişim: (<http://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>) 2017. Erişim Tarihi: 23.07.2017.
112. 4 easy steps to analyze your qPCR data using double delta Ct analysis. Erişim: (<http://bitesizebio.com/24894/4-easy-steps-to-analyze-your-qpcr-data-using-double-delta-ct-analysis/>) 2017 Erişim Tarihi: 23.07.2017.
113. SPSS Inc. SPSS for Windows. Version 22.0, Chicago: SPSS Inc., 2013.
114. Causes and risk factors. Erişim: (<http://m.alz.org/causes-and-risk-factors.asp>) 2017. Erişim Tarihi: 02.08.2017
115. **Wang Y, Liu J, Huang B, Xu Y, Li J, Huang L, Lin J, Zhang J, Min Qh, Yang W, Wang X.** Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed Rep*, 2015; 3(2): 152–158.
116. **Ceccacci E, Minucci S.** Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. *Br J Cancer*, 2016;114(6):605-11.
117. HDAC inhibitor. Erişim: (http://en.wikipedia.org/wiki/Histone_deacetylase_inhibitor) 2017. Erişim Tarihi: 10.01.2017.

EKLER

Ek-1 Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
46	2 Ekim 2015

KARAR NO 10- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, H. Ümit Lüleyap yönetiminde, Doktora Öğrencisi Gülşah Evyapan'ın katkılarıyla, Araş. Gör. Gülsevinç Ay tarafından yürütülmesi öngörülen, "SH SY5Y Alzheimer Model Hücre Hattında Büttein ve Sodyum Bütiratın BACE1 Enziminin Alternatif Kırılmasına Etkisinin Belirlenmesi" in Belirlenmesi" başlıklı proje araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Eskişehir’de doğdu. İlk ve Ortaöğrenimini Eskişehir’de tamamladı. 2009 yılında Eskişehir H. Ahmet Kanatlı Anadolu Lisesi’nde lise eğitimini tamamladı. 2013 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

