

**DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ RG108
VE HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜ
TRİKOSTATİN A'NIN NÖRİT GELİŞİMİNDE
EPİGENETİK ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ecz. Elif Kaya

Yüksek Lisans Tezi

**DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ
RG108 VE HİSTON DEASETİLAZ
İNHİBİTÖRÜ TRİKOSTATİN A’NIN NÖRİT
GELİŞİMİNDE EPİGENETİK
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Ecz. Elif Kaya

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

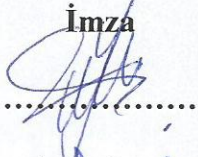
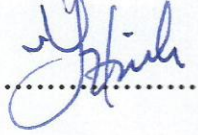
Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Ağustos 2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Miriř DİKMEN



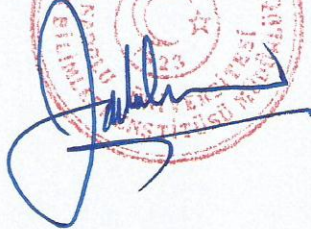
Jüri ve Enstitü Onayı

Elif Kaya'nın "DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ RG108 VE HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ TRİKOSTATİN A'NIN NÖRİT GELİŞİMİNDE EPİGENETİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI" başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 15.08.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç. Dr. Miriř DİKMEN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12.08.2014 tarih ve22..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Elif Kaya
Doğum tarihi ve yer : 09.08.1989, ESKİŞEHİR
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim Adresi : Deliklitaş Mah. Aybey Sk. 15/3 Eskişehir
e-Posta : elif_kaya@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim : Özel Çağfen İlköğretim Okulu, 2000
Ortaokul : Özel Çağfen İlköğretim Okulu, 2003
Lise : Eskişehir Kılıçoğlu Anadolu Lisesi, 2007
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2012
Yabancı Dil : İngilizce, İtalyanca

Mesleki Deneyim

Yayınlar

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

E. Kaya, M. Dikmen, Y. Öztürk. Comparison Of The Cytotoxic Effects Of RG108 (A DNA methyltransferase inhibitor) And Trichostatin A (A Histone Deacetylase İnhibitor) On PC-12 Adh Cells. **Drug Discovery and Therapy World Congress 2014 (DDTWC 2014) Boston, USA, June 16-19, 2014.**

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

E. Kaya, M. Dikmen, S. Engür. “A549 İnsan Akciğer Kanseri Hücrelerinde TrikoSTATİN A ve RG108’in Antiproliferatif Etkilerinin Karşılaştırılması”, **22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.**

Bilimsel Etkinlikler

- 1.** 22. Ulusal Biyoloji Kongresi (23-27 Haziran 2014), Eskişehir, Türkiye.
- 2.** Drug Discovery and Therapy World Congress 2014 (DDTWC 2014), 16-19 Haziran 2014, Boston, ABD.
- 3.** European Pharmaceutical Students Association (EPSA) Summer University, Shaping Future Pharmacists-Optimizing Care, 18-24 Haziran 2012, Brasov, Romanya.
- 4.** European Pharmaceutical Students Association (EPSA) Annual Congress, The Future Of Pharmacy: New Therapies, Medicines And Solutions, 23-28 Nisan 2012, İstanbul, Türkiye.
- 5.** European Pharmaceutical Students Association (EPSA) Annual Congress, Pharmacovigilance, 11-17 Nisan 2011, Lizbon, Portekiz.

ÖNSÖZ

Bana moleküler farmakolojiyi ve hücre kültürünü öğreten, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yardımcı olan ve yol gösteren, hem akademik hem de sosyal gelişimime fikirleriyle değer katan, destek olan, önümde yeni ufuklar açan ve her zaman daha iyisini başarmamı sağlamak için beni yönlendiren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Miriř DİKMEN'e

Farmakolojiyi bana öğreten ve sevdiren, lisansüstü eğitimim boyunca her konuda destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e ve Farmakoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Süleyman AYDIN'a, Doç. Dr. Özgür Devrim CAN'a, Doç. Dr. Rana ARSLAN'a, Yrd. Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN'e ve Yrd. Doç. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY'a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem akademik hem de hayata dair tecrübeleriyle bana yol gösteren ve destek olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Zerrin KAHRAMAN CANTÜRK'e;

Tez çalışmamın her aşamasında benim kadar emeği olan, tecrübelerini benimle paylaşan ve hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, canım arkadaşım Biyolog Selin ENGÜR'e;

Lisans eğitiminden bugünlere beraber geldiğim ve aynı tecrübeleri yaşamaya devam ettiğim, her zaman bana destek ve yardımcı olan canım arkadaşım Ecz. Merve BAYSAL'a;

Yüksek lisans eğitimime dair en eğlenceli anılarda yer alan, zor zamanlarda ise her zaman yanımda olan sevgili oda arkadaşlarım Umut İrfan ÜÇEL ve Harika AYDIN'a;

Yüksek lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve çok sevdiğim sevgili arkadaşlarım Buket DEMİRTAŞ YALMAN, Sema KOYUTÜRK, Murat KOZANLI, Şennur GÖRGÜLÜ, Nazlı TURAN ve Feyza ALYU'ya;

Hayatım boyunca bana her zaman destek olan, sonsuz sevgilerini, sabırlarını, emeklerini ve bütün imkanlarını koşulsuz sunan, sevgili ailem Fatma ve Selçuk KAYA'ya;

Sonsuz teşekkür ederim.

Elif KAYA

Ağustos, 2014

**DNA METİLTRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ RG108 VE HİSTON
DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜ TRIKOSTATİN A’NIN NÖRİT
GELİŞİMİNDE EPİGENETİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ÖZET

Nörodejeneratif hastalıkların nöropatolojisi genel olarak, beynin spesifik bölgelerindeki spesifik nöronların kaybı veya atrofisi ile ilişkilendirilir. Rejenerasyonun olmayışı; hasarlı nöronların ölümü, rejenerasyon kapasitesindeki düşüş, büyümeyi destekleyen nörotrofik faktörlerin eksikliği, rejenerasyon ve büyümeyi engelleyici santral sinir sistemi ortamı gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. Nörojenezin başlıca morfolojik karakteristiği, akson uzaması ve dendrit dallanmasının takip ettiği nörit gelişimidir. Nöritojenik maddeler, nöronal hücrelerdeki nörit gelişimini stimüle edebilme yetenekleri nedeniyle nöronal hasarların tedavisinde umut vadetmektedir. Susturulmuş genlerin aktivasyonu, kromatinin yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyon gibi hücresel mekanizmalar üzerine etkili ve küçük molekül epigenetik ilaçların, nörotrofik faktörler ile kombinasyonu, nöronal hasarlarda alternatif bir yaklaşımdır.

Bu çalışmada, iki yeni epigenetik ilaç olan, bir histon deasetilaz inhibitörü Trikostatin A ve bir DNA metiltransferaz inhibitörü RG108’in PC-12 Adh hücre hattı üzerindeki nöronal farklılaşma ve nörit gelişimi üzerine etkilerini karşılaştırmak amaçlanmıştır. İki ilacın sitotoksitesisi MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Hücre farklılaşması, migrasyon ve invazyon analizleri için Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) kullanılmıştır. Hücre migrasyonu verileri morfolojik olarak da test edilmiştir. Nörit gelişimi sonrasında hücrelerdeki Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) miktarı, ELIZA tekniğiyle ölçülmüştür. Son olarak, nörit gelişimi immüno floresan boyalar yardımıyla fotoğraflanmış ve PC-12 Adh hücre hattı nörit analizi yapılmıştır.

Deney sonuçlarına göre, hem Trikostatin A hem de RG108’in, sinir büyüme faktörü ile kombine halde, PC-12 Adh hücre hattında nöronal farklılaşma ve nörit gelişimini indükleyici etkileri bulunmuştur. Hücre farklılaşması, migrasyon, invazyon ve nörit gelişimi üzerine Trikostatin A, RG108’den daha etkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: nöroplastisite, nörit gelişimi, epigenetik, Trikostatin A, RG108

**COMPARISON OF THE EPIGENETIC EFFECTS ON NEURITE
OUTGROWTH OF A HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR
TRICHOSTATIN A AND A DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITOR
RG108**

ABSTRACT

Neuropathological characteristics of neurodegenerative disorders are atrophy or loss of specific neurons in the specific brain areas. The lack of regeneration is due to a combination of factors: death of injured neurons, reduced capacity of regeneration, lack of necessary trophic molecules to support growth, and the presence of an environment hostile for any growth line. Neuritogenic substances hold the promise of therapeutic efficacy in the treatment of neuronal injuries by the virtue of their ability to stimulate outgrowth of neurites from neuronal cells. Despite of their positive effects, administration of neurotrophic factors also has some disadvantages like, negligible entry through the blood brain barrier and destabilization by peripheral peptidases. Small-molecule products like epigenetic drugs, which can activate silenced genes, regulate chromatin remodelling and transcription, for eliciting neuritogenic activity or in combination with neurotrophic substances is currently been focused as an alternative approach.

In this study, we aimed to compare the neurotrophic effects of two new epigenetic drugs on PC-12 Adh cell line, which are a histone deacetylase inhibitor Trichostatin A and a DNA methyltransferase inhibitor RG108. Cytotoxic effects of this drugs were determined by MTT assay. Cell differentiation, migration and invasion analysis were evaluated by real time cell analysis (RTCA DP) system according to changing in cell index values. Migration was also corroborated with morphological analysis. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) amounts during neurite outgrowth was measured by ELISA technique. Finally, neurite outgrowth was observed with immunofluorescence staining and determined by neurite outgrowth analysis on PC-12 Adh cell line.

Our results show that both Trichostatin A and RG108 have inducing effects on neuronal differentiation and neurite outgrowth in PC-12 Adh cell line in a combination with nerve growth factor. We found Trichostatin A more effective than RG108 on inducing cell differentiation, migration, invasion and neurite outgrowth.

Keywords: neuroplasticity, neurite outgrowth, epigenetics, Trichostatin A, RG108

İÇİNDEKİLER	SAYFA
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
SİNİR SİSTEMİ	2
Santral Sinir Sistemi	3
<i>Beyin (Cerebrum)</i>	3
<i>Medulla Spinalis (omurilik)</i>	3
Periferik sinir sistemi	3
<i>Otonom Sinir Sistemi</i>	4
<i>Sempatik Sinir Sistemi</i>	4
<i>Parasempatik Sinir Sistemi</i>	4
Santral Sinir Sistemi Hücreleri	5
Nörodejeneratif Hastalıklar	6
<i>Nörodejeneratif Hastalıkların Patofizyolojisi</i>	7
NÖRİT GELİŞİMİ	10
Nörit Gelişimini Kontrol Eden Faktörler	12
<i>Pozitif Sinyaller</i>	13
<i>Ekstraselüler Matriks İle İlişkili Nörit Promotörleri</i>	13
<i>Nörotrofik Faktörler</i>	13
<i>Hücre Adezyon Molekülleri (CAMs)</i>	14
<i>İnhibitör Sinyaller</i>	14
<i>Nöronal Gelişime Klavuzluk Eden Moleküller</i>	15
Nörit Gelişiminde Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)'nin Rolü	15

EPIGENETİK	16
Epigenetik Mekanizmalar	17
<i>DNA Metilasyonu</i>	17
<i>DNA Metiltransferazlar</i>	18
<i>DNA Metiltransferaz İnhibitörleri</i>	19
Nükleozid DNMT İnhibitörleri	19
Nükleozid Olmayan DNMT İnhibitörleri	21
RG108 (N-ftalil-l-triptofan)	22
<i>Histon Modifikasyonları</i>	23
<i>Histon Asetilasyonu</i>	24
<i>Histon Deasetilaz Enzimleri</i>	24
<i>Histon Deasetilaz Enzimlerinin Sınıflandırılması</i>	26
<i>Histon Deasetilaz İnhibitörleri</i>	28
Trikostatin A	30
Trikostatin A'nın Nöritojenik Etki Mekanizması	30
<i>Histon Fosforilasyonu</i>	33
<i>Histon Metilasyonu</i>	33
<i>ADP Ribozilasyonu</i>	34
<i>Ubikitinasyon ve Sumoylasyon</i>	34
<i>RNA İle İndüklenen Sessizleşme</i>	34
GEREÇLER	36
Kullanılan Kimyasal Maddeler, İlaçlar ve Malzemeler	36
Kullanılan Cihazlar	37

YÖNTEMLER	38
Deneyleerde Kullanılan PC-12 Adh Hücre Hattı ve Özellikleri	38
Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	38
<i>Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu</i>	38
<i>Trikostatin A, RG108 ve NGF Konsantrasyonlarının Hazırlanması</i>	38
Hücre Kültürü Çalışmaları	39
<i>Hücre Sayımları</i>	39
<i>MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Belirlenmesi</i>	39
<i>Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) Hücre Farklılaşma, İnvazyon ve Migrasyon Analizleri</i>	41
<i>Hücre Farklılaşması Yöntemi</i>	41
<i>İnvazyon Yöntemi</i>	43
<i>Migrasyon Yöntemi</i>	44
<i>Migrasyonun Morfolojik Analizi</i>	44
<i>İmmünofloresan Boyama Yöntemi ile Nörit Gelişiminin Belirlenmesi</i>	45
<i>Nörit Uzunluğu Analizi</i>	47
<i>Nörit Uzaması ile İlişkili Olarak MMP-2 (Matriks Metalloproteinaz-2) Miktarının Belirlenmesi</i>	48
<i>MMP-2 ELISA yöntemi</i>	48
BULGULAR ve TARTIŞMA	51

Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi	54
Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Hücre Farklaşmasına Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Değerlendirilmesi	55
Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Hücre İnvazyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Değerlendirilmesi	58
Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Hücre Migrasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Değerlendirilmesi	59
<i>Migrasyonun Morfolojik Analizi</i>	60
MMP-2 (Matriks Metalloproteinaz-2) Miktarının Belirlenmesi	64
AlexaFluor®488 Ve Hoechst 33258 İle İmmünofloresan Boyama	66
Nörit Uzunluğu Analizi	72
SONUÇ ve ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO VE ADI	SAYFA
Şekil 1 Sinir Sisteminin Yapısal Ve Anatomik Açıdan Sınıflandırılması	2
Şekil 2 Sinir Sisteminin Somatosensoryel Ekseni	2
Şekil 3 Nöronun Yapısı	5
Şekil 4 Sinir Sistemi Hücreleri	6
Şekil 5 Nörodejeneratif Süreçler	8
Şekil 6 Nöronda Büyüme Konisinin Hücre İskeleti Organizasyonu	11
Şekil 7 Büyüme Konilerindeki İntraselüler Sinyal Yolaklarının Hücre İskeletiyle Birleşimi	12
Şekil 8 Omurgalı Sinir Sisteminde Nörit Büyümesini Kontrol Eden Faktörler	12
Şekil 9 Epigenetik Modifikasyonların Transkripsiyon İle İlişkisi	17
Şekil 10 DNA Metiltransferaz Enzimleri	19
Şekil 11 DNMT İnhibitörleri Ve İnhibitör Mekanizmaları	20
Şekil 12 RG108'in DNMT1'in Aktif Bölgesine Bağlanma Şekli	22
Şekil 13 Nükleozomun Yapısı	24
Şekil 14 Histon Modifikasyonlarının Birbirleriyle etkileşimleri	26
Şekil 15 HDAC İnhibitörlerinin Etki Mekanizması	28

Şekil 16	HDAC İnhibitörlerinin Rol Oynadığı Mekanizmalar	29
Şekil 17	Trikostatin A'nın Moleküler Yapısı	30
Şekil 18	Trikostatin A'nın Nörit Gelişimini İndükleme Mekanizması	33
Şekil 19	miRNA Etki Mekanizması	35
Şekil 20	Tetrazoliumun Mitokondriyal Redüktaz Enzimleri Aracılığıyla Formazan Tuzuna İndirgenmesi	40
Şekil 21	RTCA DP Cihazının Çalışma Prensibi	42
Şekil 22	İnvazyon Ve Migrasyon Çalışmalarında Kullanılan 16 Kuyucuklu CIM Plaka	43
Şekil 23	The Oris™ Cell Migration Ölçüm Kiti	45
Şekil 24	TSA Konsantrasyonlarının, PC-12 Adh Hücre Hattında MTT Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	51
Şekil 25	RG108 Konsantrasyonlarının, PC-12 Adh Hücre Hattında MTT Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	53
Şekil 26	PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 Nm) Ve TSA (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği	55
Şekil 27	PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 Nm) Ve TSA (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği	55

Şekil 28	PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM), NGF (100 nM) + RG108 (10 ve 100 nM) Ve NGF (100 nM)+ TSA (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği	56
Şekil 29	PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM), NGF (100 nM)+ RG108 (10 ve 100 nM) Ve NGF (100 nM)+ TSA (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği	57
Şekil 30	RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının İnvazyon Grafiği	59
Şekil 31	RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının İnvazyon Slope Grafiği	59
Şekil 32	RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının Migrasyon Grafiği	60
Şekil 33	RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının Migrasyon Slope Grafiği	60
Şekil 34	Kontrol ve NGF (100 nM) Grubuna ait 24. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst ile Floresan Boyanmış Görüntüsü	61
Şekil 35	NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) ve NGF (100 nM) +TSA (100 nM) 24. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst ile Floresan Boyanmış Görüntüsü	61
Şekil 36	Kontrol ve NGF (100 nM) Grubuna ait 48. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst ile Floresan Boyanmış Görüntüsü	62
Şekil 37	NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) ve NGF (100 nM) +TSA (100 nM) 48. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst ile Floresan Boyanmış Görüntüsü	62

Şekil 38	Kontrol ve NGF (100 nM) Grubuna ait 72. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst ile Floresan Boyanmış Görüntüsü	62
Şekil 39	NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) ve NGF (100 nM) +TSA (100 nM) 72. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst ile Floresan Boyanmış Görüntüsü	63
Şekil 40	MMP 2 Standart Grafiği	64
Şekil 41	RG108 ve TSA konsantrasyonlarının 7. Gün sonunda PC-12 Adh Hücre Hattı Üzerinde MMP-2 Miktarına Etkisi	65
Şekil 42	Kontrol (%0.1 DMSO) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü	66
Şekil 43	NGF (100 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü	67
Şekil 44	NGF (100 nM) + RG108 (10 nM) Grubu Ait PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü	68
Şekil 45	NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü	69
Şekil 46	NGF (100 nM) + TSA (10 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü	70
Şekil 47	NGF (100 nM) + TSA (100 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü	71
Şekil 48	PC-12 Adh Hücrelerinin NGF (100 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü	73

Şekil 49	PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + RG108 (10 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü	73
Şekil 50	PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü	74
Şekil 51	PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + TSA (10 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü	74
Şekil 52	PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + TSA (100 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü	75
Şekil 53	PC-12 Adh Hücrelerinin TSA Ve RG108 Konsantrasyonları İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Gruplara Göre Ortalama Nörit Uzunluğu	75

TABLolar DİZİNİ

TABLO NO VE ADI	SAYFA
Tablo 1 PC-12 Adh Hücre hattının genel özellikleri	38
Tablo 2 TSA'nın Farklı Konsantrasyonlarının PC-12 Adh Hücre Hattı Üzerinde MTT Testi Sonuçlarına Göre % Canlılık Değerleri	52
Tablo 3 RG108'in PC-12 Adh Hücre Hattı Üzerinde MTT Testi Sonuçlarına Göre % Canlılık Değerleri	53
Tablo 4 DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM) Ve TSA (10 ya da 100 nM) Konsantrasyonlarının PC-12 Adh Hücrelerinde 7 Günün Sonunda RTCA DP'deki Hücre İndeks (CI) Değerleri	56
Tablo 5 DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM) Ve RG108 (10 ya da 100 nM) Konsantrasyonlarının PC-12 Adh Hücrelerinde 7 Günün Sonunda RTCA DP'deki Hücre İndeks (CI) Değerleri	57
Tablo 6 MMP-2 Standartlarının 450 nm'deki Absorbans Değerleri	64

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACS	: Asetil koenzim A sentetaz
AH	: Alzheimer hastalığı
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
ANOVA	: Varyans Analizi (Analysis of Variance)
APC	: <i>Adenomatous polyposis coli</i>
ART	: Mono-ADP-ribozil transferaz
ATF3	: Siklik AMP-bağımlı transkripsiyon faktörü
BDNF	: Beyin-türevli nörotrofik faktör
β APP	: β -amiloid prekürsör protein
CAMs	: Hücre Adezyon Molekülleri
CBP/p300	: CREB-bağlayıcı protein/p300
c-EBP	: CCAAT- <i>enhancer-binding proteins</i>
CLASP	: <i>Cytoplasmic linker associated protein</i>
CREB	: c-AMP bağlayıcı protein
CRMP	: <i>Collapse response mediator protein</i>
CSPG	: Kondroitin sülfat proteoglikanları
DAC	: NAD ⁺ bağımlı deasetilaz
DNMT	: DNA metiltransferaz
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGCG	: (-)-epigallokateşin-3-gallat
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi
GAP-43	: <i>Growth associated protein</i>
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz 3

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

HAT	: Histon asetil transferaz
HB-GAM	: Heparin bağlayıcı büyüme ile ilişkili molekül
hCNT1	: <i>Human concentrative nucleoside transporter</i>
HDAC	: Histon deasetilaz
HDACi	: Histon deasetilaz inhibitörleri
HP1	: Heterokromatin protein 1
JAK2	: Janus kinaz 2
KLFs	: Krüppel-benzeri faktörler
LRP	: Lipoprotein reseptör-ilişkili protein
MAG	: Miyelinle ilişkili glikoproteinler
MAP	: <i>Microtubule-associated protein</i>
MBD	: Metil-CpG bağlanma domaini
MeCPs	: Metil CpG bağlanma proteini
MEF 2	: Miyosit artırıcı faktör 2
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
MYoD1	: Miyojenik farklılaşma 1
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NCOR2/SMRT	: <i>Nuclear receptor co-repressor 2</i>
NFAT	: Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü
NFIL3	: İnterlökin 3 tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörü
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NL	: Nörofilaman

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

NT	: Nörotrofin
PARP	: Poli-ADP-riboz polimeraz
PB	: Fenil bütirat
PC	: Feokromasitoma
pCAF	: p300/CbP-bağlantılı faktör
PH	: Parkinson hastalığı
PI-3	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKC	: Fosfolipaz C kinaz
RGC	: Retinal gangliyon hücreleri
SAHA	: Suberoilanilid hidroksamit asit
SAM	: S-adenozil metiyonin
SB	: Sodyum bütirat
SIRT	: Sirtuin
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOX11	: <i>SRY-related HMG-box 11</i>
STAT	: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TRK	: Tirozin kinaz reseptörü
TRD	: Transkripsiyon baskılayıcı domain
TRDMT	: tRNA (sitozin-5-)-metiltransferaz
TSA	: Trikostatın A
VPA	: Valproik asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde insanların yaşam süresinin giderek artmasıyla birlikte nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığı da artış göstermektedir. Buna karşın bu hastalıkların etkin bir tedavisi ne yazık ki bulunmamaktadır. Nöronların akson gelişimindeki intrinsik kapasitesi gelişimle birlikte azalmaktadır. Nöritojenik etkilere sahip bileşikler, nöronal hücrelerde nörit gelişimi indükleyebilme yetenekleri nedeniyle nöronal hasarların tedavisinde umut vadetmektedir.

Nörit gelişimi sayesinde, santral sinir sistemi hasarlarında, normal nöronal fonksiyonun ve sinirsel ağların tekrar eski haline dönebilmesi mümkündür. Bu nedenle, nörotrofik faktör kullanımı nöronal rejenerasyonun önemli bir basamağıdır. Fakat nörotrofik faktörlerin kullanımını kısıtlayan bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan en önemlisi, nörotrofik faktörlerin kan beyin bariyerini geçememeleridir. Bir diğer dezavantaj ise periferik peptidazlar tarafından hızla yıkılmalarıdır. Bu nedenle, nörit gelişimini indükleyici etkinliğe sahip ya da nörotrofik bileşenlerle kombine halde uygulanabilen bileşenlerin kullanımı, santral sinir sistemi hasarlarında alternatif bir yaklaşımdır.

Nöropatolojik süreçlerde, histonların hücresel asetilasyon homeostazisinin bozulması son yıllarda dikkat çekmiştir (Hahnen ve ark., 2008). Pek çok çalışma özellikle, nörodejenerasyonun aşırı histon deasetilasyonu ile sonuçlanan histon asetiltransferaz aktivitesindeki genel düşüş ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Jin ve ark., 2011; Rouaux ve ark., 2003). Küçük molekül bir histon deasetilaz inhibitörü olan Trikostatın A'nın, çeşitli kanser hücrelerini apoptoz yoluna götürürken, nöronal kök hücrelerde ise, transkripsiyon faktörlerini tetikleyerek nöronal canlılığı artırdığına dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Xu ve ark., 2007; Kim ve ark., 2007; Schwechter ve ark., 2007; Hao ve ark., 2004; Jeone ve ark., 2003).

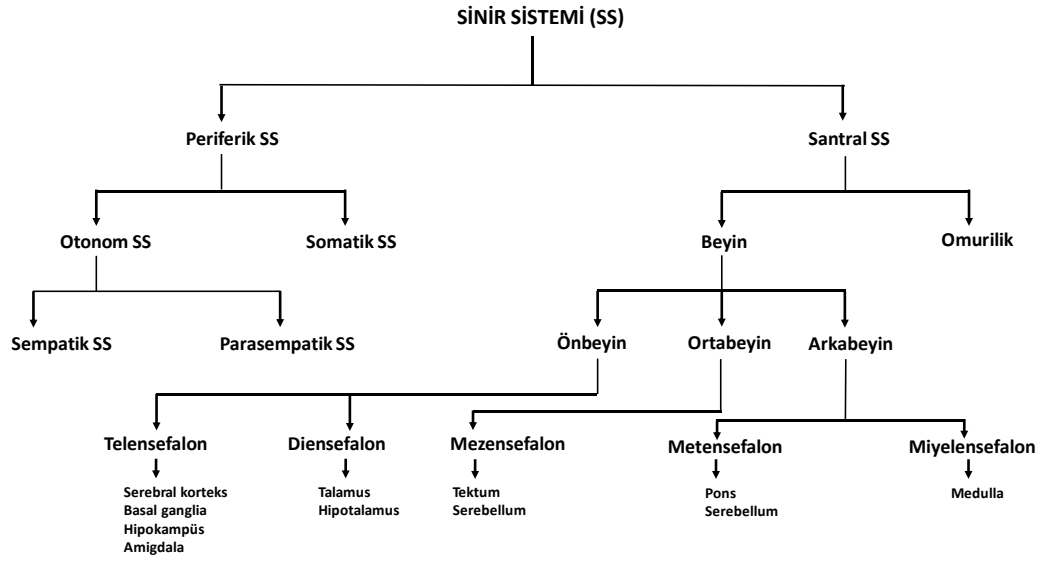
Histon deasetilaz inhibitörleri gibi epigenetik mekanizmalar üzerine etkili bir diğer grup ise DNA metiltransferaz inhibitörleridir. RG108, sitotoksik ve genotoksik etkisi olmayan fakat oldukça etkili yeni bir DNA metiltransferaz I (DNMT1) enzim inhibitörüdür (Brueckner ve ark., 2005). DNMT1 enziminin katalitik alanı göz önünde bulundurularak tasarlanmış bir moleküldür. Nörodejeneratif hastalıklarda DNA metilasyonu anomalileri de geçtiğimiz yıllarda oldukça dikkat çekmeye başlamıştır. DNA metilasyonundaki değişimler, nörodejeneratif hastalıkların nedenlerinden biridir. Nörodejenerasyon sürecinde, DNA metilasyonu ile aktif genler inaktive edilmektedir. İnaktive edilen genlerin, küçük molekül DNMT inhibitörleri ile tekrar aktif hale dönüştürülmesi mümkün olmaktadır.

Biz de bu çalışmamızda DNA ve kromatin şekillenmesi üzerinde epigenetik mekanizmalarda önemli rolü olan ve kanser tedavisinde denenmekte olan histon deasetilaz inhibitörü Trikostatın A ve DNA metiltransferaz inhibitörü RG108'in PC-12 Adh hücrelerinde nörit gelişimi üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

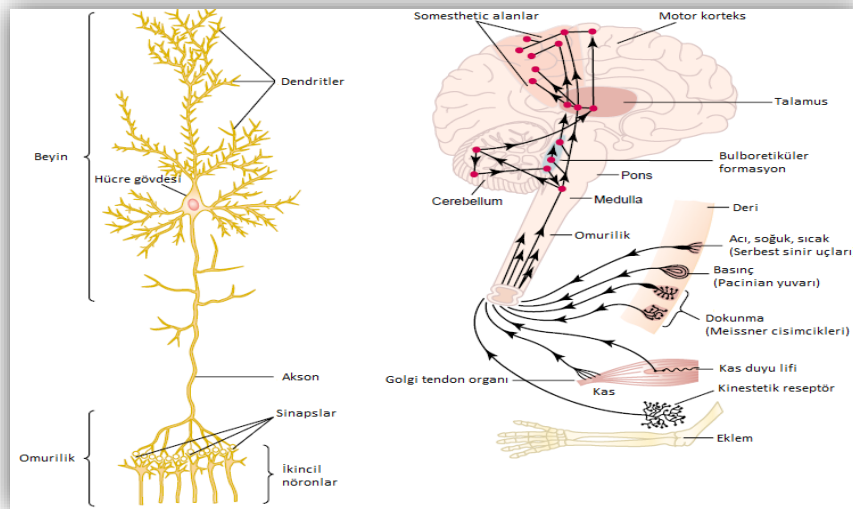
KAYNAK BİLGİSİ

SİNİR SİSTEMİ

Sinir sistemi, canlıların iç ve dış çevresi arasındaki uyumu sağlayan, bilgi toplayan ve bu bilgiyi işleyen, oluşan sinyallerin vücut içerisinde iletimini sağlayan, organların ve kasların aktivitelerini düzenleyen karmaşık bir sistemdir. Sinir sistemi fonksiyonel açıdan serebrospinal sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır(http-1). Santral sinir sistemini beyin ve omurilik; periferik sinir sistemini ise istemli hareketi kontrol eden motor nöronlar, istemsiz olayları kontrol eden sempatik ve parasempatik sinir sisteminden oluşmaktadır (Şekil 1 ve 2) (Guyton, 2001).



Şekil 1. Sinir Sisteminin Yapısal Ve Anatomik Açısından Sınıflandırılması (Brunton ve ark., 2009)



Şekil 2. Sinir Sisteminin Somatosensöriyel Ekseni (Guyton, 2001)

Santral Sinir Sistemi

Santral sinir sisteminin iki önemli bölüm olan, beyin (cerebrum) ve omurilik (medulla spinalis) meydana getirir. Bu heriki bölüm birbirleri ile sıkı bir fonksiyonel ve yapısal ilişki içindedirler.

Beyin (Cerebrum)

Beyin, hücrelerarası nörotransmisyon mekanizmaları ile kendinin ve diğer nöronların aktivitelerini dinamik ve karmaşık bir şekilde düzenleyen, birbiriyle yakından ilişkili birçok nöronal sistemin bileşiminden oluşmaktadır (Brunton ve ark., 2009). Beyin (cerebrum) santral sinir sisteminin kraniale doğru ileri derecede gelişmiş bir bölümüdür.

Embryolojik bakımdan ele alındığında beyin üç önemli bölüme ayrılarak incelenir:

- Prosensefalon (önbeyin)
- Mezenkefalon (orta beyin)
- Rombensefalon (arka beyin)

İleriki dönemlerde prosencephalondan beyin yarım küreleri telensefalon ile diensefalon (arabeyin) adı verilen önemli kısımlar meydana gelir. Beyin yarım kürelerinde önemli beyin lobları oluşur. Bu yarımküreler esas itibariyle beyaz ve gri cevherden meydana gelmişlerdir. Beyaz cevher, yapının içinde yer alır. Gri kısım ise bir kabuk şeklinde beyaz bölümü dışarıdan kuşatır (http-1). Kabuk şeklindeki bu gri cevhere serebral korteks denir. Kortikal alanlar, bilgiyi primer kortikal duyuşal bölgeden daha yüksek kortikal fonksiyonlara (örn. hafıza ve bilinç) doğru işleyen “birleşim alanları” olarak tanımlanmaktadır (Brunton ve ark., 2009).

Medulla Spinalis (omurilik)

Medulla spinalis, medulla oblongata’dan başlayarak *canalis vertebralis* içerisinde kaudale doğru uzanan santral sinir sistemi kısmıdır (Taner, 2013). Sinir hücresi ve yolaklar açısından zengin bu kitlenin içinde deri, kaslar, eklemler ve organlardan gelen duyuşal enformasyonu koordine eden yapılar lokal olarak motor nöronlar ve daha üst merkezlerden sinyalleri alan veya buralara gönderen primer duyuşal “bekçi” nöronlardır (Brunton ve ark., 2009). Servikal, torakal, lumbal ve sakral olmak üzere anatomik bölümlere ayrılmıştır (Taner, 2013). Enine yapılan bir kesitte, *medulla spinalis* içinde yer alan gri cevher ile, bu yapıyı çevreden kuşatan beyaz cevher görülür. Ortada yer alan gri cevher, kanatları açık bir kelebek görünümündedir. Kanatların ön çıkıntıları ön boynuz (*cornu anterior*), arka çıkıntıları ise arka boynuz (*cornu posterior*) adını alır. Ön boynuzlarda bulunan hücrelerden motor sinirler ayrılırlar ve bunlar spinal sinirlerin ön köklerini oluştururlar (efferent sinirler). Arka boynuzlarda bulunan hücrelere ise, dışarıdan alınan duyuşaları getiren sinirler uzanırlar (afferent sinirler). Fakat arka kökler, *medulla spinalis* içine dahil olmadan önce şişkin bir yapıya (ganglion) uğrarlar ve sonra omuriliğe devam ederler (http-2).

Periferik sinir sistemi

Periferik sinir sistemini, santral sinir sisteminin dışına çıkan aksonların oluşturduğu periferik sinirler ile santral sinir sisteminin dışında nöronların toplu olarak bulunduğu ganglion adı verilen yapılar oluşturur. Medulla spinalisten çıkan otuz bir

çift spinal sinir ile beyin ve beyin sapından çıkan on iki çift kranial sinir ve bunların dalları periferik sinirleri oluşturur (Taner, 2013).

Otonom Sinir Sistemi

Sinir sisteminin vücudun viseral fonksiyonlarını hızlı bir şekilde kontrol eden kısmına otonom sinir sistemi denir. Bu sistem arteryel basınç, gastrointestinal motilite ve sekresyon, mesane boşalması, terleme, vücut ısısı ve diğer bir çok aktivitenin kontrolüne yardım eder. Ayrıca bu aktivitelerden bazılarını tamamen, bazılarını da kısmen kontrol eder (Guyton ve Hall, 2001). İstek dışı çalışan otonom sinir sisteminin merkezi hipotalamustur. Başlıca medulla spinalis, beyin sapı ve hipotalamusta lokalize olan merkezler tarafından aktive edilir. Otonom sinir sistemi sempatik ve parasempatik olmak üzere iki kısımda incelenir. Ancak bazı yazarlar gastrointestinal sistemi inerve eden enterik sinir sistemini de otonom sinir sistemi içerisinde sınıflamaktadırlar (Taner, 2013).

Sempatik Sinir Sistemi

Sempatik sinirler, omurilikte T-1 ve L-2 segmentleri arasından kaynaklanırlar ve buradan ilk önce sempatik zincire ve daha sonra sempatik sinirler tarafından uyarılan doku ve organlara geçerler (Guyton ve Hall, 2001). Her ganglion, diğeri ile bir ara uzantı vasıtasıyla (rami intergangliare) birleşir. Ayrıca omurilikteki sempatik merkezlerden kalkan ve dışarıya uzanan lifler de bu ganglionlara bağlanırlar (rami communicantes). Böylece ortaya çıkan ağa "*Truncus sympathicus*" adı verilir. Ganglionlardan ayrılan potsganglionik sempatik lifler, ilgili organ veya bölgelere değişik şekillerde uzanırlar. Ya kan damarları çevresinde bir ağ yaparak devam ederler, ya da komşu spinal sinirlerin yapısı içinde uzanırlar. Karın boşluğunda meydana gelmiş olan *Plexus coeliacus*, sempatik liflerin önemli bir sinir ağıdır (http-2).

Parasempatik Sinir Sistemi

Parasempatik sinir sistemine ait presinaptik nöronlar beyin sakındaki bazı kranial sinir nükleusları ile medulla spinalisin S2, S3 ve S4 segmentlerindeki *nuclei parasympathici sacrales*'te bulunur (Taner, 2013). Parasempatik sistem liflerinin, *truncus simpaticus* ile hiçbir ilişkisi yoktur. Bu liflerin başlangıç merkezleri ya beyindedir ya da omuriliğin alt kısımlarında bulunur. Lifler tek başlarına sinir oluşturmazlar. Bunlarda da, pre-ve postganglionik bir yapılaşma görülür. İlgili ganglionları merkezden oldukça uzaktadır. Dolayısı ile parasempatik liflerin preganglionik kısmı uzun, postganglionik bölümü ise kısadır. Bu durum sempatik liflerde tam tersidir (http-2).

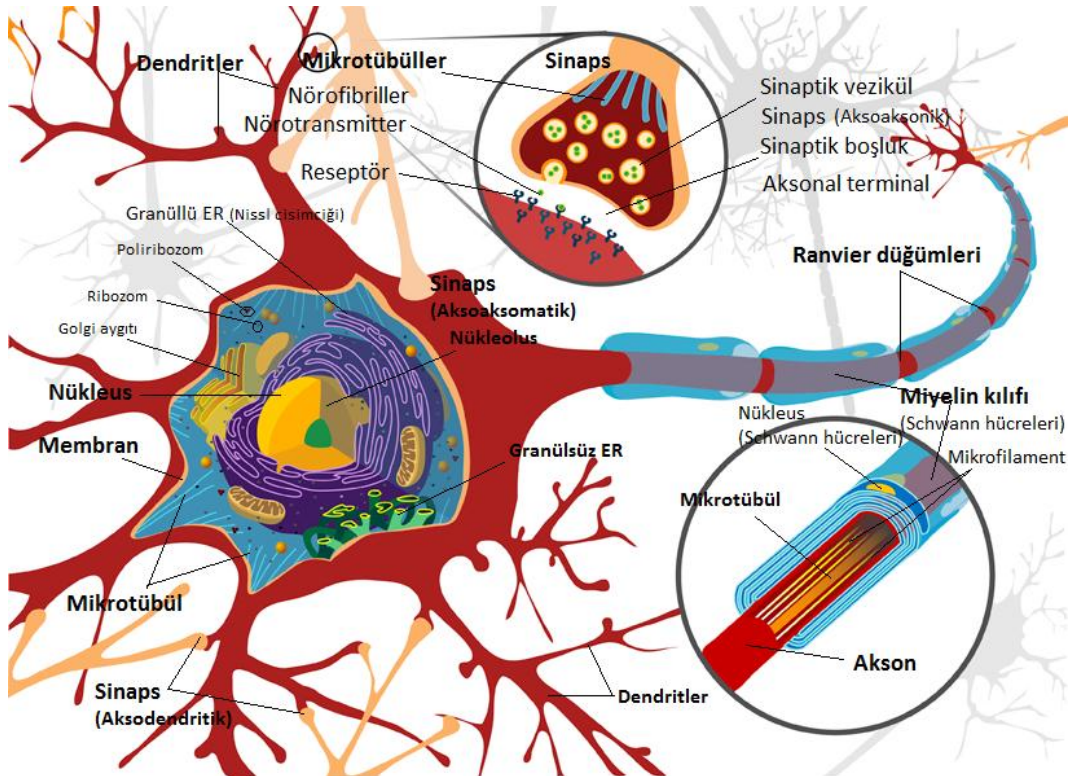
Fonksiyonel açıdan, sempatik ve parasempatik sistemlerin organlar üzerindeki etkileri birbirlerine terstir. Örneğin; parasempatik sistem, gastrointestinal sistemin çalışmasını hızlandırır, kalp atım hızını ve solunum sayısını yavaşlatır, periferik damarlarda vazodilatasyona yol açar; sempatik sistemi ise tam tersi etki eder. Birbirine zıt etkili bu iki sistem bir denge içinde çalışarak organizmanın iç ve dış ortamdaki değişikliklere adapte olmasını sağlayan viseral fonksiyonları yerine getirir (Taner, 2013).

Santral Sinir Sistemi Hücreleri

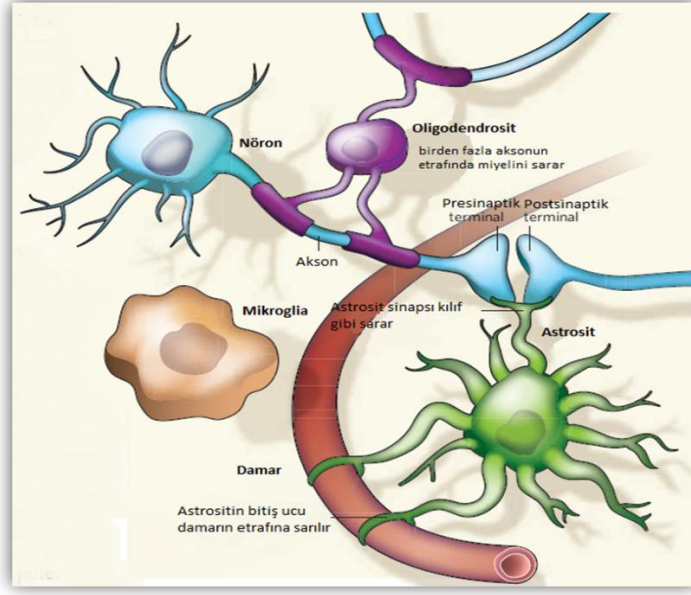
Santral sinir sisteminde, bilginin işlenmesinden ve transferinden sorumlu esas ünite nöronlardır. Davranışsal ve homeostatik işlevlerinin temeli hiyerarşik biçimde organize edilmiş nöronal devreler ve ağların birlikte çalışmasına dayanır. Bu fonksiyonlar kompleks bir sistemin birleştirici unsurlarıdır (http-3).

Merkezi sinir sistemi primitif ektodermden gelişir. Sinir sisteminin gelişmesi sırasında basit bir disk şeklinde ve epitel yapısında olan nöral plak, silindir şekliyle nöral tüp oluşumunu sağlar. Bu olay nöralasyon olarak bilinir. Nöral tüp, karmaşık sinir sistemine farklılaşır. Nöral tüp oluşumu sırasında nöral plağın özel bir bölgesinden oluşan nöral krest, nöral tüpten ve yüzeyel ektodermden ayrılır. Gelişimin ileriki safhalarında nöral krest, periferik sinir sistemine ait gangliyonları oluşturan nöronları ve diğer bölümlerini meydana getirir (Kierszenbaum, 2006).

Miyelin, aksonun çevresini saran ve onu koruyan bir kılıftır. Santral sinir sisteminde oligodendrositlerin membranından, periferik sinir sisteminde ise Schwann hücre membranından oluşur. Miyelin, aksonu korumanın yanı sıra sinyal iletimini hızlandırır ve kaybını önler. Miyelin kılıf akson boyunca segmentler biçiminde bulunur. Ranvier boğumu denen yerlerde miyelin kılıfı yoktur ve bu akımın "saltatory" denen sıçrayıcı şekilde hızlı olmasına yol açar. Bir oligodendrosit bir çok aksonun çevresinde çok sayıda internodal miyelin segmenti oluşturur. Schwann hücresi ise bir aksonun çevresinde bir tek internodal miyelin segmenti oluşturur (Şekil 3) (Akyıldız ve Sav, 2004).



Şekil 3. Nöronun Yapısı (http-4)



Şekil 4. Sinir Sistemi Hücreleri (Allen ve Bares, 2009)

Santral sinir sistemindeki hücreler iki geniş grupta toplanır: bunlar bilgiyi işleyen nöronlar ve nöronlara mekanik ve metabolik destek sağlayan glia hücreleridir (Brunton ve ark., 2009). Nöronlar duyuların algılanması, motor ve emosyonel cevapların oluşturulması, öğrenme ve hafıza gibi fonksiyonların yerine getirilmesini sağlayan hücrelerdir. Glia hücreleri, sinir sistemi için özelleşmiş bağ dokusu hücreleri olarak kabul edilebilir ve sinir dokusuna metabolik ve yapısal destek sağlarlar, glia hücrelerinin uyarılabilme özellikleri yoktur ve iki gruba ayrılırlar; mikroglia ve makroglia. Mikroglialar esasen makrofajlardan gelişirler ve santral sinir sistemindeki hasar görmüş bölgelerdeki hücresel artıkları fagosite ederler. Makroglialar ise, santral sinir sisteminde astrositler, oligodendrositler ve ependim hücrelerinden oluşurlar. Astrositler, nöronların beslenmesi ve kan-beyin bariyerinin oluşmasından sorumludur. Ayrıca santral sinir sistemini dıştan sararak glial membran (*Membrana limitans glialis*) isimli koruyucu bir tabaka oluştururlar. Oligodendrositlerin uzantıları aksonları saran miyelın kılıflarını yapar, ayrıca birkaç miyelinsiz aksonu bir arada sararak nörolemma adı verilen bir kılıf oluşturur (Şekil 4). Ependim hücreleri, santral sinir sistemindeki kavitelelerin duvarını döşeyen epitel tabakasını oluşturur (Taner, 2013).

Nörodejeneratif Hastalıklar

Sinir bilimin babası olarak kabul edilen Ramón y Cajal 1928 yılında “Akson ve dendritlerin büyüme ve rejenerasyon kaynakları geri dönüşsüz olarak kurduğunda gelişme sonlanır. Yetişkinlerin merkezlerinde sinir yolları sabit, değişmez ve sonlandırılmıştır. Hiçbir şey rejenera edilememektedir, her şey ölmek zorundadır. Bu sert hükmü değiştirmek yalnızca geleceğin bilimiyle mümkündür.” Demiştir (Teter ve Ashford, 2002). Eskiden sinaps sayılarında azalmanın yanı sıra nöronların kendilerini yenileme yeteneklerinin de kaybolduğuna ve yeni nöronların oluşmadığına inanılırken bugün bu düşüncenin tam aksi kanıtlanmıştır (Kotan ve ark., 2009).

Ana nöronların kaybı olmadan, seçilimli olarak akson, dendrit, akson ve dendrit dalları ve sinapsların eliminasyonu santral sinir sisteminin normal gelişimi sırasında olduğu kadar, yetişkinlerde hastalık veya hasara cevap olarak da meydana gelmektedir (Luo ve O'Leary, 2009). Nörodejeneratif hastalıklar, sinir hücrelerinin ölümü veya progresif dejenerasyonu ile sonuçlanan tedavi edilemeyen ve hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen hastalıklardır. Hareket bozukluklarına (ataksi) veya zihinsel işleyiş problemlerine (demans) neden olurlar (http-5).

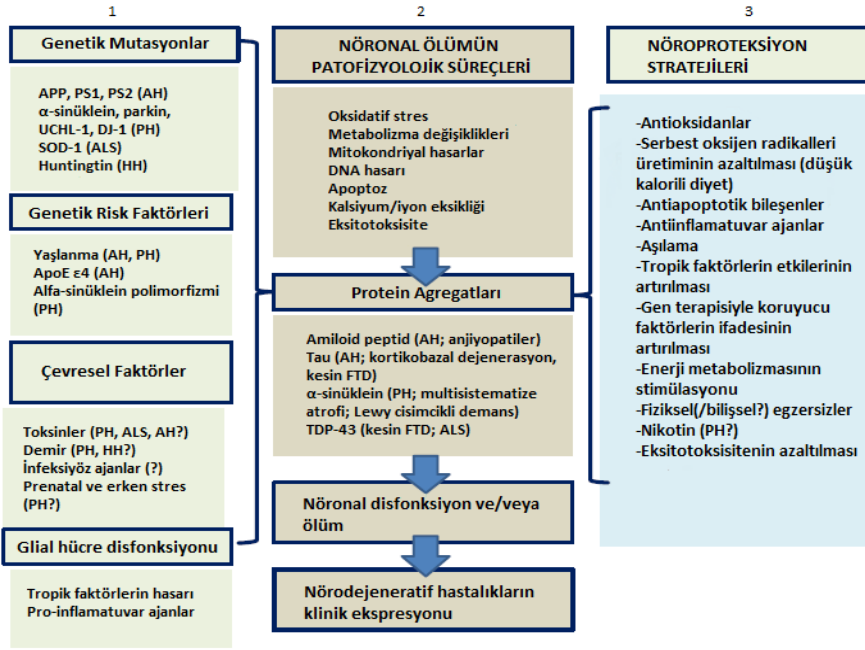
Başlıca nörodejeneratif hastalıklar; iskemik beyin hasarı, Alzheimer, Parkinson, Huntington ve nörodejeneratif prion hastalıklarıdır (Rang ve ark., 2011). Alzheimer hastalığı Maynert'in bazal çekirdeğindeki kolinerjik nöronların, Parkinson hastalığı ise substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterizedir (Finkel ve ark., 2009). Alzheimer, Parkinson ve Creutzfeld-Jakob hastalıkları yanlış katlanmış proteinlerin santral sinir sisteminde agregasyonu ve birikimini içeren ortak bir patogenetik mekanizmaya sahiptir (Skovronsky ve ark., 2006). Alzheimer ve Parkinson hastalığı karakteristik protein agregasyonlarıyla belirlenebilmektedir ve giderek genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklanan sinaptik bozukluklar olarak kabul görmektedir (Schaefer ve Teuchert-Noodt, 2013). Günümüzde insanların yaşam süresinin giderek artmasıyla (60 yaşın üzerinde), aynı oranda nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığı da artış göstermektedir. Buna karşın bu hastalıkların etkin bir tedavisi ne yazık ki bulunmamaktadır (Haigang ve Zhilian, 2012).

Nörodejeneratif Hastalıkların Patofizyolojisi

Nöronal fonksiyon bozuklukları mutlaka nöronal hücre ölümü sonucunda oluşmayabilir (**Şekil 5**). Sinaptik kayıp, uzun süreli potansiyalizasyon veya hastalık patolojisine bağlı olarak nöronal sinyalizasyonun kesilmesinden kaynaklanabilirler (Bredesen ve ark., 2002). Nöronal strese bağlı oksidatif ürünlerin zamanla birikmesi hücre ölümüne neden olur, bu nedenle yaşlanma nörodejeneratif hastalıklarda etkindir. Ancak normal yaşlanma sırasında nörodejeneratif hastalıklarda görülen yüksek seviyedeki nöronal ölümün aksine, göreceli olarak daha düşük nöronal kayıp vardır (Yankner ve ark., 2008). Sinir hücresi şiddetli akson hasarını takiben *Wallerian dejenerasyonuna* uğrar. Hasarlı bölgenin distal ucunda bir lezyon oluşur ve aksonal yapı bozularak kopar. Memelilerde santral sinir sistemi aksonları, periferik sinir sisteminden farklı olarak hasarı takiben spontan olarak kendilerini yenileyemezler (Kim ve ark., 2003; Fournier ve ark., 2001). Periferik sinir sistemindeki Schwann hücreleri, fagositler ve makrofajlar hasarlı aksonun etrafındaki parçalanmış akson ve onu saran miyelin kılıfın distal kısmını etkili bir şekilde ortadan kaldırır, nörotrofik faktör salınımıyla birlikte akson rejenerasyonu hızlıca gerçekleşir. Parçalanmış yapılar periferik sinir sisteminden farklı olarak santral sinir sisteminde etkin bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılmamaktadır (Purves ve ark., 2001).

Santral sinir sisteminde rejenerasyonun gerçekleşmemesinin nedenleri;

- 1) Hasarlı nöronların ölümü,
- 2) Erişkin nöronların hasar sonrası büyüme kapasitelerinin düşük olması,
- 3) Büyümeyi destekleyecek faktörlerin eksikliği ve
- 4) Büyümeyi engelleyici çevre şartlarının bulunması olarak özetlenebilir (Woolf, 2003).



Şekil 5. Nörodejeneratif Süreçler (1) Nörodejeneratif Hastalıkların Oluşum Sürecinde Etkili Olan Çevresel Risk Faktörleriyle Etkileşim Halindeki Genetik Risk Faktörleri Ve Genetik Mutasyonların Özeti (2) Protein Agregasyonu Ve İleri Aşamalarda Nöronal Ölüme Yol Açan Olası Mekanizmalar (3) Kabul Edilmiş Nöroproteksiyon Stratejileri (Nieoullon, 2011)

Akut hücre hasarı, patolojik olarak hücre şişmesi, vakuolizasyon ve lizis ile tanımlanan ve aynı zamanda hücrede aşırı Ca^{+2} birikmesi ve membran hasarıyla da alakalı nekroza girmesine neden olur. Nekrotik hücreler tipik olarak etraflarındaki dokulara hücre içeriğini saçarak ve inflamatuvar cevabın başlamasına neden olurlar. Pek çok nörodejeneratif bozukluğun sebebi kronik inflamasyondur (Rang ve ark., 2011).

Hücreler aynı zamanda yaşam süresince gelişim, immün regülasyon ve doku değişikliği gibi pek çok süreç için gerekli olan apoptoz ya da programlı hücre ölümü aracılığıyla da ölebilirler. Apoptoz da nekroz gibi, hem inme ve kafa travması gibi akut nörodejeneratif hastalıklarda hem de Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi kronik hastalıklarda görülmektedir (Okouchi ve ark., 2007). Hücreyi nörodejenerasyona götüren süreçler olarak nekroz ve apoptoz arasındaki ayırım kesin değildir, eksitotoksiste ya da oksidatif stres bazen hücreyi nekrozla doğrudan öldürmek için yeterli olabilmektedir, eğer bu faktörler çok yoğun değilse hücre apoptoz yolağına girebilir (Rang ve ark., 2011).

Alzheimer Hastalığı

İlerleyen kortikal demans hastalığıdır. Konuşma, hafıza, görme ve duygu ve kişilik üzerine etkilidir. Alzheimer hastalarının (AH) %5'ini oluşturan genetik geçişli Alzheimer hastalarında, presenilin-1 ve -2'de β-amiloid prekürsör protein (βAPP) gen mutasyonu gösterilmiştir (Kierszenbaum, 2006). Presenilin-1 ve -2 tarafından aktive edilen γ-sekretaz enzimi 40 amino asitlik bir parça olan β-amiloid peptidi oluşturur. Ancak bu gende oluşan mutasyonlar sonucu γ-sekretaz enzim aktivitesinde bir artma görülür ve bunun sonucu olarak 42 amino asitlik β-amiloid peptid oluşur. Uzun β-amiloid peptid, diffüz plaklar halinde agregat olur ve bunlar

yoğun nöritik plaklara dönüşür (Öztürk ve Karan, 2009). Bu plaklar Ca^{+2} regülasyonunu bozarak komşu nöronların ölümüne neden olur. Mikroglia ve astrositler amiloid plakların etrafında toplanır, dejenere olmuş sinir hücre uzantıları da amiloid plağı sararak nörit plağı oluştururlar (Kierszenbaum, 2006). Nöritik plak oluştuktan sonra, inflamasyon, eksitotoksinite ve muhtemelen apoptozisten oluşan sekonder kaskad, ek hasar oluşmasına aracılık eder (Öztürk ve Karan, 2009).

Alzheimer hastalığındaki kognitif kötüleşmenin ciddiyeti amiloid depozisyonundan çok nörofibriler yumak miktarı ile koreledir. Nörofibriler yumakların temel bileşeni hiperfosforile 'tau'proteinidir. AH patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar, tau proteininin hiperfosforilizasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar (Öztürk ve Karan, 2009). Böylece tau çiftleri sitoplazmada birikerek nöronun işlevini bozarlar (Kierszenbaum, 2006).

Apolipoprotein $\epsilon 4$, uzun β -amiloid peptidin ortadan kaldırılmasını engellemektedir. Kolesterol taşınmasında görevli bir protein olan Apolipoprotein E $\epsilon 4$ alleli normallerde %16 pozitif iken, Alzheimer hastalığı olanlarda bu oranın %35-50 dolaylarında pozitif olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla bu alleli taşıyanların bir kısmının hastalığa yatkın olduğu söylenebilir (Selekler, 2010).

Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) genellikle 50-60 yaşları arasında başlayan, yavaş progressif seyirli, kronik bir hastalıktır. Hipokinetik hastalıklar(yavaş istemli hareketlerde bozukluklar) için prototip tablo olup, parkinsonien motor bulgular yani tremor, rijidite, bradikinezi, akinezi ve postüral anormallikler ile karakterizedir (Ertan, 2005). Bu hastalıkta substantia nigradaki dopaminerjik nöronlarda kayıp gözlenmektedir (Kierszenbaum, 2006). Parkinson hastalığının başka parkinsonizm tablolarından klinik olarak ayırt edilmesine yardımcı olan diğer özellikleri ise, parkinsonien bulguların asimetrisi, belirgin istirahat tremoru, levodopa ile klinik olarak anlamlı yanıtın varlığı ve hastalığın erken evresinde denge problemlerinin az ya da hiç olmamasıdır (Çakmur, 2009).

Amiyotrofik Lateral Skleroz

Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) esas olarak serebral korteks, beyin sapı ve spinal korddaki motor nöronları etkileyen progresif seyirli nörodejeneratif bir hastalıktır. Başlangıçta bir ekstremitede görülen hafif şiddette başlayan güç kaybı ve ilerleyen zamanda ciddi felç durumu, yutma ve solunum bozuklukları ile seyreder. Jean-Martin Charcot tarafından 1874 yılında tanımlanan bu hastalık adını gri cevher (amyotrofi) ile beyaz cevheri (lateral skleroz) eş zamanlı tutmasından almıştır (Uluç ve ark., 2008). ALS vakalarının %5-10'u ailesel geçişlidir. Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) genindeki mutasyonların bu vakaların %20'sini oluşturduğu düşünülmektedir. SOD1, toksik olan süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürmek için bakıra gereksinim duyan bir enzimdir. Mutant SOD1'de, ara filamanların (NF-L, NF-M ve NF-H) düzenlenme bozuklukları, mitokondriyon anormallikleri ve motor nöronların apoptoza gitmesi gibi toksik etkileri ile kendini göstermektedir (Kierszenbaum, 2006).

ALS'nin patogenezinde otoimmünitenin de rolü olabileceği düşünülmektedir. Santral sinir sisteminin ana eksitator nöromediatörü olan glutamatin, anormal artmış aktivitesine bağlı gelişen hücre ölümü olarak özetlenebilecek eksitotoksisite, yavaş gelişen nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de rol oynamaktadır (Uluç ve ark., 2008). Sporadik ALS olan hastalarda voltaj geçirgenliği olan Ca^{+2} kanallarına karşı gelişen antikorların etkisiyle, intraselüler Ca^{+2} iyon dengesinin bozulması sonu motor nöronlarda dejenerasyon görülür (Kierszenbaum, 2006).

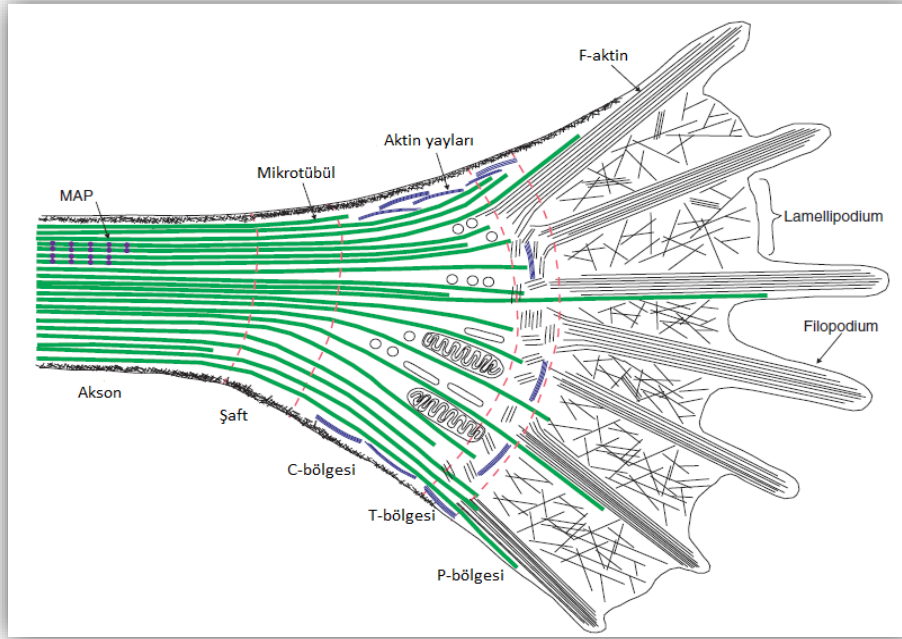
NÖRİT GELİŞİMİ

Nörorejenerasyon, nöronların endojen olarak korunması, nöroplastisite ve nörit büyümesini kapsayan bir kavramdır (Enciu ve ark., 2011). Nörojenezin başlıca morfolojik karakteristiği, nörit gelişimini takip eden akson ve dendritlerin dallanmasıdır (Kiryushko ve ark., 2004). Nörit oluşumu ve şekillenmesi temel olarak sinir sistemi gelişimi ve patogenezi ile ilişkilendirilmektedir (Hagg, 2009). Hasarlı beyindeki nöronal ve sinaptik ağların onarımının beyin fonksiyonlarının iyileşmesinde gerekli olduğu öne sürülmüştür (Tohda ve ark., 2005).

Nörit uzamasını göstermek için çeşitli *in vitro* modeller mevcuttur. Bu modeller genel olarak iki grupta toplanabilir: (1) nörit gelişiminin çeşitli büyüme faktörleri sayesinde indüklenebildiği nöroepitel orijinli hücre hatları (PC12 hücreleri, nöroblastoma hücreleri v.b.) (2) rodent nöronlarından elde edilen primer kültürler. Embriyonik rat hipokampal nöronlar bu grubun en iyi tanımlanmış ve en çok kullanılan çeşitidir. Primer kültür modelinde nöronal farklılaşmanın çeşitli basamakları gözlenebilir (Da Silva ve Dotti, 2002).

Nörit gelişimi, nöronların gelişimi sırasında hedeflerine ulaşmak için oluşturdukları çıkıntıların bir ağ haline gelmesi ve bunun sonucunda nöronal bağlantıların oluşması olarak açıklanabilen bir süreçtir. Bütün gelişmekte olan nöritler, distal uçlarında, filopodia ve lamelliopodia taşıyan çok hareketli uzantılar olan büyüme konileri ile sonlanırlar. Bu büyüme konileri nöriti hedefine doğru yönlendirir (Mingorance-Le Meur ve ark., 2009). Pathfinding (yol bulma) olarak adlandırılan bu süreç, embriyoda aksonların uygun yolu izleyerek kendisine uygun sinaptik partneri bulması olarak açıklanabilir.

Büyüme konisi, aksonun ucunda morfolojik olarak çeşitli bölgelere ayrılmış (kırmızı çizgiler), genişletilmiş, hareketli bir yapıdır (**Şekil 6**). Aksonda, mikrotübüller (yeşil çizgiler) MAP'ler (mikrotübül ile ilişkili proteinler) tarafından (mor noktalar) paralel demetler şeklinde organize edilmiştir, ancak C-bölgesinde fasiküle halleri bozulur ve tek tek T-bölgesine ve P-bölgesine doğru uzarlar. Böylece filopodiada F-aktin demetlerinin (siyah çizgiler) yanında hizalanmış olurlar. P-bölgesinde, filopodiadaki F-aktin, P-bölgesinden geriye doğru paralel demetler şeklinde organize olarak ve kısa filamentler şeklinde koparak T-bölgesini sonlandırır. P-bölgesi lamelliopodiasındaki F-aktin, dendritik ağları oluşturan demetler halinde organize olur. T-bölgesinde ve C-bölgesinin periferinde, F-aktin ve miyozin II'den oluşan, aktin yayları denilen (mavi çizgiler) paralel olmayan bir şekilde bulunur. Aktin yayları, C-bölgesinde basınç kuvveti oluşturarak bağlanmamış mikrotübülleri tutar ve böylece büyüme konisine mikrotübül bağlanmasını kolaylaştırır (Geraldo ve Gordon-Weeks, 2009).



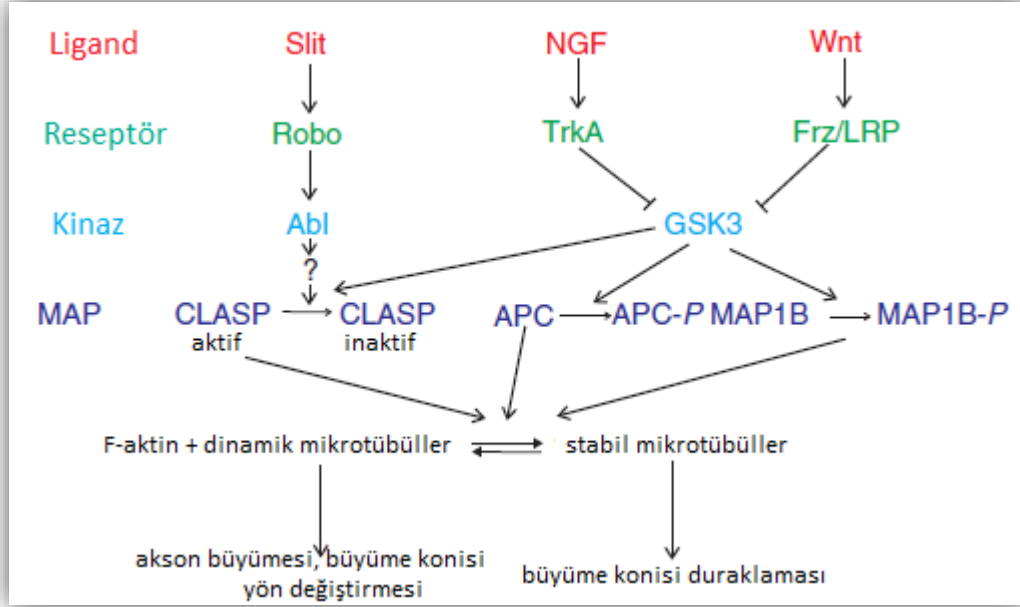
Şekil 6. Nöronda Büyüme Konisinin Hücre İskeleti Organizasyonu (Geraldo Ve Gordon-Weeks, 2009)

Nörit gelişimi önce başlangıç çıkıntılarının oluşumu (nörit indüksiyonu) ile başlar; daha sonra bu çıkıntılar primer nöritlere dönüşür (filizlenme); ve son olarak akson ve dendritler ayırt edilebilir hale gelir (polarizasyon). *In vitro* nöronal farklılaşma genellikle nörojenik ligandların reseptöre bağlanması sonucunda tetiklenir. Bağlanma sonrasında, çeşitli intraselüler sinyal yolları aktive olur ve bu aktivasyon hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve nörit oluşumu ile sonuçlanır. Sinyalizasyon süreçlerinin aktivasyon açısından önemli olduğu fakat nörit gelişimini indüklemek için yeterli olmadığı da açıklanmıştır (Kiryushko ve ark., 2004).

Büyüme konilerindeki mikrotübül dinamiğini doğrudan kontrol eden ve kinazların yer aldığı çeşitli sinyal yolları tanımlanmıştır. Bu yolların pek çoğunda serin/treonin kinaz GSK3 (glikojen sentaz kinaz 3) büyük rol oynamaktadır. GSK3; APC (*adenomatous polyposis coli*), MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*), CRMP (*collapse response mediator protein*) ve CLASP'ların (*cytoplasmic linker associated protein 1*) dahil olduğu çeşitli MAP'leri fosforile eder. GSK3, yapısal olarak aktiftir ve nörotropinler tarafından stimüle edilenlerin de dahil olduğu çeşitli büyüme konisi klavuz yolları tarafından inhibisyonu mikrotübül ve F-aktin dinamiklerinde değişimlere yol açar (Purro ve ark, 2008).

Dinamik ve stabil mikrotübüller arasındaki denge, Slit'in Robo reseptörüne, nörotropin NGF'nin (sinir büyüme faktörü) TrkA (tirozin kinaz A reseptörü) reseptörüne ve Wnt ligandının Frizzled (Frz) ve ko-reseptörü düşük densiteli lipoprotein reseptör-ilişkili protein (LRP) reseptörüne bağlanması gibi sinyal yollarının da dahil olduğu büyüme konisine önderlik eden yollar tarafından düzenlenir (Şekil 7). Abl ve GSK3 gibi kinazların aktivitesiyle, bu yollar mikrotübüllere doğrudan bağlanan mikrotübülle ilişkili proteinler (MAP) ile

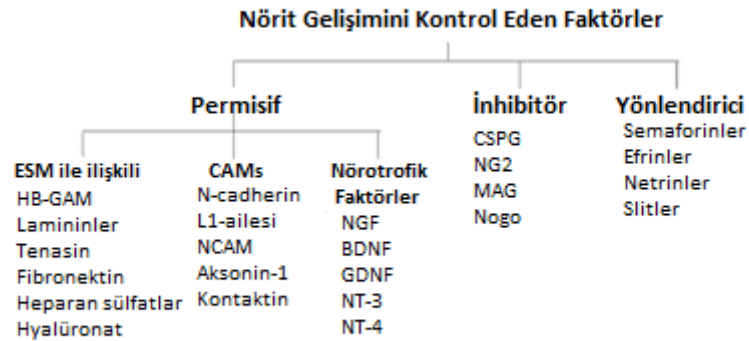
birleşerek MAP'lerin dinamik kararsızlığını değiştirir. Mikrotübül stabilitesindeki lokalize değişiklikler, mikrotübüllerin F-aktin ile etkileşimlerini düzenler ve akson büyümesi ve büyüme konisi oluşumunu kontrol eder (Geraldo ve Gordon-Weeks, 2009).



Şekil 7. Büyüme Konilerindeki İntraselüler Sinyal Yolaklarının Hücre İskeletiyle Birleşimi (Purro ve ark., 2008)

Nörit Gelişimini Kontrol Eden Faktörler

Nörit oluşumu ve yönlendirilmesi ekstraselüler alandan bir dizi sinyalin alınması ile gerçekleştirilir. Bu sinyaller pozitif (permisif), negatif (inhibitör ya da baskılayıcı) ya da klavuz (büyüme konisinin ilerlemesine rehberlik eden) şekilde olabilir (Şekil 8). Her sinyal ya diğer hücrelerin yüzeyinden veya ekstraselüler matriksten, ya da difüz olabilen sekresyon faktörlerinden doğar (Goodman, 1996).



Şekil 8. Omurgalı Sinir Sisteminde Nörit Büyümesini Kontrol Eden Faktörler (Kiryushko ve ark., 2004)

Pozitif Sinyaller

Ekstraselüler Matriks İle İlişkili Nörit Promotörleri

Ekstraselüler matriks, hücre adhezyonu ve migrasyonu gibi olaylarda hücre iskeleti gibi görev yapmasının yanı sıra ekstraselüler matriks reseptörleri ya da bu reseptörlere etki eden büyüme faktörleri ve sitokinler ile aynı zamanda bu olayları düzenleyen kompleks bir yapıdır (Zagris, 2001). Olgunlaşma aşamasındaki nöritlerin yönlendirilmesi ekstraselüler matrikste yer alan heparin bağlayıcı büyüme ile ilişkili molekül (HB-GAM), yapışkan glikoproteinler (laminin, tenasin, fibronektin) ve glikozaminler (hyalüronat, heparan sülfatlar) gibi moleküller tarafından gerçekleştirilir. Bütün bu faktörler gelişmekte olan beyinde yoğun bir şekilde salgılanır ve nörojenez indükler. Ekstraselüler matriks proteinleri tarafından indüklenen nörit büyümesi, hem ekstraselüler matriksle hücre adhezyonunun düzenlenmesi hem de intraselüler sinyal kaskatlarını harekete geçiren hücre yüzeyindeki reseptörlerin aktivasyonu sonucunda gerçekleşir (Kiryushko ve ark., 2004).

Nörotrofik Faktörler

Nörotrofinler olarak da adlandırılan nörotrofik faktörler, nöronal ve nöronal olmayan hücrelerde proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve ölümü etkileyen bir polipeptit ailesidir (Kim ve ark., 2004). Nörotrofinler, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 (NT-4/5) olmak üzere 4 tipten oluşur.

Sinir büyüme faktörü (NGF):

Biyolojik olarak aktif olan NGF, dimer yapıda 13-kDa'luk polipeptit zincirlerinden oluşur. Her zincirde zincirler arası 3 disülfid köprüsü bulunur. NGF geni insanda 1. kromozomda yer alır. NGF'nin bilinen iki reseptörü vardır. Bunlar; tirozin kinaz A reseptörü (TrkA) ve p75NTR'dir (Gigante ve ark., 2003). NGF, TrkA reseptörüne bağlandığında Trk sinyali olarak adlandırılan bir dizi olay başlar. Bu olaylar arasında kinaz aktivasyonu ile sonuçlanan tirozinlerin transfosforilasyonu ve reseptör dimerizasyonunu takip eden aktivasyon döngüsünün dışındaki tirozinlerin otosfosforilasyonunu da yer alır. Yardımcı proteinlerin aktivasyonu ve fosforilasyonu takiben reseptör-bağımsız sinyal yolları (Ras), fosfoinositid 3-kinaz (PI3), fosfolipaz C kinaz (PKC) yolağından oluşan bir sinyal kaskadı aktive olur (Sofroniew ve ark., 2001).

Beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF):

İnsan BDNF'ü çeşitli promotörlerle ilişkili 7 adet kodlanmayan ekzondan ve olgun BDNF proteinlerini şifreleyen bir adet kodlayıcı ekzondan oluşur (Liu ve ark., 2005). BDNF proteininin amino asit yapısı, NGF, NT-3 ve NT-4/5 ile %50 benzerdir. İnsan BDNF'inin beyinde ve nöronal olmayan dokularda ifade düzeyi oldukça yüksektir (Pruunsild ve ark., 2007). BDNF spesifik reseptörü TrkB'ye (Tirozin kinaz B reseptörü) bağlanır ancak selektif olmayan bağlanmayanlar da görülmektedir (Thoenen, 1995). Ligand ile indüklenen reseptör dimerizasyonu

kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır, takiben reseptör otofosforilasyonu ile intraselüler hedef proteinler (PLC- γ 1 (fosfolipaz C), p85 (PI-3 kinazın katalitik olmayan altünitesi) ve Shc (SH2-taşıyan sekans)) için spesifik bağlanma bölgeleri oluşur. Bu hedef proteinler de SH2 aracılığıyla aktive olmuş reseptöre bağlanırlar (Patapoutian and Reichardt, 2001). Bu olay Ras-MAP kinaz (*mitogen-activated protein*) ve c-AMP (siklik AMP) bağlayıcı protein (CREB) gibi çeşitli intraselüler kaskatların aktivasyonu ile sonuçlanır (Patapoutian and Reichardt, 2001, Segal, 2003).

Nörotrofin-3 (NT-3):

NT-3, hem nöral krestten türetilmiş periferik sinir sistemi, hem de santral sinir sisteminin gelişiminde rol oynayan nörotrofin ailesinin bir üyesidir (Chalazonitis, 2004). TrkC (tirozin kinaz C) ve kemokin reseptörlerine afinitesi oldukça yüksektir ancak TrkA ve TrkB'ye düşük afinite gösterir (Chen ve ark., 2013). Diğer nörotrofinler gibi tersiyer katlanma ve sistein düğümleri içeren bir yapıya sahiptir. İnsan NT-3'ünü kodlayan gen 12. kromozomda yer alır. NT-3 mRNA'sının dağılımı ve nöronal yapılardaki biyolojik aktivitesi NT-3'ü NGF ve BDNF'den kesin bir şekilde ayırmaktadır (Dhobale, 2014).

Nörotrofin-4/5:

NT-4/5 *Xenopus*'tan moleküler olarak klonlanmıştır. 6 sistein rezidüsü ve 2. ve 3. sisteinleri arasında 7 amino asit eklentisi taşır (Ip ve ark., 1992). İnsanda NT-4/5'i kodlayan gen 19. kromozomda yer alır. BDNF ile %95 oranında aynı amino asit sekansını taşır ve nörotrofin ailesinin kesilmiş prekürsör alanını taşıyan tek üyesidir. NT-4/5'in TrkB reseptörüne bağlanmasını takiben beyin gelişimi sırasında nöral tüpte nörojenez başlar ve daha sonraki gelişme aşamalarında farklılaşmayı düzenler (Bartkowska ve ark., 2010).

Hücre Adezyon Molekülleri (CAMs)

Santral sinir sistemindeki aksonal hedefleme ve spesifik sinaptik birleşimlerin, büyüme konilerinin adezyonundaki değişimlerle gerçekleştiği uzun yıllardır bilinmektedir (Sperry, 1963). Hücre adezyon molekülleri, hem hücre adezyonunu mekanik olarak kontrol eden hem de nörit büyümesi gibi yanıtlarla sonuçlanan intraselüler sinyal kaskatlarını harekete geçirebilen geniş bir protein ailesidir. Santral sinir sisteminde yer alan hücre adezyon molekülleri; N-cadherin, 2 adet Ig-CAMs, L1, ve nöronal adezyon molekülüdür. Santral ve periferik sinir sistemindeki bütün hücre adezyon molekülleri, nöronal hücre migrasyonu, miyelinasyon, nörit gelişimi ve aksonal yönlendirme sırasında ifade edilirler (Kiryushko ve ark., 2004).

İnhibitör Sinyaller

Sinir sistemi, nörit gelişimi, aksonal büyüme ve dallanmanın yanı sıra, sinir ağının olgunlaşması sırasında nöronal sinyallere de ihtiyaç duyar. Daha önce anlatıldığı gibi periferik sinir sisteminin aksine, santral sinir sistemi hasara, çeşitli ekstraselüler matriks proteinlerinin ve membranla ilişkili moleküllerin görev yaptığı reaktif gliosis ve gliyal yara iyileşmesi şeklinde cevap verir (Fawcett ve Asher, 1999). Hasarlı akson tam olarak eski haline dönemez ve ortadan kaldırılması gerekir.

Kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG), miyelinle ilişkili glikoproteinler (MAG) ve Nogo-A bu sinyaller arasında yer alır. CSPG'ler glial hücreler tarafından hem santral sinir sistemi gelişimi sırasında hem de hasar sırasında üretilir ve hücre adezyon moleküllerini inhibe ederek nörit büyümesini durdururlar (Bovolenta ve Fernaud-Espinosa, 2000) MAG, nörotropin reseptörü p75 ile (Yamashita ve ark., 2002), Nogo-A ise Rho GTPaz'lar ile etkileşime geçerek, büyüme konisi ile ilişkili GAP-43 (*growth associated protein*) gibi proteinlerin ifadesini inhibe eder (Ng ve Tang, 2002).

Nöronal Gelişime Klavuzluk Eden (Yönlendirici) Moleküller

Akson ve dendritler, rejenerasyon ve gelişme sırasında oldukça katı bir disiplin içerisinde hareket ederler. Büyüme konileri olarak adlandırılan oldukça hassas ve hareketli bir yapı tarafından yönlendirilirler. Büyüme konisinin periferinde yer alan uzun çıkıntılar olan filopodia F-aktin demetlerinden oluşur. Aktin polimerizasyonu ve filamentin ters yöne akımı arasındaki ilişkiye bağlı olarak F-aktin demetleri uzar ya da kısalır (Mallavarapu ve Mitchison, 1999). En iyi karakterize edilmiş klavuz moleküller; semaforin, efrin, netrin ve slitlerdir.

Nörit Gelişiminde Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)'nin Rolü

Matriks metalloproteinazlar Zn^{+2} bağımlı bir endopeptidaz ailesidir (Ould-Yahoui ve ark., 2013). Ekstraselüler matriks, organizmalara yapısal destek olmasının yanı sıra, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma, doku morfogenezini gibi pek çok biyolojik aktivitede rol oynayan, ekstraselüler matriks proteinleri ve proteoglikanları da içeren karmaşık bir yapıdır. Ekstraselüler matriksin sentezi, parçalanması ve yeniden yapılanması sırasında MMP'lar aktif rol oynar. MMP'lar ekstraselüler matriksi parçalayabilme özelliğine sahiptirler. Tüm MMP'lar proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi hücrelerden salgılanırlar (Apakkan ve ark., 2001).

Santral sinir sistemi gelişimi sırasında, hücre migrasyonu, nörit gelişimi ve sinaptik plastisite gibi olaylarda MMP-2 önemli rol oynar (Galko ve Tessier-Lavigne, 2000; Webber ve ark., 2002). MMP-2, büyüme konisinde yer alır ve nörit gelişimi sırasında, santral sinir sisteminin ekstraselüler matriks proteinleri arasında yer alan kondroitin sülfat proteoglikanlarını (CSPGs) proteolitik olarak parçalar (Hayashita ve ark., 2001). CSPG'lar aksonal dallanma ve hücre migrasyonu inhibe eden astrositler tarafından üretilirler. Santral sinir sisteminde hasar ya da dejenerasyon sonrasında, inhibitör özellikteki CSPG salınımı artar (Ferguson ve Muir, 2000). Periferik sinir sisteminde, rejenerasyonu destekleyici, permisif ortam sayesinde hasar sonrasında, akson rejenerasyonu kısa sürede gerçekleşmektedir. Santral sinir sisteminde ise CSPG gibi inhibitör proteinler glial yara oluşum süreçlerine katılır ve hasar bölgesindeki aksonal rejenerasyon önlenir.

MMP'lar, birçok biyoaktif molekülün salınımını sağlayarak hücre davranışlarını kontrol eden anahtar enzimlerdendir (Zhang ve ark., 2007). Proteolitik-aracılı salınımla ekstraselüler matrikste tutulmuş olan büyüme ve anjiyojenik faktörlerin

hareketliliğini MMP'lerin sağlayabileceği düşünülmektedir (Chang ve Werb, 2001). Alternatif olarak nörotrofik etkilerini, nörotrofik faktör aktivitesini düzenleyerek gösterirler. Buna kanıt olarak, bazı MMP'ların, BDNF ve NGF gibi nörotrofik faktörlerin inaktif formları üzerindeki proteolitik süreçlerde etkili olmaları ve aktif formlarına dönüşmelerini sağlamaları gösterilebilir (Lee ve ark., 2001). Bu nedenle, MMP'lar hücrenin fizyolojik ve patolojik durumlarda migrasyonu gibi temel fonksiyonların sürdürülebilmesi için esansiyeldir. Sinir sisteminde, fizyolojik ve patolojik doku modellemesi sırasında hücre hareketliliğini MMP'lerin sağladığına dair kanıtlar giderek çoğalmaktadır (Ould-Yahoui ve ark., 2013).

EPIGENETİK

1942 yılında Biyolog Conrad Waddington, epigenetiği “fenotipleri meydana getiren genler ve onların ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri araştıran biyolojinin bir dalı” olarak tanımladı (Waddington, 2012). Epigenetik, mevcut DNA sekansının ötesinde faaliyet gösteren bir olgu olmakla birlikte, DNA sekansında yer alan temel bilgiler epigenetik elemanların organizasyonunda önemli rol oynar. Bu nedenle, özellikle CpG adaları gibi DNA dizisinde tekrar edilen elemanlar kromatin organizasyonunun olduğu kadar epigenetik işleyişin de fonksiyonel bileşenleridir. Epigenetik mekanizmalar; DNA dizisinde bir değişim içermeyen ve hücre döngüsü boyunca gerçekleşen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler; genetik modifikasyonlardan farklı olarak geri dönüşebilme potansiyellerine sahip olma, genomda yakındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edilebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Egger ve ark., 2004). Çeşitli histon proteinleri ve histon olmayan proteinler, genomu paketleyen dinamik proteinlerdir. ATP'yi yeniden düzenleyen faktörler kadar bu proteinlerin ve DNA'nın katyonik modifikasyonları da epigenetik bilginin saklanması, sürdürülmesine ve yayılmasına katkıda bulunur. Çeşitli evrimsel yolların bir sonucu olarak bu DNA ve protein elemanları, spesifik sinyal cevaplarını ve genom fonksiyonunu kolaylaştıracak yönde kademeli bir şekilde karmaşıklığa doğru evrimleşmiştir (Kumari ve ark., 2013).

Moleküler biyolojinin gelişimiyle birlikte epigenetik terimi gen ifadesinde, DNA dizisini değiştirmeden, kalıtsal ve potansiyel olarak geri dönüşümlü şekilde ortaya çıkan değişiklikler şeklinde yeniden tanımlanmıştır (Sigalotti ve ark., 2010). Bu olayın moleküler temeli karmaşık bir olaydır ve belli genlerin aktivasyonunun ne zaman ve nasıl olacağını belirler (İzmirli, 2013).

Epigenetik mekanizmaların depresyon, şizofreni, madde bağımlılığı, bilişsel işlev bozuklukları gibi hastalıklarda ve nörojenesis, nöronal plastisite, öğrenme ve bellekte rol oynadığına dair çok sayıda delil bulunmaktadır (Erol ve ark., 2010).

Gen ifadesi temel olarak iki mekanizmayla düzenlenmektedir (Jiang ve ark., 2004):

1. Dolaylı Yoldan Gen İfadesini Kontrol Eden Mekanizmalar:

Transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerinin düzenlenmesi, yani post-transkripsiyonel mekanizmaları özellikle de nonkoding RNA'nın (siRNA, miRNA vb.) mRNA'yı etkileyerek protein sentezini engellemesini içerir.

2. Doğrudan Gen İfadesini Kontrol Eden Mekanizmalar:

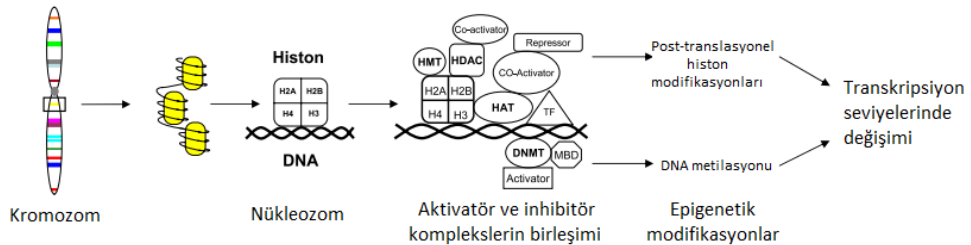
DNA ve kromatinde meydana gelen kovalent modifikasyonlardır (epigenetik kontrol) (Holliday, 2006).

Kanser ve pek çok diğer hastalıkta, genetik değişikliklerle uyum içinde çalışan epigenetik mekanizmalar, histon modifikasyonlarını değiştirerek transkripsiyonel kontrolün bozulmasına neden olabilir. Genetik değişikliklerin aksine, transkripsiyonel kontrolün epigenetiksel mekanizmaları, DNA dizisinin bütünlüğündeki bir değişiklikten bağımsız olarak gen ekspresyonundaki değişimleri içerir (Jones ve Baylin, 2002). Hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma, DNA onarımı, hücre döngüsünün kontrolü ve apoptoz gibi pek çok hücrel işlem epigenetik bozukluklardan etkilenir. Bu nedenle, terapötik açıdan, geri dönüşümlü epigenetik değişimleri hedeflemek, daha stabil haldeki genetik mutasyonları hedeflemekten daha cazip bir yöntem olabilir. Bazı kanserler belirgin histon modifikasyon profilleri gösterirler. Bazı çalışmalar, spesifik histon modifikasyonlarının kanser prognozu için işaretçi olabileceğini (Kurdistani, 2007), hatta nüks olasılığını öngörebilmemiz için kullanılabileceğini göstermiştir (Seligson ve ark., 2005).

Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar üç ana başlıkta toplanmaktadır:

1. DNA metilasyonu,
2. Histon modifikasyonları,
3. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing) (**Şekil 9**) (Egger ve ark., 2004).



Şekil 9. Epigenetik Modifikasyonların Transkripsiyon İle İlişkisi (Shukla ve ark., 2008)

DNA Metilasyonu

Epigenetik modifikasyonların en stabil formu, gen ekspresyonunun baskılanmasına katkıda bulunan DNA metilasyonudur (Bird, 2002). Memeli genomunda en yaygın olarak görülen epigenetik modifikasyondur. Omurgalı DNA'sındaki C-G baz çiftlerinin %70'ten fazlası metillenmiş durumdadır (Erol ve ark., 2010). S-adenozil metiyonindeki (SAM) metil grubunun, guaninden (G) önce yerleşmiş sitozine (C) transferi ile katalizlenerek 5-metil sitozin (5mC)'in oluşumunu içermektedir (Bird, 1986). Sitozin metilasyonu yapısal ve fonksiyonel olarak birbirinden ayrılan DNA metiltransferaz enzimleri(DNMTs) tarafından katalizlenir (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) (Bird, 2002; Miranda ve Jones, 2007; Greenberg ve ark., 1986; Laird, 2003). Metilasyona hedef olan CG dizileri tüm genom içerisinde eşit olarak dağılmamıştır ve başlıca CpG adalarında, orta uzunluktaki rDNA (ribozomal

DNA) tekrar dizilerinde, sentromerik tekrar dizilerinde ve satellit tekrar dizileri içerisinde bulunmaktadır (Gardiner-Garden ve Frommer, 1987). Modifiye edilmiş histonlar gibi metillenmiş CpG nükleotidleri de transkripsiyonel baskılayıcıları çalıştırarak ya da transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek gen ekspresyonunu düzenlerler (Miranda ve Jones, 2007; Greenberg ve ark., 1986). Bu metillenmenin canlıdan canlıya ve dokudan dokuya göre değiştiği bilinmektedir. Metillenmenin dokuya özgü olması nedeniyle, metillenme bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır (Lüleyap, 2008).

DNA metillenmesi, DNA'nın yapısında bazı değişikliklere yol açarak bir grup metil CpG bağlanma proteininin(MeCPs) tanıma bölgesini oluşturur. Bu bölgelere metil-CpG bağlanma domaini(MBD) ile bağlanan birçok transkripsiyon repressörü vardır. Bu proteinlerden biri olan MeCP2, Sin3a/HDAC(histon deasetilaz) olarak tanımlanan bir histon modifiye edici kompleksin bileşenleri arasındadır. MeCP2, tek bir metillenmiş CpG çiftine bağlanabilen bir MBD'ye ve transkripsiyon baskılayan bir TRD (transcription repressor domain) domainine sahiptir. DNA metillenmesinin, dolaysız olarak gen ifadesini etkilediği modelde, metillenme sonucu oluşan tanıma bölgelerindeki histonların deasetilasyonunun, gen ifadesini baskılayan bir kromatin yapısına yol açtığı öne sürülmüştür (http-6).

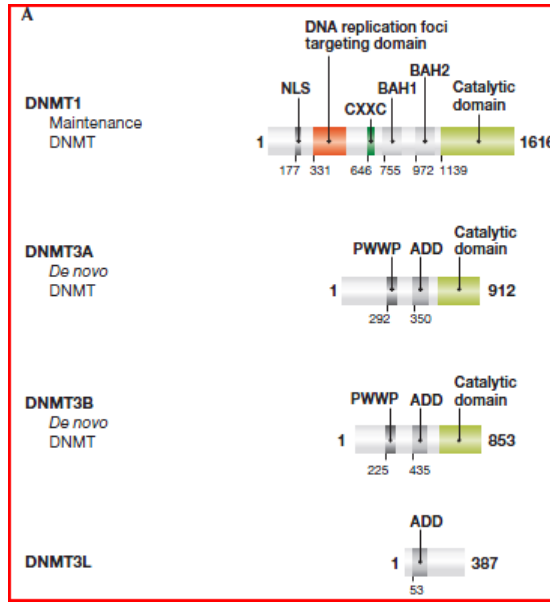
Genomda tekrar dizilerinin ve transpozonların bulunduğu heterokromatinin CpG bölgelerinde metilasyon oranı yüksek görülmekte, bu sayede transkripsiyon baskılanmakta ve transpozonların genom içerisindeki hareketi engellenerek kromozomun kararlı halde kalması sağlanmaktadır (Egger ve ark., 2004; Robertson, 2005). DNA metilasyonu en sık çalışılan epigenetik mekanizma olup, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısı, X-kromozom inaktivasyonu, genomik "imprinting" in düzenlenmesi ve kromatin kararlılığının korunmasında fonksiyon görmektedir (Robertson, 2005). DNA metilasyonunun transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metilli DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek genlerin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir (Bora ve Yurter, 2007). Genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon seviyesinin düşük olması genin aktifliği ile ilişkilidir.

DNA Metiltransferazlar

DNA metilasyonu, ökaryotlarda epigenetik regülasyonun anahtar mekanizmasıdır. DNA metiltransferazlar, memeli DNA'sında CG dinükleotidleri arasındaki sitozin kalıntılarında 5. karbonun metilasyonunu ve devamlılığını sağlar. Genomik metilasyon kalıpları en az iki gelişim periyoduyla oluşur; bunlar yaygın gelişme potansiyeli olan germ hücreleri ve preimplantasyon dönemindeki embriyolardır. Daha sonra farklılaşmış somatik hücrelerdeki uygun DNA metilasyon kalıplarının kalıtımıyla onarım mekanizmaları sağlanır (Reik ve ark., 2001). Buna ek olarak, memeli DNA metilasyonu pluripotensi sürdürmek, X-kromozom inaktivasyonu ve genetik imprintingde kritik rol oynar (Bird, 2002). Ayrıca DNA metilasyonu kromozom stabilitesini sağlamak için transpozonları susturarak genom bütünlüğünü korur (Goll & Bestor, 2005; Howard ve ark.,2008). Anormal DNA metilasyonu, kanser de dahil pek çok patoloji için en iyi karakterize edilmiş epigenetik özelliktir (Robertson, 2005). Kanser hücreleri, spesifik promotörlerin hipermetilasyonu ile olabileceği gibi, genel ve gen-spesifik DNA metilasyon

kaybıyla da karakterizedirler (Jones & Baylin, 2007; Portela & Esteller, 2010). Ayrıca DNA metiltransferazların bozulmuş ekspresyonunun, prostat, kolorektal, meme ve hepatomalar dahil olmak üzere çeşitli insan kanser tiplerinde rol oynadığı (Miremedi ve ark., 2007) ve DNA metiltransferaz bozukluklarının embriyonik fare ölümüne yol açtığı da (Li ve ark., 1992) bildirilmiştir.

DNA metiltransferazlar, memeli genomlarında S-adenozilmetiyonin'den sitozine bir metil grubunun transferine aracılık eden tek enzim olarak bilinmektedir (Goll & Bestor, 2005). Enzimatik olarak aktif olan 3 DNA metiltransferaz vardır. Bunlar DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'dir. Bu enzimlerle ilişkili olarak katalitik aktiviteden yoksun, düzenleyici DNMT3L enzimi de bulunmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. DNA Metiltransferaz Enzimleri (Denis ve ark., 2011)

Metillenmiş sitozin rezidüleri genellikle bir guanin nükleotidinde bitişiktir, sonuç olarak iki metillenmiş sitozin rezidüsü karşıt DNA ipliklerinde çapraz şekilde durmaktadır. DNMT enzim ailesinin değişik üyeleri, metil gruplarının DNA dizisine ilk kez yerleştirilmesi sırasında görev yapan de novo DNMT'lar, ya da metillenmiş bir DNA dizisinin replikasyonundan sonra yeni zincire metilasyonu kopyalayan DNMT'lar olarak görev yaparlar (Phillips, 2008).

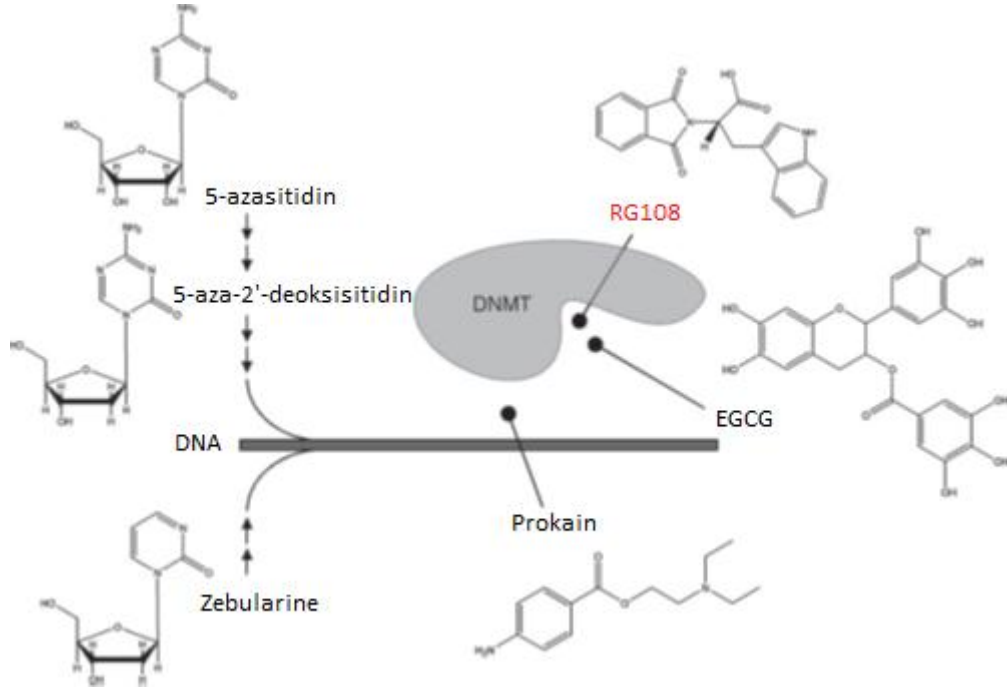
DNA Metiltransferaz İnhibitörleri

Nükleozid DNMT İnhibitörleri

İlk sentezlenen DNMT inhibitörü olan 5-azasitidin, sitidin nükleozidinin basit bir türevidir ve ilk kez 40 yıldan uzun bir süre önce tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda demetilaz aktivitesinin, hücrel farklılaşmayı etkilemesinden kaynaklandığı keşfedilmiştir (Jones ve Tyler, 1980).

5-azasitidin, DNA ile birleşik hale gelen bir nükleozid inhibitörüdür. DNA metiltransferazlar, DNA'daki hem sitozin rezidülerini hem de 5-azasitozin rezidülerini metillerler. Bununla birlikte, 5-azasitozin ara bir kovalent reaksiyon oluşmasını önler, bu da DNA metiltransferazın kovalent protein-DNA birleşimi

şeklinde kalıp inaktive olmasını sağlar. Bunun sonucu olarak, hücrede DNA metiltransferaz hızla tüketilir, ve eş zamanlı olarak genomik DNA devam eden DNA replikasyonu sonucu demetile edilmeye devam eder. 5-azasitidin bir riboz nükleotididir, bu nedenle DNA'ya katılabilmesi için deoksiribonükleozid trifosfata dönüşmesi gerekmektedir. Bu nedenle tüm 5-azasitidin, deoksiribonükleozid trifosfata dönüşmeden önce bir kısmı RNA'ya da katılmaktadır. Bu da ribozom biyogenezi gibi çeşitli RNA fonksiyonlarını etkilemektedir ve sonucunda demetilasyondan bağımsız hücrede sonuçlar doğmaktadır (Şekil 11) (Momparker ve ark., 1984).



Şekil 11. DNMT İnhibitörleri Ve İnhibitör Mekanizmaları (Lyko ve Brown, 2005)

Diğer bir DNA metiltransferaz inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisisitidin (Desitabin), 5-azasitidin deoksiriboz analogudur. Bu bileşik, deoksi formu oluşturmadan doğrudan DNA'ya katılabilmektedir. Bu nedenle desitabin 5-azasitidine göre daha spesifik ve toksisitesi daha azdır. Desitabin ve 5-azasitidin; 5. pozisyondaki karbon atomunun bir nitrojen atomuyla yer değiştirdiği ve bir riboz ya da deoksiriboz bağlandığı iki sitidin analogudur (Constantinides ve ark., 1977, Constantinides ve ark., 1978). Bu analoglar hücreye hCNT1 (*human concentrative nucleoside transporter*) tarafından taşındıktan sonra, fosforilasyona uğrarlar ve trifosforile aktif formlarına dönüşürler. Riboz analogları hem RNA hem de DNA'ya katılırken, deoksiriboz analogları sadece DNA'ya katılır. Bu bileşiklerin aktif hale geçmesi için hücre siklusunun S fazındaki (replikasyon) genoma katılmaları gerekmektedir. Bu nedenle özellikle hızlı bölünen kanser hücrelerine karşı oldukça spesifiklerdir (Momparker, 2005). Sitozin analogları DNA'ya katıldıklarında DNMT'lar tarafından tanınırlar ve normal sitozinler gibi enzimin katalitik sisteminin ve sitozin analoglarının 6. pozisyonu arasında kovalent bir bağ oluştururlar. Ancak, sitozinin aksine β -eliminasyon reaksiyonu 5. pozisyondaki nitrojen atomu nedeniyle

gerçekleşemez ve böylece geri dönüşsüz bir kovalent kompleks oluşur (Santi ve ark., 1984). Böylece enzimin proteazomal degradasyonu gerçekleşir (Yang ve ark., 2010). Aynı mekanizma 5-fluoro-2'-deoksisitidin için de geçerlidir. Desitabin, DNA metilasyonunu daha iyi oranda inhibe etmekte ve deneysel modellerde daha iyi antitümör aktivite göstermektedir (Mompalao ve ark., 1984).

Nükleozid DNMT inhibitörlerine son olarak katılan diğer bir bileşik ise 5-azasitidinin farklı bir türevidir olan zebularindir (Zhou ve ark., 2002). Çeşitli kimyasal modifikasyonlardan sonra diğer sitozin analogları gibi zebularin de DNA ile birleşmektedir. 5-azasitidin ve desitabinden daha stabil bir bileşiktir ve bu nedenle daha az toksiktir. Oral yoldan alınan zebularinin farelerde farkedilir demetilasyona yol açtığı ve tümör büyümesini inhibe ettiği kaydedilmiştir (Cheng ve ark., 2003).

Sonuç olarak, birinci kuşak DNMT inhibitörleri olarak da bilinen, sitozin analogu olan bu bileşiklerin sitotoksitesisi terapötik ajanlar olarak kullanılmalarını sınırlamaktadır. Bununla birlikte, epimutasyonları tersine çevirmekte yararlar gözetilerek risklerinin azaltılıp verimlerinin artırılması için daha fazla klinik çalışma gerekmektedir.

Nükleozid Olmayan DNMT İnhibitörleri

Nükleozid olmayan başka bileşikler de DNA metiltransferaz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Bu bileşikler DNMT aktivitesini doğrudan bloke etmekte ve enzimin kovalent tutulumundan doğan sitotoksitesiyi göstermemektedir.

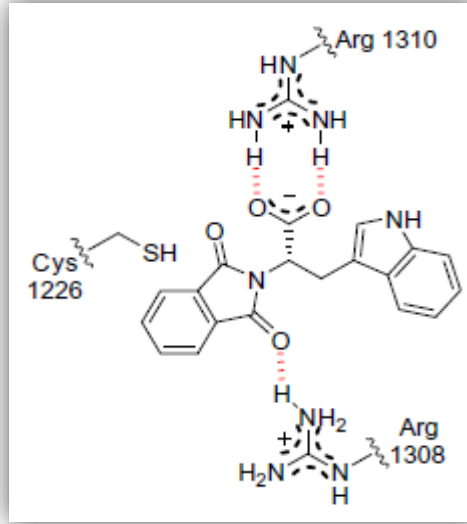
(-)-epigallocateşin-3-gallat (EGCG), yeşil çayın ana polifenol bileşeni olan bir nükleozid olmayan DNMT inhibitörüdür. EGCG pek çok biyolojik yolağı etkilemektedir (Moyers ve Kumar, 2004). Protein ekstraktlarında ve insan kanser hücre hatlarında DNMT aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Fanz ve ark., 2003). Ancak, EGCG parçalanması önemli miktarda güçlü bir okside edici ajan olan hidrojen peroksit açığa çıkmasına neden olur. DNA metiltransferazların ve diğer proteinlerin oksidasyonu bu bileşiğin hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisinin nedeni olabileceği açıklanmıştır (Nakagawa ve ark., 2004).

Nükleozid olmayan DNMT inhibitörleri pek iyi karakterize edilememiş üç ilave grup daha içermektedir. Bu gruplardan ilki, 4-aminobenzoik asit türevleridir. Antiaritmik bir ilaç olan prokainamid ve lokal anestetik olan prokain, hücre analizlerinde (Lin ve ark., 2001) ve fare xenograft tümörlerinde demetilleyici aktivite göstermiştir (Villar-Galea ve ark., 2003). Prokain, CpG'nin yoğun olduğu dizilerde bağlanarak DNMT'ların DNA'ya bağlanmasını önlemektedir (Lin ve ark., 2001). Fakat prokainin bu etkisine 100-500 µM gibi yüksek konsantrasyonlarda ulaşılmaktadır ve test edilen bütün hücre hatlarında etkinlik görülemediği (Nieto ve ark., 2004). *Pseudoceratina purpurea* süngerinden elde edilen psammoplidler hem DNMT hem de HDAC aktivitesini inhibe etmektedir, ancak inhibisyon mekanizmalarının açığa kavuşturulması gerekmektedir (Pina ve ark., 2003). Bir diğer DNMT inhibitör grubu ise hairpin loopları ve MG98 gibi spesifik karşı zincir oligonükleotidlerdir. Hairpin loopları, fare eritrolösemi hücrelerinde DNMT enziminin yarışmalı substratı olarak kullanılmıştır ve insan HT29 kolon karsinoma

hücrelerinde az miktarda indüklenen p16 tümör supresör geninin indüklenmesini sağlamıştır.

RG108(N-ftalil-l-triptofan)

Nükleozid olmayan DNMT inhibitörlerinden biri olan RG108'in keşfi sırasında, hücrelerde DNA metilasyonu kalıplarının kalıtımını sağlayan replikasyon mekanizması ile ilişkili DNMT1 enziminin katalitik alanı, bakteriyel metiltransferazların (*M. HhaI*, *M. HaeIII*) ve insan TRDMT1'in kristal yapısı incelenerek 3 boyutlu bir şekilde belirlenmiştir (Siedlecki ve ark., 2003). Daha sonra bu model küçük-molekül veritabanında (NCI veritabanı) *in silico* tarama için kullanılarak kimyasal formülü 2-(1,3-diokso-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)-3-(1H-indol-3-il)propanoik asit olan RG108, bir DNMT inhibitör adayı olarak seçilmiştir (Gaudet ve ark., 2003).



Şekil 12. RG108'in DNMT1'in Aktif Bölgesine Bağlanma Şekli (Takayoshi ve ark., 2010)

Bilgisayar ortamında yapılan bu çalışmada öngörüldüğü üzere ftalimidin karbonili ve karboksilat anyonu arjinin 1310 ve 1308 ile hidrojen bağı yaptıktan sonra DNMT1 enziminin aktif bölgesindeki sistein 1226 grubunun yanında konumlanır (Şekil 12). Böylece RG108'in karbonil grubu 6. pozisyondaki sitozinle aynı seviyede yer alarak katalitik sisteindeki tiyolat ile sitozin arasında kovalent bir bağ oluşmasını engelleyerek substratın enzimin katalitik cebine bağlanmasını engeller (Suzuki ve ark., 2010).

RG108, *in vitro* ortamda HCT116 ve NALM6 (lösemi) hücrelerinde 100 µM konsantrasyonda *M. Sssl* ve insan DNA metilasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca, HCT116 hücre hattında promotör metilasyonu tarafından baskılanan P16^{INK4a} ve TIMP3 gibi tümör baskılayıcı genleri reaktifte ettiği kanıtlanmıştır. RG108 ile muamele edilmiş hücrelerin genomundaki bisülfid dönüşümlerinin ardından yapılan sekans analizinde, bu promotör genlerin demetilasyona uğradığı gösterilmiştir. Bu

çalışmada ayrıca diğer DNMT inhibitörlerinden farklı olarak RG108 ne sitotoksik ne de genotoksik etki göstermiştir (Stresemann ve ark., 2006).

Shoumei ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada, hücre ya da dokuya özgü farklılaşmada epigenetik yeniden programlamanın rolünün anlaşılabilmesi için PC-12 hücrelerinin NGF ile indüklenerek nöronal hücrelere dönüşümünde DNA metiltransferazların rolü araştırılmıştır. Bu çalışmada farklılaşma sırasında DNMT1 ve DNMT3a enzim seviyelerinin oldukça azaldığı, DNMT3b'nin ise arttığı bulunmuştur (Shoumei ve ark., 2005).

1997 yılında Stephan ve Kilpatrick tarafından yapılan bir çalışmada ise, helix-loop-helix proteinlerinden olan Id1, Id2 ve Id3'ün NGF ile indüklenen farklılaşma sırasında inhibe edildiği, bir DNMT inhibitörü olan 5-azasitidin'in ise Id1, 2 ve 3'ün gen ekspresyonunu artırdığı, bu nedenle NGF ile indüklenen farklılaşmayı inhibe ettiği söylenmiştir (Stephan ve Kilpatrick, 1997).

Miller ve Sweat tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, sıçanlarda korku şartlanması eğitiminden sonra hipokampal DNMT mRNA ekspresyonunda artış görülmüştür. Hipokampusun CA1 bölgesindeki DNMT'ların 5-aza-deoksititin ve zebularine ile inhibisyonundan sonra donma davranışının belirgin ölçüde azaldığı bu nedenle DNMT'ların anıların bir araya getirilmesinde gerekli olduğunu öne sürmüştür. DNA metilasyonunun bellek baskılayıcı gen olan PP1'in susturulmasını önlediği düşünülmüştür. Ancak korku şartlanması bazı *reelin* gibi spesifik genlerin metilasyonunda artışa da neden olmuştur. Reelin, nöronal migrasyon ve nöroplastisite sırasında yüksek miktarda ifade edilen hücre-hücre kontrollerinden sorumlu bir ekstraselüler matriks glikoproteinidir (Weeber ve ark., 2002; D'arcangelo, 2005). Bu verilere göre bellek formasyonu ve nöroplastisite sırasında DNA'nın metilasyon süreçlerinin oldukça dinamik olduğu söylenebilir (Miller ve Sweat, 2007).

Hidroksi-metillenmiş sitozin rezidülerinin keşfinin ardından DNA'nın epigenetik kontrolünün ve bu rolün nöroplastisite üzerine etkilerinin anlaşılması daha da karmaşıklaşmıştır. Hidroksi-metillenmiş sitozin rezidülerinin aktif genler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tahiliani ve ark., 2009). Bütün bu verilere dayanarak DNA demetilasyonunun beyin ve nöroplastisite üzerine etkilerinin açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

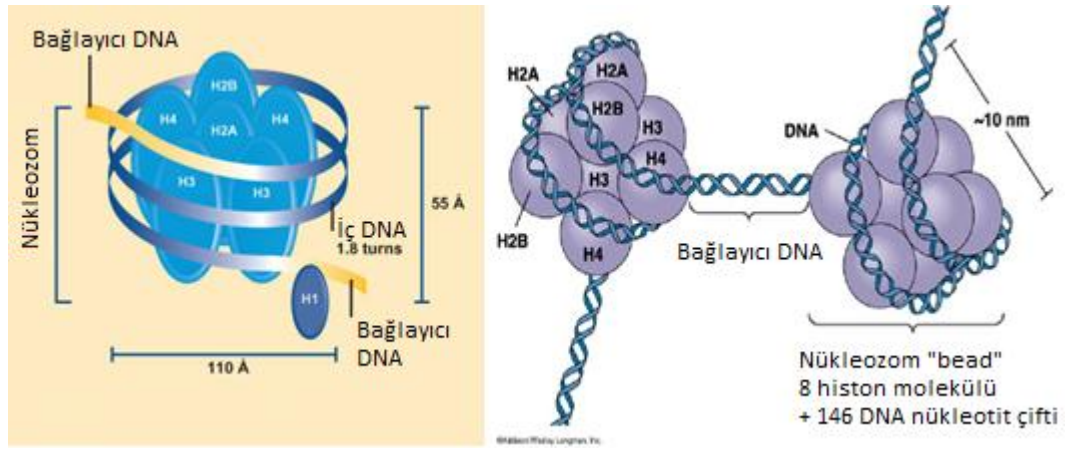
Histon Modifikasyonları

Histonlar, ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde yer alan ve DNA'nın nükleozomlar halinde paketlenmesini sağlayan, lizin ve arjinince zengin olan bazik proteinlerdir. Histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar ve bir takım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinleri nükleozomun çekirdek bölümünde yer almaktadırlar. Nükleozomlar, iki H3-H4 dimeri ve iki H2A-H2B dimerinin birleşmesiyle oluşan oktamerik yapıdaki proteinlerdir ve bu dimerler birbirlerine H1 histonları aracılığıyla bağlanırlarlar (**Şekil 13**) (Campos ve Reinberg, 2009).

Histon modifikasyonları, H3 ve H4 histonları ile H2A ve H2B histonlarının ana gövdesinin N-terminal uçlarında gerçekleşmektedir. Bu histonların amino asit

artıkları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, ADP-ribozilasyon ve sumoylasyon ile kovalent bir şekilde modifiye edilebilmektedirler (Shukla ve ark., 2008).

Histonlar, basit kimyasal modifikasyonlarla DNA'nın bağlanma ve diğer düzenleyici faktörlerin DNA ile etkileşebilme özelliklerini değiştirerek, gen aktivasyonunda da değişimine yol açmaktadırlar. Bu kovalent modifikasyonların, kromatinin çeşitli evrelerde kompaktlaşması ve kıvrılmasına yol açarak transkripsiyonel mekanizmaları etkilediği düşünülmektedir. Transkripsiyonel açıdan, mikroskopik incelemede az yoğun (ökromatin) olarak görülen kromatin bölgelerin yüksek oranda aktif, çok yoğun (heterokromatin) bölgelerin ise sessiz olduğu gözlenmiştir. Histon modifikasyonları, histon asetil transferazlar ve histon deasetilazlar gibi özgül enzimler aracılığıyla yürütülmektedir (Cairns, 2009).



Şekil 13. Nükleozomun Yapısı ([http-7](#), [http-8](#))

Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyonu ilk olarak 1964 yılında Allfrey ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır (Allfrey ve ark., 1964). Daha sonra, lizin asetilasyonunun birbirine zıt şekilde çalışan iki enzim ailesi olan histon asetiltransferazlar (HATs) ve histon deasetilazlar (HDACs) tarafından dinamik biçimde düzenlendiği gösterilmiştir.

Histon asetiltransferazlar, asetil CoA'yı kofaktör olarak kullanır ve bir asetil grubunun lizinin ϵ -amino yan zincirine transferini katalizler. Böylece lizinin pozitif yükü nötralize edilmiş olur ve histonlar ile DNA arasındaki etkileşimler zayıflar (Xhemalce ve ark., 2011). İki tip histon asetiltransferaz enzimi vardır. Bunlar tip A ve tip B sınıfıdır. Tip B enzimleri, genellikle sitoplazmada bulunur ve henüz kromatin yapısına katılmamış serbest histonları asetiller. Tip A enzimleri, tip B sınıfından daha çeşitli bir sınıftır ve GNAT, MYST ve CBP/p300 aileleri olmak üzere üç grupta toplanabilir (28).

Histon Deasetilaz Enzimleri

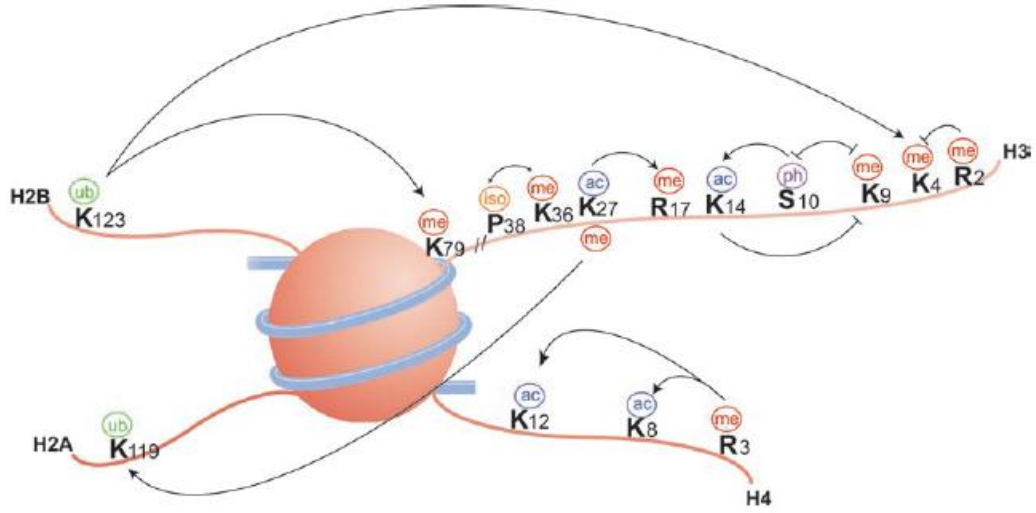
Histon deasetilazlar, histonlar ve diğer proteinlerde ve transkripsiyon gibi temel hücresel aktivitelerde protein asetilasyonu homeostazisinde anahtar rol oynarlar. Bozuklukların geniş bir kısmı protein asetilasyon seviyelerindeki dengesizlikler ve transkripsiyonel işlevsizlikler ile ilişkilidir. Çeşitli histon deasetilaz inhibitörleri ile bu bozuklukların tedavisi nörodejeneratif hastalıklarda umut vadeden yeni bir yaklaşımdır. Ayrıca histon deasetilaz inhibitörlerinin nöroprotektif, nörotrofik ve

antiinflamatuvar özelliklerinin; nörolojik performansı artırıcı ve öğrenme/bellek üzerine etkileri olduğu bilinmektedir (De Maw ve ark., 2009).

Histon deasetilaz enzimleri, lizin asetilasyonunu tersine çevirerek yeniden pozitif yük kazanmalarını sağlar. Bu olay lokal kromatin mimarisini güçlü bir şekilde stabilize eder bu nedenle histon deasetilazlar çoğunlukla transkripsiyonel baskılayıcılardır. Histon deasetilaz enzimleri; maya scRpd3 ve scHda1 ile yakınlık gösteren enzimleri taşıyan sınıf I ve II, maya scSir2 homoloğu olan sirtuinler olarak bilinen sınıf III, ve sadece HDAC11'den oluşan sınıf IV olmak üzere 4 sınıftan oluşmaktadır. Diğer iki sınıfın aksine sınıf III HDAC enzimleri kofaktör olarak NAD⁺'e ihtiyaç duymaktadır. HDAC'lar genel olarak düşük substrat spesifitesi göstermektedir. Tek bir enzim histonlar üzerindeki pek çok alanı deasetile edebilmektedir (Matsuyama, 2002).

Kromatinle ilişkili histon proteinlerinin asetilasyon ve deasetilasyonu, nöronlar da dahil olmak üzere hücrelerdeki transkripsiyon ve diğer fonksiyonların epigenetik kontrolünde çok önemli bir role sahiptir (Mai ve ark., 2005; Kazantsev ve Thompson, 2008). Protein asetilasyonu, kromatinin yeniden yapılanması (Devile ve Spencer, 1999; Bhaumik ve ark., 2007), transkripsiyonun düzenlenmesi, mikrotübül dinamikleri ve intraselüler transport (Hubbert ve ark., 2002; Matsuyama, 2002), metabolizma ve yaşlanma (Michan ve Sinclair, 2007) dahil olmak üzere pek çok hücreyel fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan önemli bir post-transkripsiyonel modifikasyondur. Spesifik lizin rezidülerine bir asetil grubunun kovalent bağlanması sonucu gerçekleşen modifikasyon pek çok protein ve protein kompleksinin biyolojik fonksiyonun düzenlenmesini sağlar (Kim ve ark., 2006; Gregoire ve ark., 2007). Hücrelerde protein asetilasyonu dinamiktir ve yapısal olarak birbirine antagonistik olan iki enzim sınıf tarafından sürdürülür: bunlar protein asetilazlar ve deasetilazlardır (Kouzarides, 2007). Histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar(HDAC), histon proteinlerinin lizin (K) rezidülerinde, sırayla, asetilasyon ve deasetilasyonunu katalize ederler. HAT ve HDAC arasındaki bu etkileşim, histon asetilasyon seviyesinin dengesini değiştirerek kromatinin yapısını yeniden düzenler (De Maw ve ark., 2009).

Genel olarak, histon kuyruk proteinlerinin asetilasyonundaki artış, açılmış ve gevşemiş kromatin yapısıyla sonuçlanır. Böylelikle spesifik gen promotörleriyle transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi artar ve gen ekspresyonu aktive olur. HDAC, genellikle gen ekspresyonunun susturulmasında represör transkripsiyonel kompleks olarak görev alır ve histon protein deasetilasyonu yoluyla kromatinin sıkışık hale gelmesini sağlar. Benzer şekilde, HDAC inhibisyonu da kromatin gevşemesi ve gen ekspresyonu yoluyla artmış histon asetilasyonu yönünde dengeyi sağlar (De Maw ve ark., 2009). Örneğin; transkripsiyonu baskılanmış kromatin (heterokromatin), sıkışık şekilde paketlenmiştir, hipoasetile haldedir ve genellikle H3 üzerindeki 9. lizin ve H4 üzerindeki 20. lizin metillenmiş durumdadır (Schotta ve ark., 2004). Fakat transkripsiyonel olarak aktif kromatinde (ökromatin), H3 üzerindeki 9., ve 14. lizin hiperasetile haldedir, H3 üzerindeki 4. ve 79. lizin ise metillenmiştir (**Şekil 14**) (Strahl ve ark., 1999; Liang ve ark., 2004).



Şekil 14. Histon Modifikasyonlarının Birbirleriyle etkileşimleri (Pozitif etkileşimler oklarla, negatif etkileşimler düz çizgilerle gösterilmiştir) (Bannister ve Kouzarides, 2011)

Histon Deasetilaz Enzimlerinin Sınıflandırılması

HDAC süperailisi, maya histon deasetilaz enzim homolojilerine göre dört ana gruptan oluşmaktadır: sınıf I, IIa ve IIb, IV ve yapısal olarak farklılık gösteren sınıf III (Marks ve Dokmanovic, 2005; Carey ve La Thangue, 2006).

Sınıf I ve sınıf II HDAC, özellikle korunmuş katalitik alanları yönünden yapısal olarak benzerlik gösteren Zn^{+2} bağımlı deasetilazlardır (Thiagalingam ve ark., 2003; Wang ve ark., 2004). Sınıf I HDAC, yaygın olarak eksprese edilen HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve kasa spesifik HDAC8'i kapsar. HDAC1 ve HDAC2 çoğunlukla nükleusta lokalize olmuştur, HDAC3 ise nükleus ve sitoplazma arasında gidip gelir. Bu üç deasetilaz da protein sekanslarında nükleer lokalizasyon sinyali taşırlar. HDAC3, ek olarak nükleer eksport sinyali de taşır (Yang ve ark., 2002). HDAC1 ve HDAC2'nin bileşeni olduğu üç transkripsiyonel kompleks SIN3A, NuRD ve CoREST olarak adlandırılmıştır. Bu kompleksler, gen promotörlerinde DNA bağlayıcı protein olarak görev yaparlar ve genel transkripsiyonel regülasyondan çok gen spesifik regülasyondan sorumludurlar (Laherty ve ark., 1997; Wen ve ark., 2000).

Sınıf IIa HDAC, özellikle kalp ve kaslarda dokuya özgü ekspresyon kalıpları içeren dört üyeden oluşur: HDAC4, HDAC5, HDAC7 ve HDAC9 (Martin ve ark., 2007; Majdzadeh ve ark., 2008). Bu proteinler, HDAC3, miyosit artırıcı faktör 2(MEF2), NCOR2/SMRT represör kompleksi ve 14-3-3 proteinleri ile etkileşimleri düzenleyen yaklaşık 600 amino asit içeren uzamış amino terminal alanını takip eden Zn^{+2} içeren katalitik alana sahiptirler (Butler ve Bates, 2006). HDAC9'un katalitik alan içermeyen bir amino terminal ekleme varyantı olan MITR, HDAC4 ve HDAC5 heterokromatin protein 1(HP1) ile etkileşir. HP1, histonları metillenmiş lizinleri tanıyan bir adaptör proteindir ve histon metiltransferazlar tarafından yapılan transkripsiyonel represyonu düzenlerler (Zhang ve ark., 2002). HDAC4, HDAC5, HDAC7 ve MITR, nükleus ve sitoplazma arasında gidip gelirken, HDAC9 tamamen nükleus içinde lokalize olmuştur (Petrie ve ark., 2003). Sitoplazmada tutulum, özellikle HDAC'in fosforile formuna bağlanan 14-3-3

proteinleri tarafından gerçekleştirilir ve nükleusa giriş önlenir. Ancak, protein defosforilasyonu ile giriş meydana gelir (Grozinger ve Schreiber, 2000).

Sınıf IIB HDAC, HDAC6 ve HDAC10'dan oluşur. HDAC6'nın yapısı oldukça farklıdır. Birbirinden bağımsız iki katalitik alan ve bir karboksi terminal Zn⁺²-finger ubiquitin bağlama alanı içerir (Bertos ve ark., 2001). HDAC6, sitoplazmada α -tübülün deasetiller ve mikrotübül stabilitesini değiştirir (Hubbert ve ark., 2002; Matsuyama ve ark., 2002). HDAC10'un yapısı HDAC9'a benzer fakat 2. katalitik alanı içermez (Tong ve ark., 2002). HDAC10, HDAC3 ile kompleks oluşturmuş halde bulunmuştur ancak bu deasetilazın fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (Kazantsev ve Thompson, 2008).

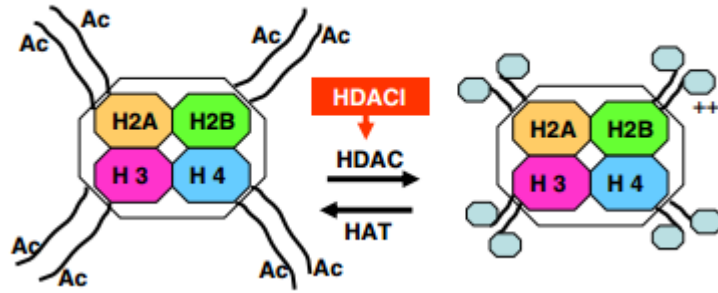
Sınıf IV enzimi olan HDAC11, sınıf I ve sınıf II deasetilazlardan yapısal olarak farklıdır. HDAC11 genellikle nükleusta lokalize olmuştur, ancak öncelikle sitozolik HDAC6 ile birlikte çökelir (Gao ve ark., 2002). Bu deasetilazın fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, fare beynindeki bölgeye spesifik ve gelişimsel ekspresyon modelleri incelenmiştir. İnsanlarda HDAC11 ekspresyonu, beyin, kalp, kaslar ve böbrekleri içeren birkaç organla sınırlıdır. HDAC11 baskın olarak gelişmiş oligodendrosit ve nöronlarda ifade edilir (Liu ve ark., 2008).

Sınıf III deasetilazlar ya da diğer adıyla sirtuinler, yapısal ve fonksiyonel olarak diğer HDAC'lardan farklıdır. Adını tomurcuklanan mayadan ilk kez tanımlanan *silent information regulator 2 (Sir2)* geninden alır. İnsanda sınıf III HDAC'lar yedi üyeden oluşur (SIRT 1-7). Sirtuinler, mono-ADP-ribozil transferaz (ART) şeklinde hareket edebilen ve/veya NAD⁺ bağımlı deasetilaz (DAC) olarak bulunan, NAD⁺ bağımlı katalitik temel alana sahiptirler. Bu katalitik temel alanı sirtuinlerin N- veya C-terminal zincirleri sarar ve zincirlerin boyları sirtuinler arasında farklılık gösterir (Bayram ve İçci, 2013). Sirtuinler, deasetilaz ve mono-ADP-transferaz aktivitelerini içeren katalitik reaksiyonlar sırasındaki NAD⁺ bağımlılıklarıyla diğer deasetilaz sınıflarından farklıdır (Sauve ve ark., 2006). Sınıf III deasetilazlar arasında en baskın deasetilaz aktivitesini SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT5 gösterir (Gan ve Mucke, 2008). Sirtuinlerin aracılık ettiği deasetilasyon reaksiyonu, protein substratındaki lizin rezidülerinin deasetillenmesi sırasında NAD⁺'in (Nikotinamid adenin dinükleotit) parçalanarak nikotinamid ve 2'-O-asetil ADP-riboz oluşmasıyla gerçekleşir (Denu, 2005). İnsan SIRT1'i, maya Sir2 geninin yapısal analogudur. Maya Sir2 geni, hücre metabolizma ve yaşlanmayı düzenler (Michan ve Sinclair, 2007). SIRT2, hem nükleus hem de sitozolde lokalize olmuştur. Hücrede pek çok fonksiyonu yerine getirmek için çok sayıda proteinle etkileşir. SIRT1 histonlar üzerindeki tek bir lizin rezidüsünü deasetile eder: 4. histon üzerinde K16, 3. histon üzerinde K14 ve 1. histon üzerinde K26. Belli lizin rezidülerinin deasetillenmesi, b-hücre CLL/lenfoma 11A (zinc finger protein) (bCLL11A) ve p300/CbP-bağlantılı faktör (pCAF)-miyojenik farklılaşma 1 (MYoD1) gibi SIRT1'in bileşeni olduğu protein kompleksleri tarafından belirleniyor olabilir (Michan ve Sinclair, 2007; Tanno ve ark., 2007). SIRT2, α -tübülün ve mikrotübülleri deasetile eden sitozolik bir proteindir (Southwood ve ark., 2007). Bunun devamında, SIRT2'nin 4. Histon üzerindeki K16'yı deasetilleyerek nöronal çekirdeklere lokalizasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Vaquero, 2006). SIRT2'ye yapısal olarak en çok benzeyen sirtuin olan SIRT3, mitokondriyal bir proteindir. SIRT3'ün mitokondriyal lizin asetilasyonunu düzenlediğine dair pek çok veri olmasına karşın asetil-koA sentetaz (ACS2) SIRT3 substratı olarak

tanımlanmıştır (Schwer ve ark., 2002; Hallows ve ark., 2006). SIRT5'in mitokondriyal hücre içi lokalizasyona sahip olduğu bilinse de, bu protein fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (Michisita ve ark., 2005). Son olarak, SIRT6'nın, hedefin 3. Histondaki K9 varsayıldığı S fazındaki telomomerik DNA'nın düzenlenmesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Michisita ve ark., 2008).

Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Histon deasetilaz inhibitörleri(HDACi), histon deasetilazların aktivitesini inhibe eden, doğal ya da sentetik, küçük moleküllerdir. Enzimatik aktivite benzerliklerine rağmen, fonksiyon kaybı deneyleriyle histon deasetilaz proteinlerinin gelişim ve farklılaşma sırasında membranda bireye özgü rolleri olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, HDAC hedeflerine karşı geniş bir özgüllüğe sahip HDAC inhibitörleri, hedef hücre türüne bağımlı olarak oldukça spesifik etkiler göstermiştir (Haberland ve ark., 2009)

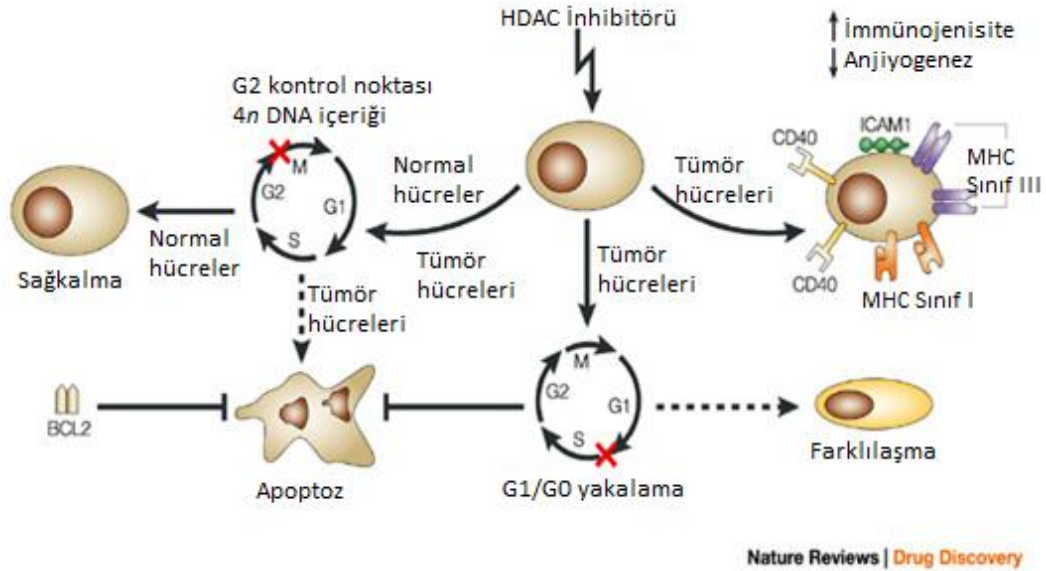


Şekil 15. HDAC İnhibitörlerinin Etki Mekanizması (Haberland ve ark., 2009)

HDACi, DNA ile ilişkili proteinlerin asetilasyonunu düzenler ve böylece kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonel aktivitede değişikliklere neden olur (Bolden ve ark., 2006). Epigenetik olarak indüklenmiş HDACi modifikasyonları, kök hücrenin devreye girmesinin teşviki ve farklılaşma ve mineralizasyon süreçlerinin indüklenmesini içeren doku onarım mekanizmalarını tetikleyen yararlı etkiler sağlar (Kretsovali ve ark., 2012), ayrıca inflamasyonu da düzenler (Şekil 15) (Leoni ve ark., 2005).

Histon deasetilaz inhibitörleri kimyasal yapılarına göre; hidroksamik asitler(örn: vorinostat, panobinostat, belinostat), benzamitler (örn: SNDX-275, entinostat, MGCD0103), kısa zincirli yağ asitleri (örn: sodyum bütirat, valproik asit, AN-9), siklik peptitler (örn: romidepsin, apicidin), tiyolatlar, karboksamitler ve nonhidroksamit asitlerden oluşan geniş bir bileşenler topluluğudur (Batty ve ark., 2009). Bu ajanların potansi HDAC özgüllüğüne bağlı olarak belirgin ölçüde değişmektedir. Örneğin; kısa zincirli yağ asitleri milimolar konsantrasyonunda aktifken hidroksamit asitler (örn: belinostat) ve benzamitler (örn: romidepsin) düşük nanomolar konsantrasyonlarda bile etkilidir. Buna ek olarak, vorinostat ve panobinostat gibi hidroksamit asit HDACi'leri pan-HDACi olarak etki ederken, diğerleri (örn: MGCD0103) ilk olarak sınıf I HDACları hedef almaktadır (Fournel ve ark., 2008). Sınıf I HDACi yanı sıra, klinik açıdan anlamlı sınıf IIb HDACi de (örn: tubacin) tanımlanmış ve geliştirilmiştir. Bu ajanlar avantajı, teorik olarak, sınıf I HDAC'ların inhibisyonundan kaynaklanan konakçı toksisitesini göreceli olarak

azaltmaktır. ACY-1215 adlı bir ajan, diğer hedeflenmiş ajanlarla birlikte (örn: bortezomib) multipl miyeloma hastalığında umut vadeden prelinik etkileşimler göstermiştir ve denemeleri devam etmektedir (Santo ve ark., 2012).

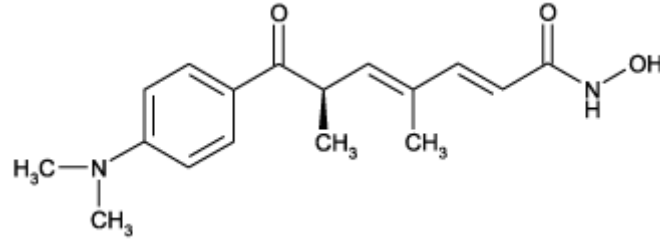


Şekil 16. HDAC İnhibitörlerinin Rol Oynadığı Mekanizmalar (Johnstone, 2012)

HDAC'ların hücre büyümesi ve farklılaşmasını (Humphrey ve ark., 2008; Montgomery ve ark., 2009) da içeren pek çok önemli biyolojik süreçte çeşitli transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyonel ko-regülatörler ile oluşturduğu kompleksler aracılığıyla yer aldığı gösterilmiştir (Şekil 16) (Haberland ve ark., 2009). HDAC'lar ayrıca belirli hedef genlerin aktivitesini azaltan bir bağlantı aracılığıyla farklılaşma ve kök hücre yenilenmesini kontrol etmektedir (Hsieh ve ark., 2004). Küçük moleküllü HDAC inhibitörleri ile HDAC aktivitesinin inhibe olabilmesi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde önemli derecede dikkat çekmektedir. (Cheng ve ark., 2004). Bir çalışmada, bir HDAC inhibitörü olan valproik asidin(VPA) hipokampal nöronal progenitor hücrelerdeki nöronal farklılaşmayı artırdığı gösterilmiştir. (Hsieh ve ark., 2004, Yu ve ark., 2009). Suberoilanolid hidroksamit asit (SAHA), MS-275 ve M344 gibi diğer HDAC inhibitörler de erişkin önbeyin prekürsör hücrelerinde nöronal farklılaşmayı artırmıştır. (Siebzehnrubl ve ark., 2007). Ayrıca, sodyum bütirat(SB), embriyonik kök hücrelerin yapışkan monokültürde nöral hücrelere farklılaşmasını artırmıştır. (Martino ve ark., 2010) Bunlara ek olarak, SAHA ve SB nörosfer oluşumunu baskılamış ve in vitroda erişkin farede subventricular zone kökenli nöronal prekürsör hücrelerin proliferasyonunu hücre siklusu devamlılığını sağlayarak engellemiştir (Zhou ve ark., 2011). Hücre büyümesi ve proliferasyonuna ek olarak, SB ve VPA 0.1 mM konsantrasyonda retinal gangliyon hücrelerinin (RGC) hayatta kalma kapasitesini artırmıştır. TSA ise 0.5-1 nM dozlarda etki etmemiş, 5 nM konsantrasyonun üzerinde ise hücre ölümünü artırmıştır. Ayrıca bu çalışmada TSA'nın embriyonik fare nöronal kök hücrelerinde astrosit farklılaşmasını azaltarak nöronal farklılaşmayı artırdığı gösterilmiştir (Biermann ve ark., 2011).

Trikostatin A

Trikostatin A(TSA), HDAC inhibitörlerinin hidroksamit sınıfında yer alan, sınıf I ve II HDAC üzerine etkili, sitostatik ve farklılaştırıcı özellikler gösteren, antifungal bir ajandır (**Şekil 17**). TSA'nın hidroksamit asit grubu aracılığıyla histon deasetilaz enzimlerinin aktif bölgesine bir çinko iyonu kenetlemesi ile katalitik reaksiyonu önlediği öne sürülmüştür. Memeli hücre kültüründe parçalanmış hücre nükleer ekstraktlarında, düşük nanomolar konsantrasyonlarda, kompetitif olmayan, geri dönüşümlü HDAC inhibitör aktivitesi göstermiştir (David ve ark., 2001). HDAC enzim inhibisyonu, transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi kolaylaştıran promotör lokusların açılmasını sağlayan histon asetilasyonunda artışa neden olur. Bu etki pek çok genin ekspresyonunda artışa sebep olur (Robert ve ark., 2010). TSA hücre döngüsünü G1 ve G2 fazında durdurarak farklılaşmayı indükler ve morfolojik olarak transformasyona uğramış hücreleri eski haline döndürür (David ve ark., 2001).



Şekil 17. Trikoastatin A'nın Moleküler Yapısı

Trikostatin A'nın Nöritojenik Etki Mekanizması

Nöronların akson gelişimindeki intrinsik kapasitesi gelişimle birlikte azalmaktadır, DNA'ya ulaşabilme ve kromatin organizasyonu gibi epigenetik faktörler bu genlerin ifade edilebilirliklerini düzenlemektedir. Bu nedenle, santral sinir sistemi hasarlarında potansiyel bir yaklaşım olarak rejeneratif gen ifadelerine odaklanılabilir. Krüppel-benzeri faktörler (KLFs), cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteinler (CREB), c-Jun, Smad1, c-EBP (*CCAAT-enhancer-binding proteins*), SOX11, STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), ATF3 (*Cyclic AMP-dependent transcription factor*), NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) ve NFIL3 (*Nuclear factor, interleukin 3 regulated*), aksonal büyüme ve rejenerasyonu kontrol eden transkripsiyon faktörlerinden bazılarıdır (Sun ve He, 2010; Liu ve ark., 2011; Moore ve Goldberg, 2011). Spesifik bölgelerde kromatinin, protein ve DNA modifikasyonları ile yeniden modellenmesi, pasif olarak transkripsiyon faktörlerini ifade eden gen promotörlerine ulaşımı kolaylaştırır, aktif olarak ise spesifik transkripsiyon faktörlerini indükleyen ya da baskılayan protein komplekslerini tetikler (Stahl ve Allis, 2000).

Nöropatolojik süreçlerde, histonların hücresel asetilasyon homeostazisinin bozulması son yıllarda dikkat çekmiştir (Hahnen ve ark., 2008). Pek çok çalışma özellikle, nörodejenerasyonun aşırı histon deasetilasyonu ile sonuçlanan histon asetiltransferaz aktivitesindeki (HAT) genel düşüş ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Jin ve ark., 2011; Rouaux ve ark., 2003). Bu nedenle HDAC inhibitörlerinin terapötik etkileri çeşitli nörodejeneratif hastalıklar üzerinde test

edilmiş ve Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral sklerozis ve deneysel otoimmün ensefalomyelit modelleri üzerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

TSA, potent, spesifik ve iyi karakterize edilmiş bir sınıf I ve sınıf II HDACI olmasının yanı sıra, rat hipokampal nöral progenitör hücrelerinde, nöro 2a hücrelerinde ve retinal ganglion hücre hattı RGC-5 hücrelerinde farklılaşmayı indüklediği ve nörit gelişimini artırdığı gösterilmiştir (Schwechter ve ark., 2007). TSA tarafından indüklenen kortikal nöronal büyüme ve nörojenez ERK (Hao ve ark., 2004) ve JNK (Yamauchi ve ark., 2007) yolağının aktivasyonunu ve GSK3 regülasyonunu (Hall ve ark., 2002) içermektedir. TSA, erişkin farede toksik etki göstermemiş ve postnatal embriyonik gelişimi bozmamıştır. Hücre kültüründe ise sınırlı sayıda geni inhibe etmiştir. Bu genler çoğunlukla hücre siklusu, büyüme ve apoptoz genleridir. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Ayrıca bazı inflamasyon modellerinde proinflamatuvar sitokin ve mediyatörlerin ekspresyonunu da inhibe etmektedir (Hebbel ve ark., 2010).

TSA, gen ekspresyonunu genel olarak değiştirmez, daha çok bellek konsolidasyonu sırasında belirli genlerin ekspresyonunu artırır (Vecsey ve ark., 2007). Ayrıca sıçan inme modellerinde, nöronal sağ kalımı artırdığı (Jeong ve ark., 2003) ve nöroproteksiyon sağladığı (Xu ve ark., 2007) gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, TSA sürekli sıçan iskemi modellerinde p-53, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve siklooksijenaz 2 up-regülasyonu aracılığıyla oluşan iskemide, anti-inflamatuvar etkileri aracılığıyla inhibisyon sağlamıştır (Kim ve ark., 2007).

Hasan ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada, Sprague-Dawley cinsi sıçan embriyolarından 18. günde toplanarak elde edilen serebral korteks hücreleri 1×10^5 hücre/cm² yoğunlukta ekilmiş ve oksijen glikoz yoksunluğu olarak adlandırılan *in vitro* iskemi modeli uygulanmıştır. Daha sonra 0.25, 0.5, or 1 mM valproik asit ve 10, 30, or 100 nM TSA ile muamele edilen hücrelerde, HDAİ olan TSA ve valproik asidin BDNF ekspresyon seviyelerini artırarak nörit gelişimini indüklediği ve nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (Hasan ve ark., 2013).

Başka bir çalışmada bir HDAİ olan sodyum bütiratın ve trikostatın A'nın PC-12 hücrelerindeki nörit gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır. 10 ng/mL NGF ya da 1 pM kolera toksini ile birlikte uygulanan 30 nM TSA ve 0.5 mM sodyum bütiratın etkileri karşılaştırılmıştır. Her iki kombinasyonda da nörit uzamasında artış bulunmuştur (Suzuki-Mizushima ve ark., 2002).

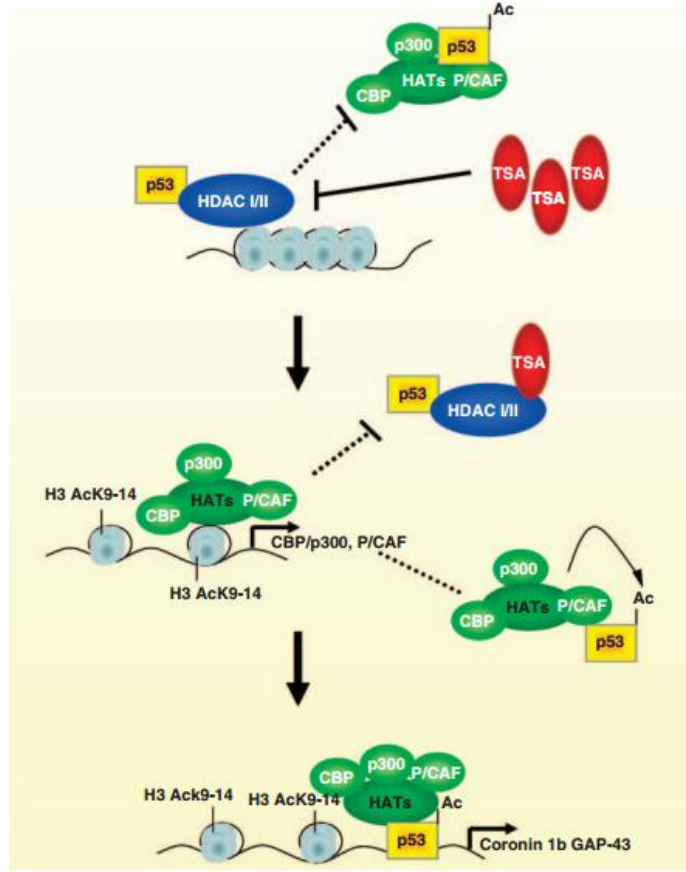
Schwechter ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, retinal gangliyon hücre hattı olan RGC-5 hücreleri üzerinde Staurosporine (kinaz inhibitörü) ve TSA'nın nörit gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. 500 nM TSA ya da 316 nM Staurosporine, tek başlarına ya da insülin (5 µg/mL), forskolin (5 µM), BDNF (50 ng/mL), CNTF (10 ng/mL) ile kombine halde uygulanmıştır. 80 hücre/mm² yoğunlukta 24'lü plakalara ekilen RGC-5 hücreleri 200x büyütme ile çeşitli zamanlarda fotoğraflanmıştır. Her konsantrasyon grubu için en uzun nörite sahip 3 hücre seçilmiştir (bir konsantrasyon grubu için toplamda 18 hücre). Hücre somasının 3 katı büyüklüğündeki uzantılar nörit kabul edilerek, her hücrenin en uzun nörit uzunluğu ve somadan uzun nöritlerin sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra istatistiksel analiz yapılmıştır. TSA RGC-5 hücreleri üzerinde nörit gelişimini artırmıştır (Schwechter ve ark., 2007).

Histonların ve transkripsiyon faktörlerinin artmış asetilasyonunun, nörodejenerasyon hayvan modellerinde nöronları apoptozdan koruduğu (Saha ve Pahan, 2006) ve nöronal farklılaşmayı indüklediği (Balasubramaniyan ve ark., 2006; Schwechter ve ark., 2007) gösterilmiştir. Bu olayın mekanizması nörit/akson gelişimi ile kısmen aynı mekanizmaya sahiptir. Çeşitli histon asetil transferazların (HAT) yanı sıra CREB-bağlayıcı protein/p300 (CBP/p300) ve p300-CBP-ilişkili faktör (P/CAF) nöronal kontrol ile ilişkilidir (Jiang ve ark., 2006; Rouaux ve ark., 2003). Bu proteinler, transkripsiyon faktörlerini ve histonları asetilleyerek, nöronal hücre ölümünden korurlar (Saha ve Pahan, 2006; Glozak ve ark., 2005)

Di Giovanni ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, tümör supressör p53 proteininin nörit gelişimi ve akson rejenerasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir. p53 proteini, hücreler genotoksik strese maruz kaldığı zaman hücre döngüsünü durdurur ve apoptotik yolları tetikler. p53, nöronal apoptozu indüklediği yoldan farklı bir post-translasyonel yolak üzerinden de, nörit gelişimi sırasında ifadesi artan aktin bağlayıcı koronin 1b ve GTPaz Rab13 proteinlerinin ekspresyonunu da düzenlemektedir (Di Giovanni ve ark., 2006) .

Nöron benzeri PC-12 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, NGF uygulamasından sonra, Brn-3a gibi nörona spesifik transkripsiyon faktörleriyle etkileşime geçen p53, hücre canlılığını sağlamaktadır. Hücre döngüsü üzerindeki ikili etkisinden dolayı p53, hücre büyümesi ve farklılaşmasında değişken bir role sahiptir (Hudson ve ark., 2005). Spesifik lizinlerin C-terminalindeki p53'ün nöronal asetilasyonunun, *in vivo* nörit gelişimini ve aksonal büyümeyi indüklediği bildirilmiştir (Tedeschi ve ark., 2009; Di Giovanni ve ark., 2006).

Gaub ve arkadaşları tarafından post natal P7 serebellar granül nöronları (CGN) üzerinde yapılan bir çalışmada, sodyum fenil bütirat (PB) ve TSA'nın primer nöronlardaki nörit gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. TSA 10 ng/mL konsantrasyonda apoptozu tetiklemiş 1 ng/mL konsantrasyonda ise hücre canlılığında bir miktar artışa neden olmuştur. Daha sonra, immünohistokimya ve immünohistokimya yöntemleriyle 1 ng/mL TSA dozunun, primer nöronlarda histon hiperasetilasyonunu sağlamaya yeterli olduğu kontrol edilmiştir. 100 hücre üzerinde yapılan ölçümde TSA'nın, transkripsiyona bağlı bir mekanizma ile nörit gelişimini artırdığı bulunmuştur. Hiperasetilasyon ayrıca, büyüme konisi sayısını ve yüzey alanını artırmıştır. Ayrıca immünohistokimya yöntemiyle yapılan analiz sonrasında TSA'nın, nöron gelişimi markerlarından olan GAP-43 proteininin ekspresyonunu artırdığı da gösterilmiştir. Aynı sonuçlara TSA gibi HDAC I ve II'yi inhibe eden PB ile de ulaşılmıştır. HDAC inhibitörleri tarafından aracılık edilen permisif ve permisif olmayan substratların transkripsiyonuna bağlı olarak artan nörit gelişimine, artmış promotör ve CBP/p300 ve P/CAF gen ekspresyonu eşlik etmiştir. CBP/p300 ve P/CAF'ünün birlikte histonları ve p53'ün transkripsiyon faktörünü asetillemediği ve böylece miyelin inhibisyonunun engellenmiş olduğu açıklanmıştır (**Şekil 18**) (Gaub ve ark., 2010).



Şekil 18. Trikostatin A'nın Nörit Gelişimini İndükleme Mekanizması (Gaub ve ark., 2010)

Histon Fosforilasyonu

Histon asetilasyonu gibi histon fosforilasyonu da oldukça dinamik bir şekilde gerçekleşmektedir. Genellikle N-terminal uçtaki serin, treonin ve tirozinler üzerinde olur. (Xhemalce ve ark., 2011) Modifikasyon düzeyi kinazlar ve fosfatazlar tarafından gerçekleştirilir ve kontrol edilir (Oki ve ark., 2007).

Bilinen histon kinazların hepsi ATP'deki bir fosfat grubunu, hedef amino asit zincirindeki hidroksil grubuna transfer etmektedir. Böylece histon negatif yüklenmekte ve kromatin yapısı değişmektedir. Histon fosforilasyon alanlarının büyük çoğunluğu N-terminal kuyruğunda bulunur fakat çekirdek bölgelerinde de bu alanlara rastlanmıştır. Örneğin; H3Y41 fosforilasyonunun reseptör olmayan tirozin kinaz JAK2 tarafından gerçekleştirilmesi gibi. (Dawson ve ark., 2009)

Histon Metilasyonu

Histon metilasyonu lizin ve arjininlerin yan zincirlerinde histon metiltransferazlar aracılığıyla meydana gelir. Asetilasyon ve fosforilasyonun aksine histon metilasyonu histon proteininin yükünü değiştirmez. Lizinler; mono-, di- ya da trimetilasyona, arjininler ise; mono- ve di- (simetrik ya da asimetric şekilde) metilasyona uğrarlar (Xhemalce, 2011). Histon 3'ün kuyruğunda meydana gelen metilasyonun epigenetik düzenlemede çok önemli bir rolü vardır. Histon 3 lizin 4 (H3K4) tri-metilasyonu ökaryotlarda promotör bölgelerini belirler (Martin ve Zhang, 2007).

ADP Ribozilasyonu

Histonların glutamat ve arjinin rezidüleri üzerinde mono- ya da poli- ADP ribozillenmiş olduğu bilinmektedir fakat bu modifikasyonun fonksiyonu hakkında çok veri bulunmamaktadır. ADP ribozilasyonu geri dönüşümlü bir modifikasyondur. Örneğin; histonların poli-ADP-ribozilasyonu poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) enzim ailesi tarafından gerçekleştirilir ve poli-ADP-riboz-glikohidrolaz enzim ailesi tarafından tersine çevrilir. Bu iki enzim ailesi birlikte poli-ADP ribozillenmiş histon seviyelerini kontrol altında tutar. Histonların ADP ribozilasyonu açık kromatin yapısı ile doğru orantılıdır (Hassa ve ark., 2006). Bu verilere ek olarak PARP-1 aktivasyonunun, çekirdekteki histon asetilasyonu seviyesini artırdığı bildirilmiştir (Cohen-Armon ve ark., 2007).

Histonların mono-ADP-ribozilasyonu mono-ADP-ribozil transferazlar tarafından gerçekleştirilir ve linker H1 histonu da dahil olmak üzere 4 çekirdek histonunda da meydana gelir. Bu modifikasyonlar, DNA hasarı oluştuğunda, DNA hasarına cevaba götüren yollara önemli ölçüde dahil olur (Hassa ve ark., 2006).

Ubikitinasyon ve Sumoylasyon

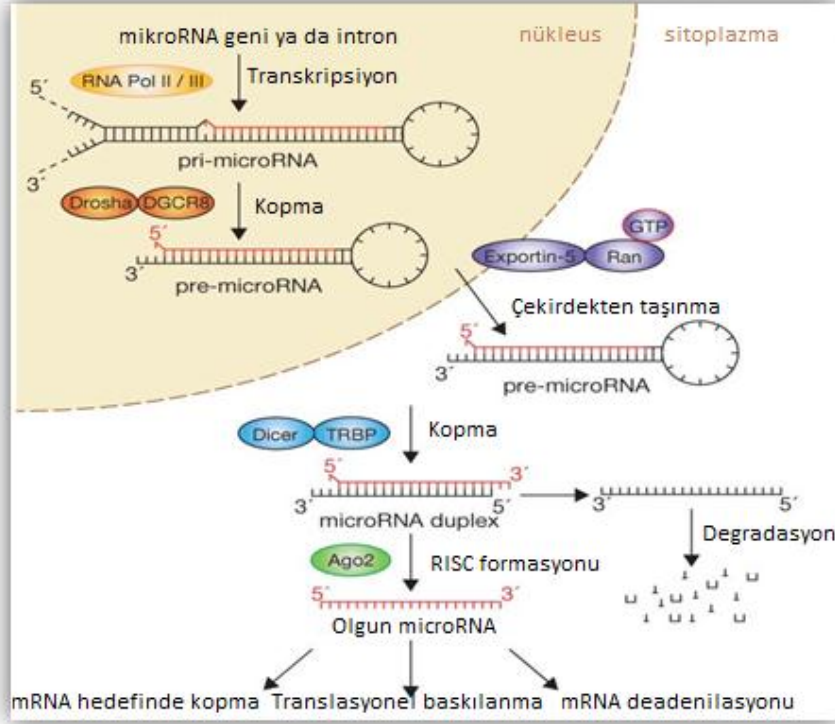
Daha önce anlatılan histon modifikasyonları amino asit yan zincirlerinde küçük moleküler değişiklikler yaratmaktadır. Ubikitinasyon ise, bu modifikasyonların aksine, daha büyük kovalent modifikasyonlar şeklinde sonuçlanır. Ubikitin, 3 enzimin sıralı bir şekilde aktivitesiyle (E1-aktivasyon, E2-konjugasyon ve E3-enzim bağlayıcı) histon lizinlerine bağlanan 76 amino asitlik bir polipeptittir (Hershko ve Ciechanover, 1998). Enzim kompleksleri ubikitinasyon seviyesinin (mono- ya da poli-ubikitinasyon) yanı sıra substrat özgüllüğünü de (lizin hedefli) belirler. Histonlar için, mono-ubikitinasyon modifikasyonlarla daha ilişkili gibi gözükmektedir. H2A ve H2B içerisinde iyi karakterize edilmiş 2 adet alan bulunmaktadır. H2AK119ub1 gen susturulması ile ilişkili (Wang ve ark., 2004), H2BK123ub1 ise transkripsiyonel başlangıç ve uzamada önemli bir role sahiptir (Kim ve ark., 2009). Ubikitinasyon büyük bir modifikasyon olmasına rağmen, oldukça dinamiktir. De-ubikitin enzimi olarak da bilinen izopeptidazlar aracılığıyla geri dönüştürülebilir ve bu dönüşüm gen aktivitesi ve susturulma açısından da çok önemlidir.

Sumoylasyon, ubikitinasyonla ilişkili bir modifikasyondur. Küçük ubikitin benzeri düzenleyici moleküllerin E1, E2, E3 enzim aktivitesi aracılığıyla histon lizinlerine kovalent bağlanmasıdır. 4 çekirdek histonunda da görülmektedir. Sumoylasyon, asetilasyonu ve ubikitinasyonu antagonize ederek aynı lizin yan zincirinde meydana gelmelerini önler (Shijo ve Eisenman, 2003). Sonuç olarak, sumoylasyon baskılayıcı fonksiyonlarla ilişkilidir fakat kromatin üzerindeki etkilerini gösteren moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

RNA ile İndüklenen Sessizleşme

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, kromatin yapısı üzerine etkileri aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu modifikasyonların aksine, küçük (20–30 nukleotidlik) kodlanmayan RNA'lar gen ekspresyonunu hem kromatin düzeyinde hem de post-transkripsiyonel olarak işleyen RNA'nın sessizleştirilmesi yoluyla düzenlerler. miRNA'lar protein kodlamayan RNA molekülleridir ve 22 nukleotid uzunluğunda diziyeye özgül gen düzenleyicileri olarak

gen ekspresyonunun kontrolünde rol oynarlar (Chuang ve Jones, 2007). En iyi bilinen iki RNA sessizleştirme yolağından biri, kısa müdahaleci RNA'lar (interfering RNAs) tarafından düzenlenen RNA enterferansı, diğeri ise mikro-RNA'lar (miRNA) tarafından düzenlenen, gelişim sırasında programlanan, sessizleştirme yolağıdır. Bu şekilde, kodlanmayan RNA'lar, hedef genin ifadesini mRNA'nın post-transkripsiyonel parçalanması veya protein ekspresyonunun translasyonel baskılanması ile durdurmaktadır (Şekil 19) (Kim ve ark., 2009).



Şekil 19. miRNA Etki Mekanizması (Winter ve ark., 2009)

Her iki RNA da daha uzun, çift sarmallı RNA öncülerinden dicer enzimi aracılığı ile üretilir ve bunlar homolog dizileri susturan ya da ayrıştırılan protein efektör faktörlerine özgül faktörler olarak işlev yaparlar (Moazed, 2009).

miRNA'lar DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ile transkripsiyonel olarak düzenlenir. Ayrıca, kromatin yapısı ve histon modifikasyonunda da rol alan enzimler aracılığıyla epigenetik mekanizmaları etkilerler (Chuang ve Jones, 2007). Linc-RNA (long intergenic non-coding RNAs) ve X inaktivasyonunu sağlayan Xist (X-inactive specific transcript) gibi uzun kodlanmayan RNA'lar genomik imprinting'in düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Ponting ve ark., 2009).

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasal Maddeler, İlaçlar ve Malzemeler

Hücre kültürü:

PC-12 Adh Hücre Hattı (ATCC® CRL-1721.1™)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, D 5671)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)
At Serumu (Thermo Scientific)
Penisilin/Streptomisin (Gibco)
Nunc™ Cell Culture Treated EasYFlasks™ (75 cm²) (Thermo Scientific)
Nunc™ Collagen I Coated EasYFlasks™ (25 cm²)
BD BioCoat™ Collagen IV Cellware
10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör (Eppendorf, Kanada)
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (Greiner bio-one, Amerika)
12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere)
50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)
Cedex Smart Slide (Roche, Almanya)
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya)
Tripan mavisini (Roche, Almanya)
Kryotüp (2ml) (Greiner bio-one, Amerika)
Lamel (Isolab, Almanya)
Hücre kazıyıcı (Greiner bio-one, Amerika)
Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Almanya)

Kontrol ve test maddeleri:

Sinir Büyüme Faktörü-2.5S (NGF) (Sigma-Aldrich, N6009)
Trikostatin A (Selleckchem, S1045)
RG108 (Selleckchem, S2821)

MTT testi:

MTT (Sigma-Aldrich, Almanya)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya)
96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre)

İnvazyon, migrasyon ve proliferasyon analizi:

xCELLigence E-plate 96 (Roche, Almanya)
xCELLigence E-plate 16 (Roche, Almanya)
xCELLigence CIM-plate 16 (Roche, Almanya)

BD Matrigel™ (BD Biosciences)

The Oris™ Cell Migration Assay (Platypus Technologies, CMA5.101)

ELISA analizi:

USCN Life Science Rat MMP 2 kiti (Katalog no: SEA100Ra)

İmmünofloresan boyama:

BD Cytofix/Cytoperm™

Kollajen Tip IV (Sigma-Aldrich) (Katalog no: C5533)

Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)

Birincil antikor: Anti-beta III Tubulin [2G10] antibody (Abcam, ab78078)

İkincil antikor: Goat anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor®488), (Abcam, ab150113)

Kullanılan Cihazlar

Hücre kültürü:

HERAcell 150 Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific)

Laminer flow kabini (Heal Force)

Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf)

Hücre sayımı için Cedex XS (Innovatis)

Analiz cihazları:

Leica DM 300 Inverted mikroskop

Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek)

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) (Roche)

YÖNTEMLER

DeneYlerde Kullanılan PC-12 Adh Hücre Hattı ve Özellikleri

PC-12 Adh hücre hattı *American Type Culture Collection*(ATCC® CRL-1721.1™)'dan temin edilmiştir (**Tablo 1**). PC12 hücre hattı, sıçan adrenal medullasındaki kromafin hücreler ya da sempatik sinir sistemindeki diğer paraganglionik hücrelerden köken alan feokromasitoma tümörlerinden elde edilir. PC-12 Adh hücreleri sinir büyüme faktörü ile muamele edildiğinde bölünme durur ve farklılaşma başlar. Sinir büyüme faktörü (NGF) farklılaşmayı, aktin iskeletinin yeniden dağılımını ve lamellipodia oluşumunu tetikleyerek başlatır. Bu özellikleri nedeniyle PC-12 Adh hücre hattı nöronal farklılaşmanın incelenmesi için kullanışlı bir sistem modelidir (Rasnick ve Yu, 2006).

Tablo 1. PC-12 Adh Hücre Hattının Genel Özellikleri

Organizma	<i>Rattus norvegicus</i> , sıçan
Doku	Böbreküstü bezi tümörü (Feokromasitoma)
Morfoloji	Poligonal
Cinsiyet	Erkek
Karyotip	40 kromozom; 38 otozom+XY
İfade Edilen Genler	Katekolaminler; dopamin, norepinefrin
Tümörijenite	New England Deacoess Hospital tür sıçanlarda
Diğer Özellikleri	NGF uygulamasından sonra geri dönüşümlü şekilde nöronal fenotip geliştirir.

Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak kuru sterilizatörde 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise 121°C, 1.5 atm/Hg'de otoklavda 20 dakika steril edilmiştir.

Trikostatin A, RG108 ve NGF Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Toz halindeki Trikostatin A (Trikostatin A (Selleckchem, S1045) ve RG108 (Selleckchem, S2821) dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek Trikostatin A 100 mM ve RG108 200 mM konsantrasyonda olmak üzere ana stok hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır. Bu stok solüsyondan, her deney öncesinde besiyeriyle seyreltme işlemleri yapılarak farklı çalışma konsantrasyonları hazırlanmıştır. Trikostatin A ve RG108'in deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonunda DMSO oranı % 0.1 oranında olduğu için kontrol grubuna da besiyeri içinde % 0.1 oranında DMSO uygulanmıştır.

Liyofilize haldeki NGF (Sigma-Aldrich, N6009) %1 fetal dana serumu içeren PBS ile sulandırılarak pozitif kontrol gruplarına 100 nM konsantrasyonda şekilde uygulanmıştır.

Hücre Kültürü Çalışmaları

PC-12 Adh hücre hattı, %10 Fetal dana serumu, %5 at serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) büyüme besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 oranında CO₂ içeren 37°C'de inkübe edilmiştir.

Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, kazıyıcı yardımıyla pipetaj yapılarak taze besiyeriyle pasajlandı. Stoklanmak istenen hücreler aynı şekilde pipetlenerek besiyeriyle birlikte yarım saat buzda bekletildikten sonra, %10 oranında DMSO eklenerek kriotüplere aktarıldı ve -20°C'de 4 saat bekletildi. 4 saatin sonunda -80°C'deki dondurucuya aktarılarak stoklanmıştır.

Hücrelerin nöronal fenotipe farklılaşmasını sağlamak ve nörit uzunluk çalışmaları için hücreler flastan kaldırıldıktan sonra santrifüjle eski besiyeri atılarak %1 fetal dana serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM farklılaşma besiyeri kullanılarak kollajen IV kaplı plakalara ekim yapılmıştır.

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan NGF 100 nM konsantrasyonu, literatür taraması sonucunda seçilen, 50, 100 ve 200 ng/mL konsantrasyonları arasından, yapılan ön çalışmalar sonucu belirlenmiştir.

Hücre Sayımları

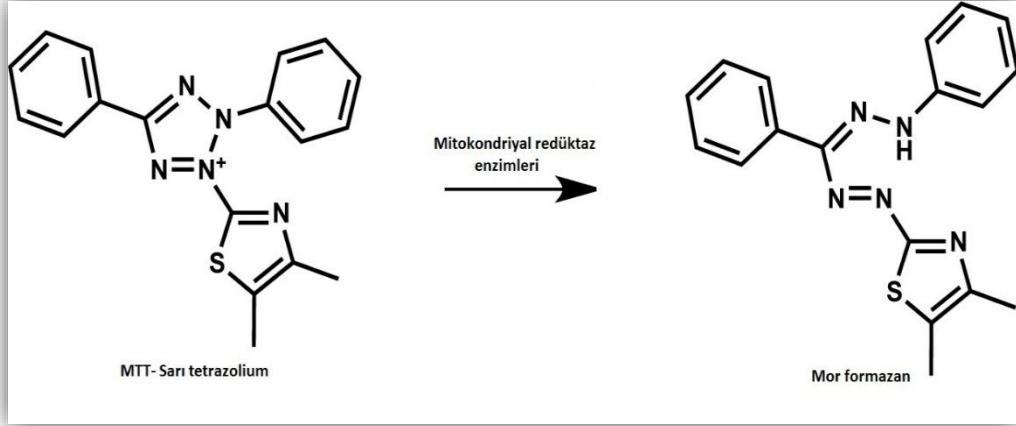
PC-12 Adh hücrelerinin bulunduğu, 75cm²'lik flasttaki eski besiyeri pipetlenerek atılmış ve hücreler üzerine yeni besiyeri eklenerek bir kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırılmış ve süspansiyon 50ml'lik falkona aktarılmıştır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüjden sonra, pelet üzerine 1 ml besiyeri eklendi. Bu süspansiyondan alınan 10µl örnek, bir lamel üzerinde 10 µl Tripan mavisi ile karıştırılarak Cedex Smart Slide'a aktarılmış ve Cedex XS (Innovatis) cihazı ile 1ml'deki hücre sayısı bulunmuştur. Deneyde kullanılmak istenen hücre sayısına uygun olarak besiyeriyle seyreltmeler yapılmıştır.

MTT Yöntemi İle Sitotoksitenin Belirlenmesi

MTT yöntemi ile *in vitro* koşullarda bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem canlı hücrelerdeki sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi özelliğinden ileri gelmektedir (Genç ve ark., 2002). Canlı hücreler mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine sahiptir. Sarı renkli ve suda çözünebilir tetrazolium tuzu (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür, MTT), hücrelere aktif olarak absorbe olur ve süksinat dehidrogenaz enzimi aracılığıyla tetrazolium halkası parçalanır, sarı renkli MTT boyası suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan tuzuna indirgenir (**Şekil 20**).

Bu indirgeme özelliği, hücre canlılığı ölçütüdür ve boya yoğunluğuyla canlı hücre sayısı korelasyon gösterir (Mosmann, 1983). Oluşan formazan kristalleri DMSO ya da izopropanol gibi uygun bir çözücü ile çözülerek kolorimetrik analiz için uygun hale getirilir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanır, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise

boyanmaz. Çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazan miktarının verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülür. Spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Bu yöntem daha çok hızlı çoğalan ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur (Mosmann, 1983; Barile, 1997; Denizot ve Lang, 1986; Horakova ve ark., 2001).



Şekil 20. Tetrazoliumun Mitokondriyal Redüktaz Enzimleri Aracılığıyla Formazan Tuzuna İndirgenmesi (http-9)

Bu indirgeme özelliği, hücre canlılığı ölçütüdür ve boya yoğunluğuyla canlı hücre sayısı korelasyon gösterir (Mosmann, 1983). Oluşan formazan kristalleri DMSO ya da izopropanol gibi uygun bir çözücü ile çözülerek kolorimetrik analiz için uygun hale getirilir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanır, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmaz. Çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazan miktarının verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülür. Spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Bu yöntem daha çok hızlı çoğalan ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur (Mosmann, 1983; Barile, 1997; Denizot ve Lang, 1986; Horakova ve ark., 2001).

Metodun Uygulanması

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) tozu fosfat tamponu (PBS) içinde ışıktan korunarak ve steril koşullar altında çözülmüş ve 5 mg/mL konsantrasyonda stok solüsyon hazırlanmıştır. PC-12 Adh hücreleri DMEM büyüme besiyeri ortamında 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının değerlendirilmesinde, sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 3x10³ hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiş ve hücreler plakaya yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. DMSO'da çözülerek hazırlanmış olan Trikostatin A ve RG108'in 100 mM stok solüsyonlarından hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. Kullanılan konsantrasyonlar şu şekildedir:

DMSO (%0.1) kontrol,

TSA: 200, 100, 10 ve 1 µM; 100 ve 10 nM,

RG108: 200, 100, 10 ve 1 µM; 100 ve 10 nM.

İnkübasyona bırakılan plakalardaki eski besiyeri atılmış ve kuyucuklara taze olarak hazırlanmış Trikostatın A ve RG108'in çalışma konsantrasyonları, kontrol grubundaki hücrelere de % 0.1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda plakanın içindeki besiyeri atılmış ve her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, 100 µL 0.5 mg/mL konsantrasyonda MTT solüsyonu ilave edilerek hücreler 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT içeren besiyerleri atılarak, her kuyucuğa 100 µL DMSO konulmuştur. Plakalar, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 ve 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri, her bir konsantrasyon için 8 tekrar(8 kuyucuk) olacak şekilde okunmuştur. Kontrol kuyularının absorbans değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların % canlılık değerlerindeki değişim hesaplanmıştır. Bulunan % canlılık değerlerinin istatistiksel yönden anlamlılığı, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's post hoc testi ile belirlenmiştir (p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***).

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) Hücre Farklılaşması, İnvazyon ve Migrasyon Analizleri

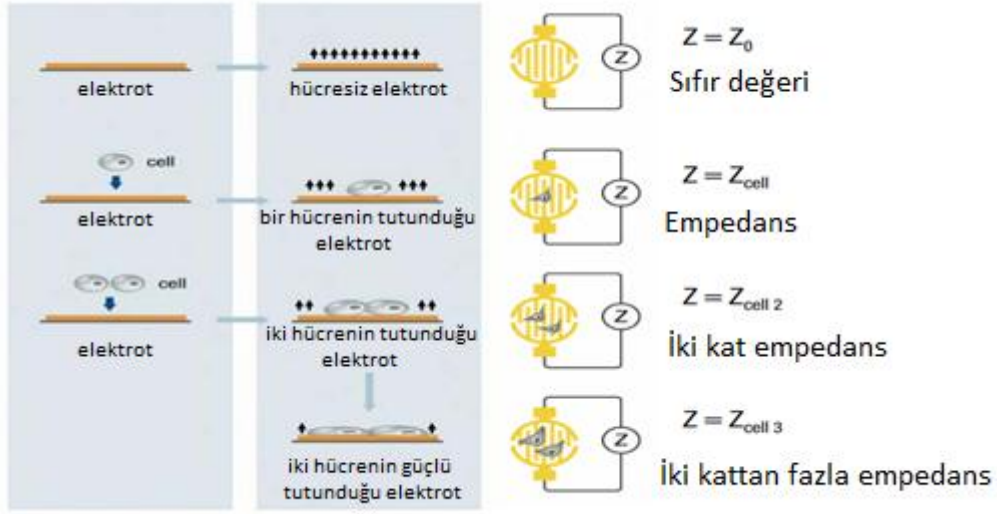
Hücre Farklılaşması Yöntemi

MTT yöntemiyle 10nM, 100nM, 1µM, 10µM, 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarda hücre canlılığına etkileri analiz edilen RG108 ve TSA'nın, hücrelerde sitotoksik etki yapmadığı konsantrasyonlar olan 10 ve 100 nM, tek başlarına ya da 100 nM NGF ile kombine halde gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA-DP) hücre farklılaşmasını gözlemlemek amacıyla 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 100 nM NGF konsantrasyonu, hücrelerde sitotoksik etki yapmayan ve hücrelerin farklılaşarak nörit gelişimini indükleyen etkili doz olarak yapılan ön çalışmalarla belirlenmiştir.

RTCA-DP cihazı, altın elektrotlar içeren özel plakaların(e-plate), hücrelerin plaka tabanına tutunmasıyla oluşan elektriksel sinyali istenilen ölçüm aralıklarında ekrana yansıtması yöntemiyle gerçek zamanlı veriler oluşturan bir cihazdır. E-plakadan önceden belirlenen aralıklarla cihaza aktarılan veriler, literatürde birimsiz "cell index(CI)"(hücre indeksi) olarak kabul edilen bir değer olarak hesaplanır. E-plaka kuyucuklarında hücre proliferasyonu arttıkça cihaza aktarılan sinyaller paralel olarak artmaktadır (**Şekil 21**) (Limame ve ark., 2012). Bizim çalışmamıza paralel olarak farklılaşma besiyeri ve madde uygulanan PC-12 Adh hücrelerinde farklılaşmaya bağlı olarak hücre indeksi artışı, e-plaka kullanılarak analiz edilmiştir (Dwane ve ark., 2013). Cihaz hücre indeksi değerlerini aşağıdaki formüle göre hesaplamaktadır.

$$\text{Hücre indeksi (CI)} = \max_{i=1, \dots, N} + \left(\frac{R_{\text{hücre}}(fi)}{R_0(fi)} - 1 \right)$$

Formüldeki $R_{\text{hücre}}$ yada R_0 değerleri plakanın her bir gözünde bulunan hücreli yada hücresiz alanların verdiği direncin sıklığına göre ölçülür.



Şekil 21. RTCA DP Cihazının Çalışma Prensibi (http-10)

Deney grupları ve kullanılan konsantrasyonlar şu şekildedir:

Kontrol (%0.1 DMSO),

NGF (100 nM),

TSA (10 nM),

TSA (100 nM),

TSA(10 nM) + NGF (100 nM),

TSA(100nM) + NGF (100 nM),

RG108 (10 nM),

RG108 (100 nM),

RG108 (10 nM) + NGF (100 nM),

RG108 (100 nM) + NGF (100 nM).

Bu çalışmada TSA ve RG108'in, hücre invazyon, migrasyon ve aynı zamanda hücre proliferasyonu üzerine etkileri gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir.

Proliferasyon çalışmasında 96'lık e-plaka kullanılmıştır. Hücre sayısı ve canlılığının belirlenebilmesi için PC-12 Adh hücreleri Cedex XS cihazında sayılmıştır. 100 µl besiyeri içerisinde 2×10^4 hücre olacak şekilde farklılaşma besiyeri ile sulandırılan hücreler ekim için hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılacak e-plakalara 100 µl, %1 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM farklılaşma besiyeri eklenmiş ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra e-plakalar cihazdan çıkarılmıştır. Daha sonra 100 µl besiyeri üzerine, önceden hazırlanmış olan 100 µl'de 2×10^4 PC-12 Adh hücresi olacak şekilde besiyeri ile ekim yapılmıştır. 30 dakika steril kabinde hücrelerin e-plate tabanına tutunması beklendikten sonra, plakalar cihaza yerleştirilmiş ve saatte 1 ölçüm olacak şekilde cihaz programlanmış ve deney başlatılmıştır. PC-12 Adh hücreleri önceden yapılan proliferasyon çalışmalarına ait indeks değerleri baz alınarak belirlenen bir indeks değerine ulaşıldıktan sonra, cihaz durdurulmuş ve hücre-besiyeri karışımından 100 µl

çekilip atılmıştır. Taze hazırlanan TSA (10 ve 100 nM), RG108 (10 ve 100 nM), NGF (100 nM) ve NGF (100 nM) + RG108 ya da TSA (10 ya da 100 nM) konsantrasyonları e-plaka kuyucuklarına farklılaşma 100 µl besiyeri içerisinde eklenmiştir. E-plakalar steril kabinde yaklaşık 15 dakika bekletildikten sonra cihaza yerleştirilmiş ve program kaldığı yerden devam ettirilmiştir. Alınan hücre indeks değerleri hücre farklılaşması olarak RTCA DP analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir.

İnvazyon Yöntemi

İnvazyon çalışmasında kullanılacak matrijel kaplı CIM plakalar Roche-Almanya'dan temin edilmiştir. CIM plaka, invazyon yeteneği olan hücrelere geçiş olanağı sağlayan iki odacıklı bir düzendir. Odacıklar arasında bulunan matrijel mikro gözenekli bir membran yapısındadır. Hücreler tabanı matrijel ile kaplanan üst odacığa serum içermeyen besiyeri içerisinde ekilirler. Alt odacıkta serumlu besiyeri yer almaktadır ve hücrelerin membranı geçerek serumlu besiyerine ulaşmaları hedeflenmektedir.



Şekil 22. İnvazyon Ve Migrasyon Çalışmalarında Kullanılan 16 Kuyucuklu CIM Plaka

İnvazyon çalışması için +4 °C'de bekletilen soğuk serumsuz besiyeri ve soğuk pipet uçları kullanılarak %5'lik matrijel hazırlanmıştır. +4 °C'de bekletilen CIM plakanın üst odacığın 50µl matrijel olacak şekilde hızlı bir şekilde yüklenmiş ve kuyucuğun tabanını düz bir tabaka halinde kaplamak için 30µl'si geri çekilmiştir. Sonrasında kuyucuklarında matrijel bulunan üst odacık 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda invazyon çalışması için CIM plakanın alt odacığın 160 µl serumlu medyum eklenmiş ve üst odacık ile alt odacık birleştirilmiştir. Daha sonra üst odacığın 20 µl serumsuz medyum eklenmiş ve CIM plaka 1 saatliğine 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

1 saatlik inkübasyondan sonra cihazdan ilk ölçümler alınmış (Hücre farklılaşması yönteminde açıklanmıştır), kuyucuklarda problem olmadığından emin olunduktan sonra her kuyuya 100 µl serumsuz besiyeri içerisinde 2×10^4 hücre ekilmiştir. Gruplar ve kullanılan konsantrasyonlar şu şekildedir:

Kontrol (%0.1 DMSO),

NGF (100 nM),

NGF (100 nM) +TSA(100nM),

NGF (100 nM) + RG108 (100 nM).

Hücrelerin üzerine de belirli kuyucuklarda uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrasında CIM plakalar cihaza yerleştirilmiş ve 72 saat boyunca her 10 dakikada bir ölçüm olacak şekilde programlanarak analiz başlatılmıştır. Cihazda elde edilen hücre indeksi değerleri, RTCA DP analiz programı kullanılarak slope grafiğine aktarılmıştır.

Migrasyon Yöntemi

Migrasyon çalışması için de CIM plaka kullanılmaktadır. Fakat invazyon analizinden farklı olarak migrasyon analizinde üst odacık matrijel ile kaplanmaz. Sadece hücrelerin içerisinde buldukları serumsuz besiyeri ortamından, alt odacıkta bulunan serumlu besiyeri ortamına geçişleri amaçlanır. Migrasyonu hızlı olan hücreler daha çok alt odacığa geçerek çoğalırlar ve geçiş sırasında cihaz tarafından sinyal alınır. Migrasyona uğramayan hücreler ise üst odacıkta kalırlar ve sinyal alımı olmaz (**Şekil 22**).

Migrasyon çalışması için CIM plakanın alt odacığın 160 µl serumlu medyum eklenmiş ve üst odacık ile alt odacık birleştirilmiştir. Daha sonra üst odacıklara 20 µl serumsuz medyum eklenmiş ve CIM plaka 1 saatliğine 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

1 saatlik inkübasyondan sonra cihazdan ilk ölçümler alınmış, kuyucuklarda problem olmadığından emin olunduktan sonra her kuyuya 100 µl serumsuz besiyeri içerisinde 2×10^4 hücre ekilmiştir. Gruplar ve kullanılan konsantrasyonlar invazyon çalışması ile aynıdır.

Hücrelerin üzerine belirli kuyucuklarda uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrasında CIM plaka cihaza yerleştirilmiş ve 72 saat boyunca her 10 dakikada bir ölçüm olacak şekilde programlanarak analiz başlatılmıştır. Cihazda elde edilen hücre indeksi değerleri, RTCA DP analiz programı kullanılarak slope grafiğine aktarılmıştır.

Migrasyonun Morfolojik Analizi

PC-12 Adh hücre migrasyonunu, görsel olarak da belirlemek amacıyla The Oris™ Cell Migration ölçüm kiti kullanılarak çalışılmıştır (**Şekil 23**). Kit içerisinde, hücre ekimi yapılırken 96’lık kuyucukların hepsinde aynı orta noktanın boş kalabilmesini sağlayan *Oris™ Cell Seeding Stoppers* ile birlikte gelen özel bir plaka bulunmaktadır. Ekim yapıp stopperlar yine kitin içerisinde yer alan *Oris™ Stopper Tool* isimli özel bir tarak ile çıkarıldıktan sonra, her kuyucuk hücrelerin göç edebileceği eşit bir alana sahip olmaktadır. Hücreler immüno floresan boya ile işaretlendikten sonra plakanın altına *Oris™ Detection Mask* isimli her plakada aynı orta noktanın gözükmesini sağlayan bir alet yerleştirilir ve boş alana göç eden hücrelere göre migrasyon analizi yapılır.

PC-12 Adh hücreleri flasktan kaldırılmış ve Cedex XS cihazı ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler %1 FBS içeren farklılaşma besiyeri içerisinde her kuyucukta 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde 100 µl farklılaşma besiyeri içinde 96’lık özel plakaya stopperın kenarından ekildi. Yaklaşık 6 saat boyunca hücrelerin plaka tabanına yapışması beklendikten sonra stopperlar *Oris™ Stopper Tool* yardımıyla dikkatlice plakadan çıkarıldı.

Farklılaşma besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kullanılan konsantrasyonlar olan,

Kontrol (%0.1 DMSO),

NGF (100 nM),

TSA(100nM) + NGF (100 nM),

RG108 (100 nM) + NGF (100 nM),

100 µl farklılaşma besiyeri içerisinde uygun kuyucuklara dağıtıldı. Daha sonra plaka 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonunda her bir konsantrasyona ait 3 kuyuya 10 µl Hoechst 33258 eklenerek migrasyon yapmış hücrelerin çekirdeklerinin boyaması yapıldı. 10 dakika beklendikten sonra plakasına altına *Oris™ Detection Mask* yerleştirildi ve Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader ile 24., 48. ve 72. saatlerde kuyuların fotoğraf çekimleri ile hücre sayımları yapıldı. Gruplara ait fotoğraf görüntüleri bulgular kısmında verilmiştir.



Şekil 23. The Oris™ Cell Migration Ölçüm Kiti

İmmünofloresan Boyama Yöntemi İle Nörit Gelişiminin Belirlenmesi

Normal kültür şartlarında farklılaşmamış PC-12 Adh hücreleri işlem görmemiş hücre kültür flask tabanına gevşek şekilde tutunmaktadır (Welle ve ark., 2005). Flask yüzeyinin kollajenle kaplı olması durumunda ise daha sıkı tutunup hızla bölünüp çoğalabilmektedirler. Bu nedenle immünofloresan boyama yapılacak çeşitli büyüklükteki plakalar üretici firmanın önerisi doğrultusunda aşağıdaki şekilde kollajen tip IV ile kaplanmıştır.

Plakaların Kollajen Tip IV ile Kaplanması

- Kollajen tip IV (Sigma, C5533), %0.25'lik asetik asit içerisinde çözüldü ve konsantrasyonu 2,0 mg/ml olan ana stok hazırlandı.

- Ana stok konsantrasyon 1:50 olacak şekilde distile su ile sulandırıldı ve 40µg/ml konsantrasyonda ara stok hazırlandı.
- Ara stoktan kaplanan plakanın kuyucuk büyüklüğüne göre kollajen tip IV çözeltisi çekildi ve kuyucuklara bırakıldı.
- Plakalar 37°C'de 1 gece bekletildi.
- Kollajen tip IV çözeltisi kuyucuklardan çekilip atıldı.
- Kuyucuklar %70'lik etanol ile yıkandı.
- Kuyucuklar 3 defa steril 1xPBS ile yıkandı.
- Tabanı kaplayacak şekilde 1xPBS kuyucuklara bırakıldı ve plakalar kullanılacağı zamana kadar +37°C'de bekletildi.
- Plakalar kullanılmadan önce kuyucuklardaki 1xPBS çekilip atıldı ve plakaların kuruması beklendi.

İmmünofloresan boyaların hazırlanışı

İmmünofloresan boyama tekniğinin temeli, floresan işaretli antikorların spesifik antijenleri ile etkileşmesine izin verilmesi ve oluşan ürünlerin floresan mikroskop altında gözlemlenmesine dayanmaktadır. Aydınlatıldığı ışıktan daha, uzun tek bir dalga boyunda ışık yayan bileşenler floresan özellik gösterirler. Floresan boyalar florokrom olarak adlandırılır (Beutner, 1961).

PC-12 Adh hücreleri, %10 at serumu, %5 fetal dana serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM büyüme besiyerinde yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra flasttaki besiyeri çekilip atılmış ve 5ml farklılaşma besiyeri (%1 fetal bovine serum ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM) flaska eklenerek ve kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırılmıştır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra her kuyucukta 96'lık plakada 2×10^3 hücre olacak şekilde kollajen IV kaplı plakalara hücre ekim yapılmıştır. Yaklaşık 6 saat boyunca hücrelerin plaka tabanına yapışması beklenmiştir. Kuyucuklardaki besiyeri atılmış ve kontrol, NGF, Trikostatin A, RG108 ve ilaçlar+NGF içeren kombinasyonlara ait konsantrasyonlar farklılaşma besiyeri içinde belirli kuyucuklara eklenmiştir.

Daha sonra hücre farklılaşması için 7 gün plakalar inkübe edilmiştir. 7 günlük hücre farklılaşması ve nörit gelişimi bakımından plakalar Leica DM 300 inverted mikroskop ile fotoğraflanmış ve analiz edilmiştir.

96'lık plakalarda immünofloresan boyamanın yapılışı

- Hücreler 1xPBS solüsyonu ile yıkanmış ve her %80 metanol ile 5 dakika fikse edilmiştir.
- Hücreler 1xPBS ile yıkanmış ve %0.1 PBS-Tween 20 ile 20 dakika permeabilize edilmiştir
- Birincil antikorun (Anti-beta III Tubulin [2G10] antikor, (Abcam, ab78078)) özgül olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla hücreler %5 FBS, %5 at serumu, %10 BSA ve 0,3M glisin içeren 1xPBS ile 1 saat inkübe edilmiştir.
- Antikorları sulandırmak amacıyla da aynı çözelti kullanılmış ve birincil antikor 1:250 oranında dilüe edilmiştir.
- Sulandırılan antikor her kuyucuğa 100 µl dağıtılmış ve kollajen IV kaplı 96'lık plaka bir gece +4°C'de bırakılmıştır.

- İnkübasyon süresi sonunda birincil antikorlu karışım kuyucuklardan çekilip atılmış ve hücreler 1xPBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama sonrasında birincil antikorda kullanılan aynı çözeltiyle 1:500 oranında sulandırılan ikincil antikor (Goat anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor®488), (Abcam, ab150113)) her kuyucuğa 100 µl dağıtılmış ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresinin son 10 dakikasında ikincil antikorlu karışıma 10 µl Hoechst 33258 eklenerek çekirdek boyaması yapılmıştır.
- Plaka Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader cihazına yerleştirilmiş ve hücreler fotoğraflanmıştır..

Nörit Uzunluğu Analizi

Sıçan feokromasitoma (PC-12 Adh) hücre hattı daha önce de bahsedildiği gibi nöronal farklılaşma ve özgün büyüme faktörü sinyallerinin araştırılması için yaygın olarak kullanılan bir nöronal sistem modelidir. PC-12 hücreleri sinir büyüme faktörü (NGF) ile uyarıldığı zaman, hücre döngüsünde durma, serumsuz besiyerinde hayatta kalma ve nörit uzaması gibi sempatik nöronların özelliklerini taklit ettikleri varsayılmaktadır. PC-12 Adh hücrelerinde, nitrik oksit gibi spesifik nörotransmitterlerin üretimi de dahil olmak üzere nörit uzaması, proliferasyonun durması gibi olaylar, nöronal fenotipin bir özelliğidir(Huang ve ark., 2003). NGF'ün diğer üç nitrik oksit sentetaz izoformlarını indükleyerek nitrik oksit üretimini artırdığı ve NGF yokluğunda da nitrik oksitin tek başına NO-cGMP-PKG yolağıyla ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinaz (ERK) aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir(Yamazaki ve ark., 2005).

Bu çalışmada NGF pozitif kontrol olarak 100 nM konsantrasyonda kullanılmıştır. %10 At serumu, %5 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde uygun büyüklüğe ve sayıya ulaşan PC-12 hücreleri, kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak Cedex XS ile daha önce bahsedilen şekilde sayılmış ve besiyeri %1 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM farklılaşma besiyeri ile değiştirilerek her kuyucukta 2×10^3 hücre olacak şekilde, kollajen IV ile kaplı olan 96 kuyucuklu BD BioCoat™ Collagen IV Cellware plakalarına 100 µl besiyeri içerisinde ekim yapılmıştır. Hücrelerin plaka tabanına tutunması için 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda farklılaşma besiyeri ile taze hazırlanan konsantrasyon grupları şu şekildedir:

DMSO (%0.1) kontrol,

NGF (100 nM),

TSA (10, 100 nM),

NGF (100 nM) + TSA (10, 100 nM),

RG108 (10, 100 nM),

NGF (100 nM) + RG108 (10, 100 nM).

İlaç konsantrasyonları, kuyucuktaki besiyerleri çekildikten sonra her kuyucukta 100 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Hücrelerin ilaç konsantrasyonları ile 7 gün inkübasyonu sonunda, kuyucuklar rasgele fotoğraflanarak her konsantrasyondan Leica DM 300 Inverted mikroskop ile yaklaşık 15 fotoğraf çekilmiştir.

Nörit uzunluğu analizi, kontrole göre nörit büyümesi gözlenen:

NGF (100 nM),

NGF (100 nM) + TSA (100 nM),

NGF (100 nM) + TSA (10 nM),

NGF (100 nM) + RG108 (100 nM),

NGF (100 nM) + RG108 (10 nM),

konsantrasyonları için yapılmıştır. Nörit uzunluğu analizi için rasgele çekilen fotoğraflar arasından en az 20 nörit bulunan fotoğraflar arasından her konsantrasyon grubu için 5 adet fotoğraf olmak üzere toplamda 25 fotoğraf seçilmiştir.

Seçilen her bir fotoğrafta nörit uzunluğu hücre somasının iki katı ve üzerinde olan rasgele 20 adet hücre işaretlenmiş ve bu hücrelerden çıkan en uzun nöritin eğer varsa en uzun dalı ölçülerek 1 hücrenin nörit uzunluğu olarak kaydedilmiştir. Bir fotoğrafta 20, toplamda bir konsantrasyon için ise 100 hücrenin nörit uzunluğu mikroskobun analiz programı ile piksel cinsinden ölçülmüştür. Daha sonra uzunluklar toplanmış, 100'e bölünmüş ve her konsantrasyon grubu için bir nöritin ortalama uzunluğu elde edilmiştir. Piksel cinsinden elde edilen bu değer mikrometreye çevrilerek grafik çizilmiştir.

Nörit Uzaması ile İlişkili Olarak MMP-2 (Matriks Metalloproteinaz-2) Miktarının Belirlenmesi

Ekstraselüler matriks (ESM), hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan dinamik ve interaktif bir yapıdır (Libby ve ark., 1999). Hücre-matriks etkileşimleri ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler (ekstraselüler proteazlar) tarafından düzenlenir. Bu enzim sistemlerinin içinde MMP'ler önemli bir grubu oluşturmaktadır. MMP'ler, ESM bileşenlerini yıkıma uğratan Zn⁺⁺ ve Ca⁺⁺'a bağımlı nötral endopeptidaz ailesi olarak bilinirler. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar. MMP'ler, normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. Bunlar arasında kemiğin yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi, anjiyojenez, inflamasyon, apoptozis, immün cevap gelişimi, embriyonik gelişim, blastosit implantasyonu, organ morfogenezi, sinir hücre gelişimi, ovülasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterin involüsyonu, endometriyal siklus ve saç folikülü siklusu sayılabilir (Nagase ve Woessner, 1999).

MMP-2 ELISA Yöntemi

Bu çalışmada PC-12 Adh hücrelerindeki MMP-2 miktarını belirlemek için ELİZA (Enzim bağlantılı immünosorbent yöntemi) kullanılmıştır. PC-12 Adh hücreleri, kontrol, RG108, TSA, NGF ve ilaç kombinasyonlarını içeren konsantrasyonlarda farklılaşma besiyeri içerisinde 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 7 günün sonunda hücre supernatantları toplanmış, santrifüjlenmiş ve supernatantlar buz üzerinde bekletilerek Rat MMP-2 ELISA kiti ile gruplara ait supernatantlarda MMP-2 miktarının ölçümü yapılmıştır. Bu yöntemde, kit içerisinde yer alan MMP-2 proteinine özgü bir poliklonal antikor ile kaplanmış 96'lık kuyucuklu plaka

kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan MMP-2 miktarları belli olan standart konsantrasyonlar ve örneklere ait MMP-2 konsantrasyonları bilinmeyen supernatantlar aynı anda kit prosedürüne uygun olarak plakaya yerleştirilmiştir. Yöntem uygulandıktan sonra absorbans ölçümü yapılmış ve konsantrasyonu bilinen standartların absorbans değerlerine göre bir standart eğrisi çizilmiştir. Standart eğri grafiği bulgularda verilmiştir. Bu eğri yardımıyla örneklere ait MMP-2 absorbanslarına göre MMP-2 miktarları hesaplanmıştır. Gruplara ait MMP-2 miktarlarının ortalamaları alınarak gruplara göre grafik çizilmiştir.

MMP-2 ELISA yöntemine göre, ilk inkübasyon sırasında örnek ve standartlardaki MMP-2 antijeni plakanın tabanında yer alan MMP 2 antikoruyla bağlanır. Yıkamadan sonra, MMP-2 için spesifik olan biotinlenmiş monoklonal bir anti-MMP-2 antikoru eklenir, tekrar yıkanır ve kuyucuklara HRP-konjugatlı streptavidin eklenir. Üçüncü inkübasyondan ve bağlanmamış enzimler yıkandıktan sonra, renk üretebilmek için TMB substrat solüsyonu eklenir. Bu aşamada kuyucuklarda renk değişimi gözlenir. Bu rengin yoğunluğu doğrudan ilk örnekte bulunan MMP 2 konsantrasyonu ile orantılıdır. Stop solüsyonu eklenerek renk değişimi durdurulur ve absorbans ölçümü yapılır.

MMP-2 Miktarının ELISA Yöntemiyle Ölçülmesi

6'lı plakaya her kuyucukta 4×10^4 hücre olacak şekilde %1 FBS içeren DMEM farklılaşma besiyeriyle hücrelerin ekimi yapılmış ve 6 saat sonra taze hazırlanmış:

DMSO (%0.1) kontrol,

NGF (100 nM),

NGF (100 nM) + TSA (100 nM),

NGF (100 nM) + TSA (10 nM),

NGF (100 nM) + RG108 (100 nM),

NGF (100 nM) + RG108 (10 nM) konsantrasyonları 2 mL farklılaşma besiyeri içerisinde kuyucuklara uygulanmıştır. 7 günlük inkübasyon süresi sonunda hücrelerin supernatantları toplanmış ve santrifüjlenmiştir.

Kit prosedürüne göre MMP-2 standartları 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 ve 0.156 ng/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir. Standartlar ve örnekler kit içerisinde yer alan 96'lık plakaya yerleştirilmiş ve üzeri filmle kapatılarak 37°C 'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatin sonunda kit içeriğine uygun hazırlanan 100 μL Detection Reagent A kuyucuklara eklenmiş ve üzeri filmle kapatılmıştır. Plaka 1 saat 37°C 'de inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklar taze hazırlanan yıkama solüsyonuyla her kuyucuğa 200 μL solüsyon eklenerek 3 kez yıkanmış ve her kuyucuğa kit içeriğine uygun hazırlanan Detection Reagent B eklenmiş ve üzeri filmle kapatılmıştır. Plaka 30 dakika 37°C 'de inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklar her kuyucuğa 200 μL solüsyon eklenerek 5 kez yıkanmıştır. Yıkama sonunda her kuyucuğa 100 μL TMB Substratı eklenmiş ve kuyucuklardaki MMP 2 miktarıyla doğru orantılı olarak mavi renk oluşmaya başlamıştır. Üzeri filmle kapalı olarak 30 dakika 37°C 'de bırakılan plakaya, süre sonunda 100 μL reaksiyonu durdurma (stop) çözeltisi eklenmiş ve rengin maviden sarıya dönmesi beklenmiştir. Sarı renk görüldükten sonra kuyucukların absorbansı Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode

Reader ile 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Herbir grup 5n olarak çalışılmıştır. Standart grafiğine göre elde edilen formül kullanılarak örneklerin absorbans değerlerine göre MMP-2 miktarları belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

MTT analizi, invazyon ve migrasyon slope grafikleri, MMP-2 konsantrasyonları ve nörit analizi, SPSS Statistics 17.0 programı kullanılarak, tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ önemli derecede fark var, $p<0.001^{***}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

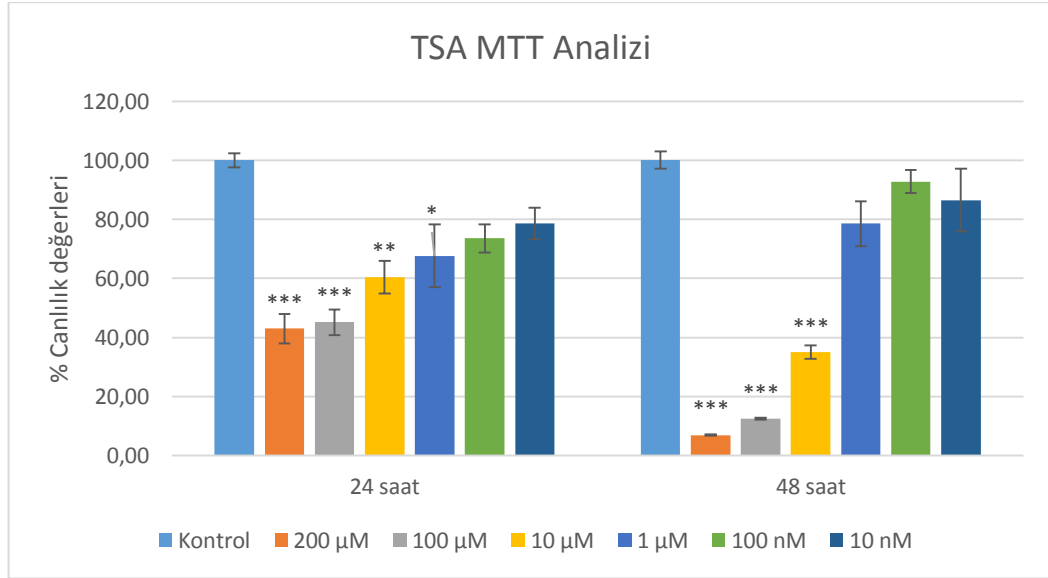
BULGULAR ve TARTIŞMA

Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi

PC-12 Adh hücreleri 200, 100, 10, 1 μ M ve 100, 10 nM TSA ve RG108 konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon sonunda TSA ve RG108'in PC-12 Adh hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri, MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

Deney gruplarına ait MTT absorbans değerleri Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek) cihazında 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. DMSO (%0.1) kontrol grubunun absorbans değeri %100 kabul edilerek her bir örneğin % hücre canlılık değerleri belirlenmiş, her bir gruba ait 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile korelasyon göstermektedir. Gruplara ait % canlılık değerleri **Şekil 24** ve **Tablo 2'** de verilmiştir.

Özellikle TSA'nın 200, 100 ve 10 μ M konsantrasyonlarının hem 24. hem de 48. saatte, 1 μ M konsantrasyonunun ise 24. saatte % canlılık değerleri kontrole göre önemli derecede azalmıştır. PC-12 Adh hücrelerinde, TSA'nın 200, 100, 10 ve 1 μ M konsantrasyonlarında önemli sitotoksik etkiler gözlenmiştir ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$).



Şekil 24. TSA Konsantrasyonlarının, PC-12 Adh Hücre Hattında MTT Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama \pm Standart Sapma) (n=8) ($p<0.05^*$, $p<0.01^{}$, $p<0.001^{***}$)**

PC-12 hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değerleri, kontrol grubuna göre 200, 100, 10, 1 μ M ve 100, 10 nM TSA konsantrasyonlarında sırasıyla % 43.03, 45.16, 60.47, 67.68, 73.54 ve 78.62 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 24. saatte 200 ve 100 μ M TSA konsantrasyonlarında $p<0.001^{***}$, 10 μ M'da $p<0.01^{**}$, 1 μ M TSA konsantrasyonunda $p<0.05^*$ olarak belirlenmiştir.

PC-12 Adh hücrelerinde 48. saatteki % canlılık değerleri, kontrol grubuna göre 200, 100, 10, 1 μM ve 100, 10 nM TSA konsantrasyonlarında sırasıyla % 6.89, 12.44, 34.95, 78.54, 92.81, 86.47 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 48. saatte 200, 100 ve 10 μM TSA konsantrasyonlarında $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir. TSA konsantrasyonlarının 48. saatte % canlılık değerleri konsantrasyon artışına göre sırasıyla, %86.47, 92.81, 78.54, 34.95, 12.44 ve 6.89 oranında belirlenmiştir.

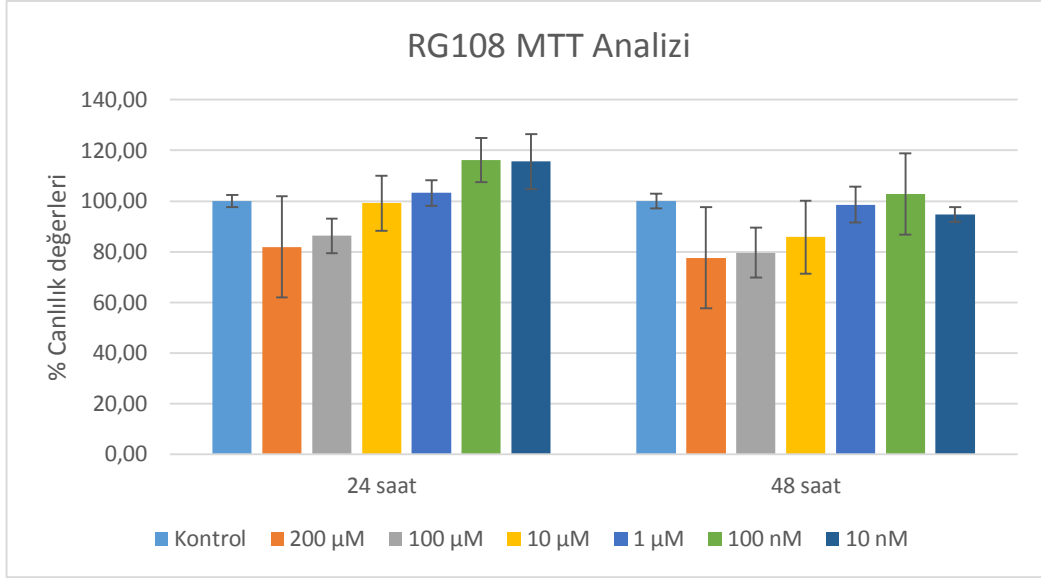
PC-12 Adh hücrelerinde TSA konsantrasyonlarının MTT sonuçlarına göre hesaplanan % hücre canlılık değerleri **Tablo 2**'de verilmiştir.

Tablo 2. TSA'nın Farklı Konsantrasyonlarının PC-12 Adh Hücre Hattı Üzerinde MTT Testi Sonuçlarına Göre % Canlılık Değerleri

TSA konsantrasyonları	% Canlılık Değerleri (Kontrol % 100)	
	24 saat	48 saat
200 μM	43.03	6.89
100 μM	45.16	12.44
10 μM	60.47	34.95
1 μM	67.68	78.54
100 nM	73.54	92.81
10 nM	78.62	86.47

PC-12 Adh hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değerleri, kontrol grubuna göre 200, 100, 10, 1 μM ve 100, 10 nM RG108 konsantrasyonlarında sırasıyla % 81.90, 86.26, 99.22, 103.24, 116.10, 115.58 olarak hesaplanmıştır. Özellikle 10 nM RG108 konsantrasyonunda 24. saatte PC-12 Adh hücre proliferasyonu artmış, 200 μM konsantrasyonda da azalmış, ancak anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

PC-12 Adh hücrelerinde 48. saatteki % canlılık değerleri, kontrol grubuna göre 200, 100, 10, 1 μM ve 100, 10 nM RG108 konsantrasyonlarında sırasıyla % 77.62, 79.62, 85.76, 98.53, 102.78 ve 94.73 olarak hesaplanmıştır. Bu verilere göre düşük RG108 konsantrasyonlarının 48. saatte PC-12 Adh hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkileri görülmemiştir. 200 ve 100 μM RG108 konsantrasyonlarında ise hücre proliferasyonunu kontrole göre azalmış ancak istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemiştir (**Şekil 25**) ($p > 0.05$).



Şekil 25. RG108 Konsantrasyonlarının, PC-12 Adh Hücre Hattında MTT Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) ($p>0.05$; anlamsız)

PC-12 Adh hücrelerinde RG108 konsantrasyonlarının MTT sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerleri **Tablo 3**'te görülmektedir.

Tablo 3. RG108'in PC-12 Adh Hücre Hattı Üzerinde MTT Testi Sonuçlarına Göre % Canlılık Değerleri

RG108 konsantrasyonları	% Canlılık Değerleri (Kontrol % 100)	
	24 saat	48 saat
200 µM	81.90	77.62
100 µM	86.26	79.62
10 µM	99.22	85.76
1 µM	103.24	98.53
100 nM	116.10	102.78
10 nM	115.58	94.73

Bu çalışmada TSA'nın 200, 100 ve 10 konsantrasyonlarının hem 24. saatte hem de 48. saatte, 1 µM konsantrasyonunun ise yalnızca 24. saatte, PC-12 hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri belirlenmiştir. RG108'in ise uygulanan hiçbir konsantrasyonda anlamlı sitotoksik etkisi analiz edilmemiştir, ancak hücre proliferasyonunun kontrole göre yüksek RG108 konsantrasyonlarında azaldığı görülmüştür. MTT analizi % canlılık değerleri sonuçlarına göre, daha sonraki deneyler sitotoksik etkilerin görülmediği 100 ve 10 nM TSA ve RG108 konsantrasyonları ile çalışılmıştır.

Literatür taramasında, TSA ve RG108'in PC-12 Adh hücre hattı üzerindeki sitotoksitelerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, 5-azasitidin, 5-aza-2'-deoksisitidin, zebularine, prokain, epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve RG108 kullanılarak yapılan bir çalışmada, DNMT inhibitörlerinin TK6 (insan lenfoblastoit hücresi), Jurkat (lenfosit hücresi), KG-1 (insan kemik iliği) ve HCT-116 (insan kolorektal karsinoma) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda RG108'in, 10-100 mM konsantrasyon aralığında sitotoksik ve genotoksik etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir ve 200 nmo/L RG108'in tam DNA metiltransferaz inhibisyonu yaptığı kanıtlanmıştır (Stresemann, 2006). Brueckner ve arkadaşlarının NALM6 ve HCT116 hücre hatları üzerinde yaptıkları bir çalışmada RG108'in IC50 konsantrasyonunun 115 nmol/L olduğu rapor edilmiştir. (Brueckner ve ark., 2005).

Haifeng Wang ve arkadaşları tarafından, C17.2 nöronal kök hücreleri üzerinde bir histon deasetilaz inhibitörü olan Trikostatın A'nın sitotoksik etkilerinin WST-1 yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, 250 ve 500 nM TSA konsantrasyonunun nöronal kök hücre sayısını kontrole göre önemli derecede azalttığı açıklanmıştır.

Serebellar granül nöronlarıyla yapılan bir MTT çalışmasında ise TSA'nın 24. saatte 100 nM ve üzeri konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Brad ve ark., 2006).

TSA'nın kullanıldığı başka bir çalışmada, 30 nM'a kadar artan TSA konsantrasyonlarıyla kortikal nöronal hücreler 14 gün inkübe edilmiştir. Sonrasında yapılan MTT çalışmasında, 30 nM TSA konsantrasyonu kullanılan hücrelerde proliferasyonun anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Jeonga ve ark., 2003).

Bir HDAC inhibitörü olarak kanser tedavisinde kullanılan, TSA'nın, 100 nM ve üzeri konsantrasyonlarda, insan meme kanseri hücrelerinde (Sun ve ark., 2014), osteosarkomada (Dong-Dong ve ark., 2012), nöroblastomada (Hamnera ve ark., 2008) ve insan gastrik kanser hücre hatlarında (Ju-Hee ve ark., 2006) *in vitro* antitümoral etkisi olduğu rapor edilmiştir.

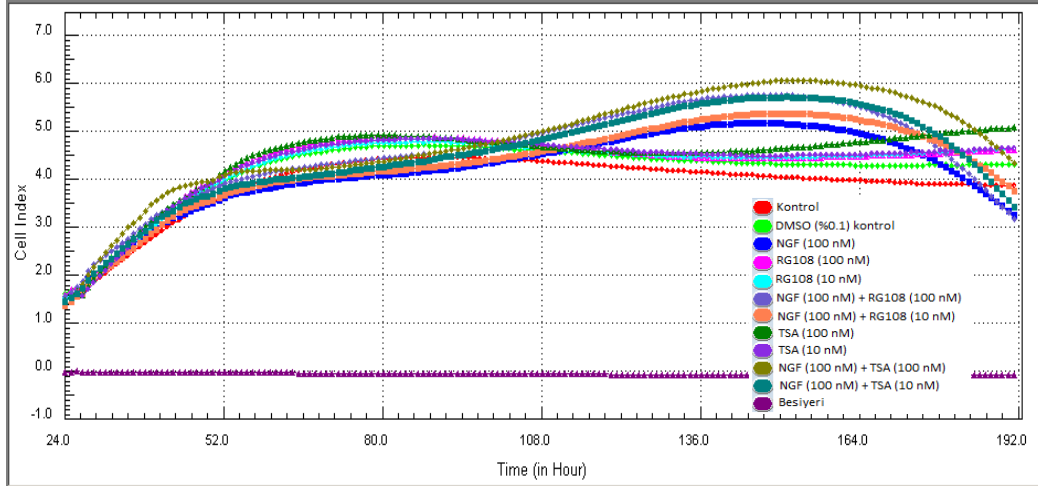
Trikostatın A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Hücre Farklılaşmasına Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Değerlendirilmesi

RTCA DP sistemiyle 96'lık altın ve elektrot kaplı plakaların her bir kuyucuğuna 100 µL de 1×10^4 sayıda PC-12 Adh hücreleri ekilmiş ve hücrelerin farklılaşma medyumuna içindeki büyüme, çoğalma ve özellikle farklılaşmaya bağlı olarak alınan hücre indeks (cell index) değerlerine göre çizilen grafikler belirli zaman aralıklarında bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir. Hücreler belirli bir hücre indeks değerine ulaştığı zaman (24. saatte) kuyucuklardaki hücrelerin üzerine aşağıdaki deney gruplarına ait konsantrasyonlar farklılaşma besiyeri içinde 8n olarak uygulanmıştır.

Bu çalışmada gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) kontrol ve ilaç konsantrasyonlarının PC-12 Adh hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak hücre indeks değerleri 7 gün süresince izlenmiş ve cihazın RTCA DP Software 1.2.1

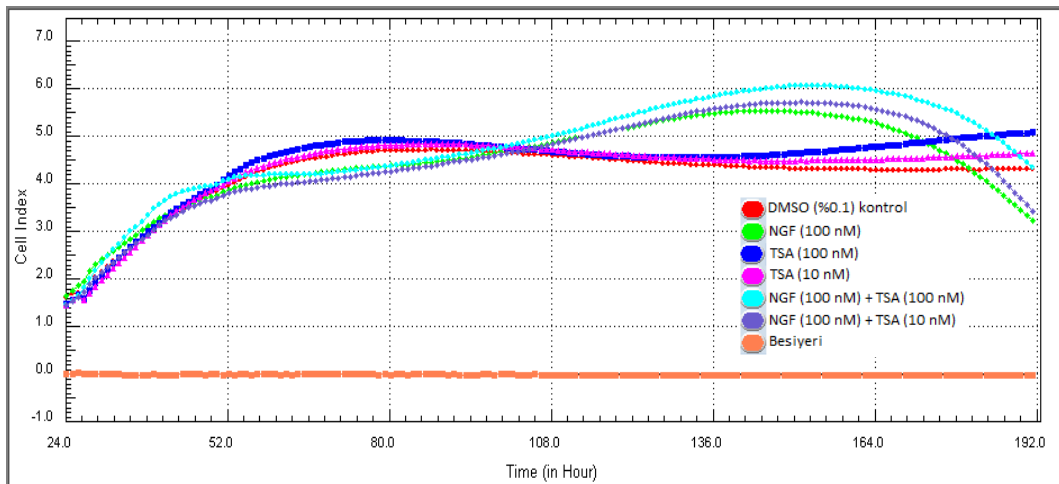
programında hücre indeks değerleri zamana göre grafiklendirilerek değerlendirilmiştir (Şekil 26).

Bu çalışmada PC-12 Adh hücrelerine uygulanan konsantrasyonlar farklılaşma medymu içinde (%1 serum) uygulandığı için cell index değerindeki artış, proliferasyondan daha çok hücrelerin farklılaşarak nöron uzantısı yapması ile ilişkilendirilmiştir (Dwane ve ark., 2013).



Şekil 26. PC-12 Adh Hücrelerinde Farklılaşma Besiyeri İle Uygulanan Tüm Deney Gruplarının RTCA DP İle Kaydedilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği

Şekil 27 ve Tablo 4'te görüldüğü gibi ilk 3 günlük inkübasyon süresince gruplar arasındaki hücre indeks değerleri birbirine yakın olmakla birlikte, en fazla hücre indeks artışı 100 ve 10 nM TSA konsantrasyonlarında görülürken, 4 ve 7. günler arasında ise farklılaşmaya bağlı olarak NGF (100 nM) ve NGF+ TSA kombinasyon gruplarında görülmüştür. Özellikle 7 günlük inkübasyon sonunda, en fazla nörit uzunluk ve dallanmasının belirlendiği NGF+TSA (100 nM) kombinasyon grubunda, hücre farklılaşmasına bağlı olarak, hücre indeks değerlerinin artmış olduğu analiz edilmiştir.

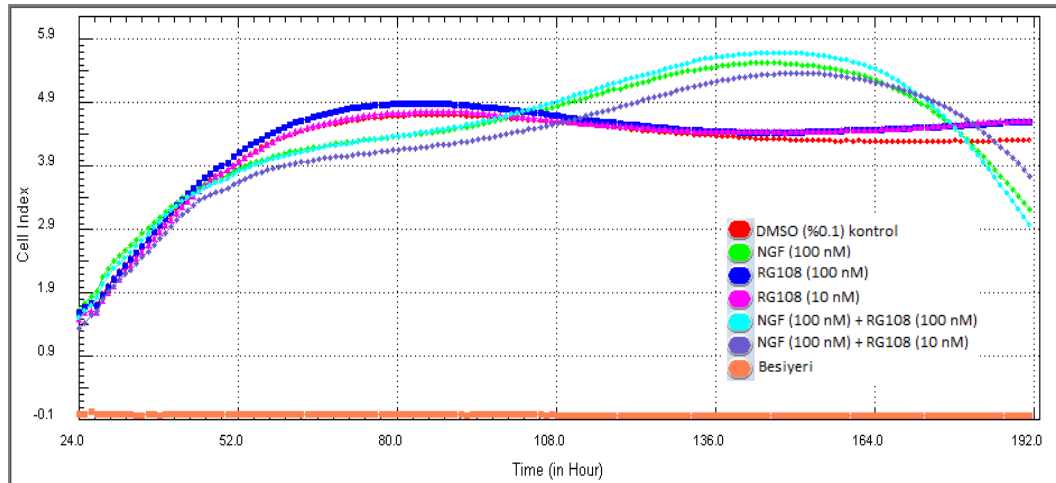


Şekil 27. PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 Nm) Ve TSA (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği

Tablo 4. DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM) Ve TSA (10 ya da 100 nM) Konsantrasyonlarının PC-12 Adh Hücrelerinde 7 Günün Sonunda RTCA DP'deki Hücre İndeks (CI) Değerleri

GRUPLAR	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	7. gün
DMSO (%0.1) kontrol	1.57	3.68	4.53	4.59	4.41	4.25	4.23
NGF (100nM)	1.61	3.64	4.22	4.52	5.06	5.43	3.06
TSA (100nM)	1.43	3.77	4.79	4.72	4.50	4.50	4.99
TSA (10nM)	1.42	3.73	4.64	4.72	4.53	4.40	4.56
NGF (100nM) + TSA (100nM)	1.42	3.88	4.19	4.60	5.30	5.88	4.12
NGF (100nM) + TSA (10nM)	1.41	3.56	4.07	4.47	5.07	5.58	3.22

Şekil 28 ve **Tablo 5**'te görüldüğü gibi ilk 3 günlük inkübasyon süresince gruplar arasındaki hücre indeks değerleri birbirine yakın olmakla birlikte, en fazla hücre indeks artışı 100 ve 10 nM RG108 konsantrasyonlarında görülürken, 4 ve 7. günler arasında ise farklılaşmaya bağlı olarak NGF (100 nM) ve NGF+ RG108 kombinasyon gruplarında görülmüştür. Özellikle 7 günlük inkübasyon sonunda, en fazla nörit uzunluk ve dallanmasının belirlendiği NGF+TSA (100 nM) kombinasyon uygulaması grubunda, hücre farklılaşmasına bağlı olarak, hücre indeks değerlerinin artmış olduğu analiz edilmiştir.

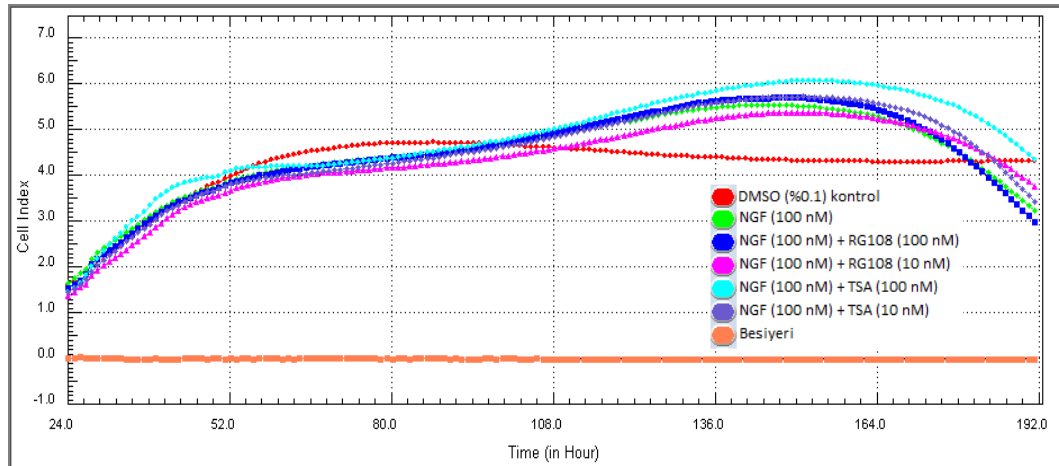


Şekil 28. PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM) Ve RG108 (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği

Tablo 5. DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM) Ve RG108 (10 ya da 100 nM) Konsantrasyonlarının PC-12 Adh Hücrelerinde 7 Günün Sonunda RTCA DP'deki Hücre İndeks (CI) Değerleri

GRUPLAR	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	7. gün
DMSO (%0.1) kontrol	1.57	3.68	4.53	4.59	4.41	4.25	4.23
NGF (100nM)	1.61	3.64	4.22	4.52	5.06	5.43	3.06
RG108 (100nM)	1.57	3.79	4.74	4.74	4.49	4.36	4.54
RG108 (10nM)	1.47	3.67	4.59	4.65	4.45	4.37	4.56
NGF (100nM) + RG108 (100nM)	1.49	3.58	4.19	4.55	5.17	5.58	2.81
NGF (100nM) + RG108 (10nM)	1.33	3.43	4.01	4.28	4.78	5.25	3.58

Şekil 29'de TSA ve RG108'e ait ilaç konsantrasyonlarının NGF ile kombin uygulaması sonunda elde edilen hücre indeks değerlerine ait karşılaştırmalı grafik verilmiştir. 7 günlük inkübasyon sonunda, en fazla nörit uzunluk ve dallanmasının sırasıyla NGF+TSA (100 nM) kombin uygulamasında olduğu, NGF+RG108 (100 ve 10 nM) ile NGF+TSA (10 nM) kombin uygulamalarında, hücre farklılaşmasına bağlı olarak, hücre indeks değerlerinin ise birbirine çok yakın olduğu görülmektedir (Tablo 4 ve 5).



Şekil 29. PC-12 Adh Hücrelerinde DMSO (%0.1) Kontrol, NGF (100 nM), NGF (100 nM)+ RG108 (10 ve 100 nM) Ve NGF (100 nM)+ TSA (10 ve 100 nM) Konsantrasyonlarının RTCA DP Analiz Sistemi İle Çizilen 7 Günlük Hücre İndeks Değerlerinin Grafiği

Yapılan literatür taramasında PC-12 Adh hücrelerinin gerçek zamanlı analiz sisteminde Trikostatin A ve RG108 uygulaması sonunda hücre farklılaşmasını değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bizim çalışmamıza benzer

olarak, SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, nöronal farklılaşmayı ölçmek için RTCA-DP sistemi kullanılmıştır. 1×10^4 ya da 2×10^4 sıklıkta ekilen hücelere farklılaşma besiyeri olarak 50 nM IGF-1 içeren serumsuz DMEM eklenmiştir. Farklılaşmaya bağlı olarak hücre indeks değerlerinin arttığı rapor edilmiştir (Dwane ve ark., 2013).

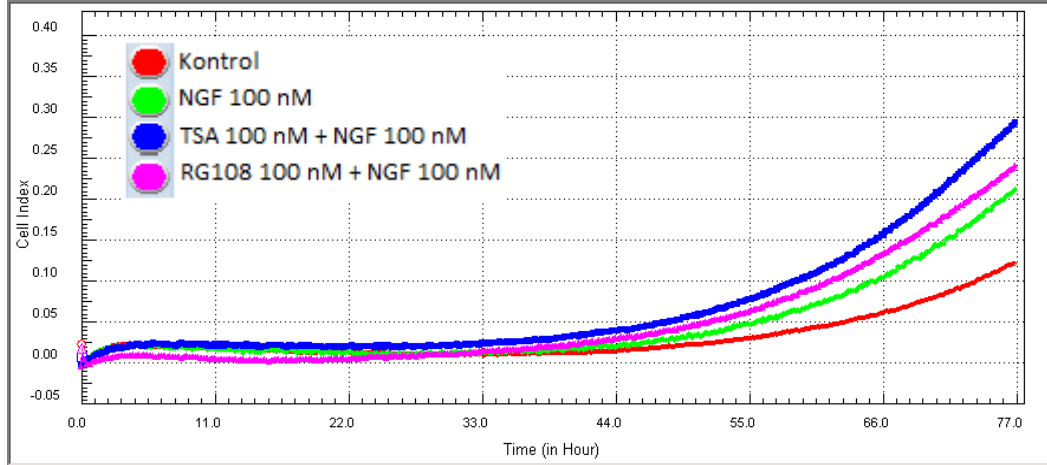
7 günlük hücre indeksi değerlerinin grafiklerine bakıldığında, DMSO (%0.1) kontrol ve NGF içermeyen, RG108 (10 ve 100 nM) ve TSA (10 ve 100 nM) kuyucuklarının hücre indeksi değerleri 4. güne kadar artmakta, 4. günden sonra ise aynı oranda seyretmektedir. NGF (100 nM) ve NGF (100 nM) + TSA ve RG108 kombinasyon gruplarının hücre indeksi değerleri ise 4. günden sonra hızla artmaktadır. RTCA-DP cihazı, altın elektrotlar içeren özel plakaların(e-plate), hücrelerin plaka tabanına tutunmasıyla oluşan elektriksel sinyali istenilen ölçüm aralıklarında ekrana yansıtması yöntemiyle gerçek zamanlı veriler oluşması prensibiyle çalışır. PC-12 Adh hücreleri, farklılaşmaya başladıkları zaman proliferasyonları durur ve nörit uzantıları oluşturmaya başlarlar. PC-12 Adh hücrelerinin farklılaşarak oluşturduğu nöritler de elektriksel sinyal alımına yol açar. 4. günde hızla artan hücre indeksi değerleri, nörit gelişimi ile paraleldir.

Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Hücre İnvazyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Değerlendirilmesi

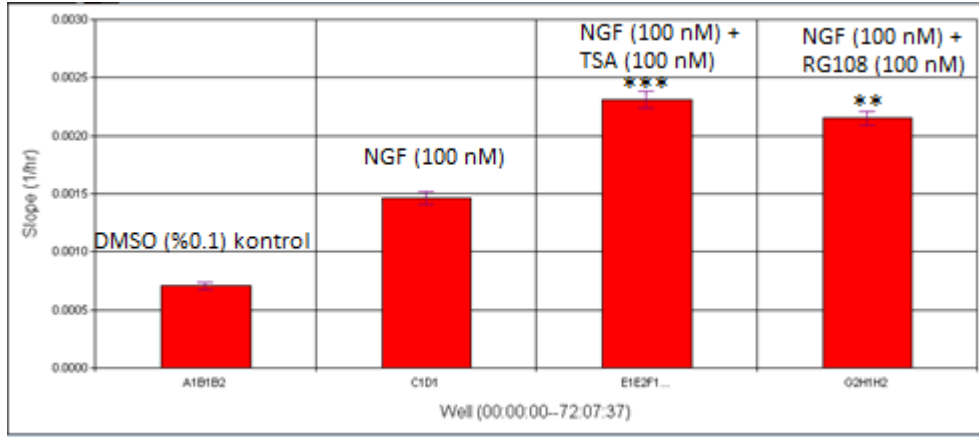
Yukarıda bulguları verilmiş olan hücre farklılaşmasını değerlendirdiğimiz gerçek zamanlı analiz sistemi sonuçlarına göre, PC-12 Adh hücrelerinin invazif etkisini araştırmak için farklılaşmanın ve nörit gelişiminin en fazla olduğu gruplar üzerinde çalışılmıştır.

Bu çalışmada, nörit gelişimi açısından en etkili kombinasyonlar seçilmiş ve PC12-Adh hücreleri üzerindeki invazif etkileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca DMSO kontrol ve pozitif kontrol olarak da NGF 100 nM kullanılmıştır. İnvazyon çalışmasında CIM plakanın üst odacıkları %5 oranında matrijel ile kaplanmış ve her kuyucuğa farklılaşma besiyeri içinde 2×10^4 PC-12 Adh hücreleri ekilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine deney gruplarına ait konsantrasyon uygulamaları yapılmış ve CIM plakalar RTCA DP cihazında 72 saat inkübasyona bırakılmış ve süre boyunca hücrelerin matrijeli eritip invaziv özellik kazanıp kazanmadığı analiz edilmiştir.

Şekil 30'da görüldüğü gibi 72 saat inkübasyon sonunda kontrol ve NGF grubuna göre sırasıyla NGF(100 nM) + TSA(100 nM) ve NGF(100 nM) + RG108(100 nM) ilaç kombinasyonlarında PC-12 Adh hücrelerinin invazyonunun artmış olduğu görülmüştür. Özellikle NGF+TSA(100 nM) kombinasyon uygulanan grupta hücrelerin en fazla invazif özellik kazandığı, RTCA DP Software 1.2.1 programında hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ile analiz edilmiştir (**Şekil 31**).



Şekil 30. RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının İnvazyon Grafiği



Şekil 31. RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının İnvazyon Slope Grafiği ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***)

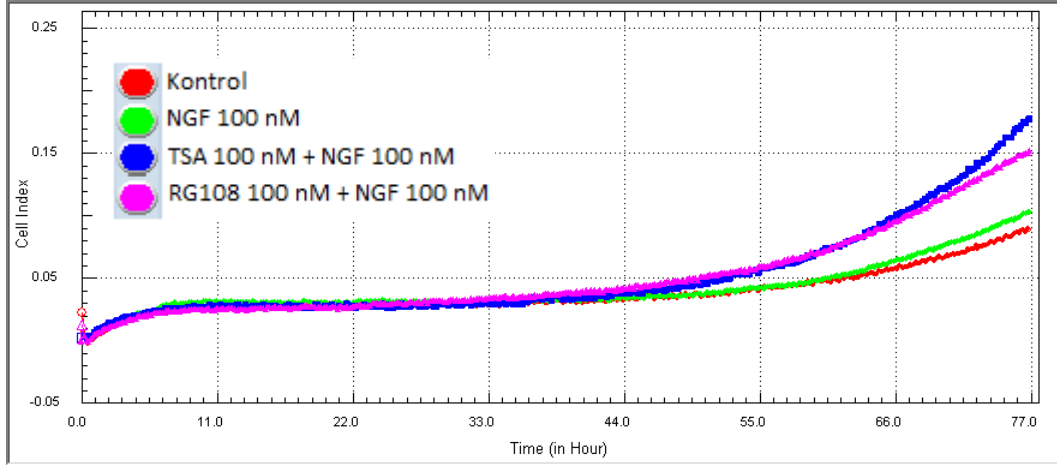
Trikostatin A ve RG108'in PC-12 Adh Hücrelerinde Hücre Migrasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Değerlendirilmesi

Yukarıda bulguları verilmiş olan hücre farklılaşmasını değerlendirdiğimiz gerçek zamanlı analiz sistemi sonuçlarına göre, PC-12 Adh hücrelerinin migrasyon etkisini araştırmak için farklılaşmanın ve nörit gelişiminin en fazla olduğu gruplar üzerinde çalışılmıştır.

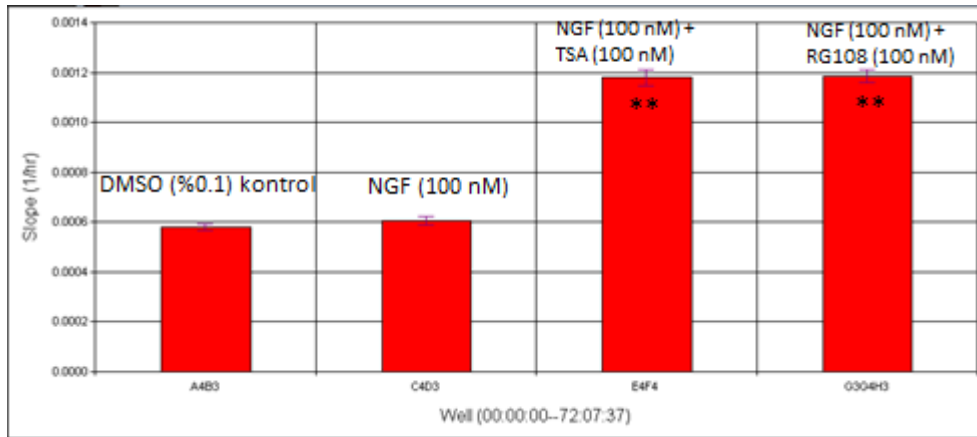
Bu çalışmada, nörit gelişimi açısından en etkili kombinasyonların PC-12 Adh hücrelerinin migrasyonuna etkileri araştırılmıştır. Ayrıca DMSO kontrol ve pozitif kontrol olarak da NGF 100 nM kullanılmıştır. Migrasyon çalışmasında CIM plakının üst odacığındaki her kuyuya farklılaşma besiyeri içinde 2×10^4 PC-12 Adh hücresi ekilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine deney gruplarına ait konsantrasyon uygulamaları yapılmış ve CIM plaklar RTCA DP cihazında 72 saat inkübasyona bırakılmış ve süre boyunca hücrelerin migrasyon özellikleri analiz edilmiştir.

Şekil 32'de görüldüğü gibi 72 saat inkübasyon sonunda kontrol ve NGF grubuna göre sırasıyla NGF(100 nM) + TSA(100 nM) ve NGF(100 nM) + RG108(100 nM) ilaç kombinasyonlarında PC-12 Adh hücrelerinin migrasyonunun artmış olduğu

RTCA DP Software 1.2.1 programında hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ile analiz edilmiştir (Şekil 33).



Şekil 32. RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının Migrasyon Grafiği



Şekil 33. RTCA DP Sisteminde PC-12 Adh Hücreleri Üzerinde RG108 ve TSA Konsantrasyonlarının Migrasyon Slope Grafiği ($p<0.01^{**}$)

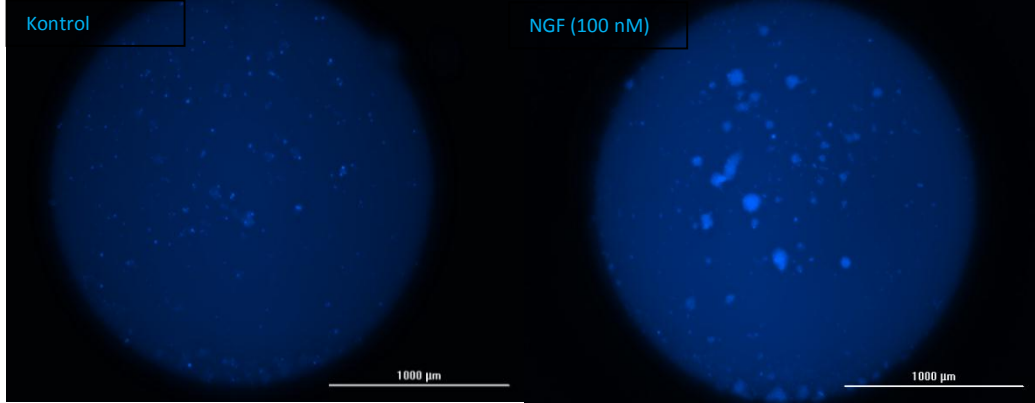
İnvazyon ve migrasyon çalışmalarının sonuçlarına göre ilaç kombinasyonlarının PC12-Adh hücreleri üzerinde 72 saat inkübasyonu sonunda, kontrol ve NGF gruplarına göre, sırasıyla NGF(100 nM) + TSA(100 nM) ve NGF(100 nM) + RG108(100 nM) gruplarında en fazla invazyon ve migrasyon olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre, invazyon düzeyi kontrole göre NGF + TSA (100 nM) konsantrasyonda $p<0.001^{***}$, NGF + RG108 (100 nM) konsantrasyonda da $p<0.01^{**}$ anlamlılıkta artış göstermiştir. Migrasyonda ise kontrole göre NGF + TSA (100 nM) ve NGF + RG108 (100 nM) konsantrasyonda kontrole göre $p<0.01^{**}$ anlamlılıkta artış bulunmuştur.

Migrasyonun morfolojik analizi

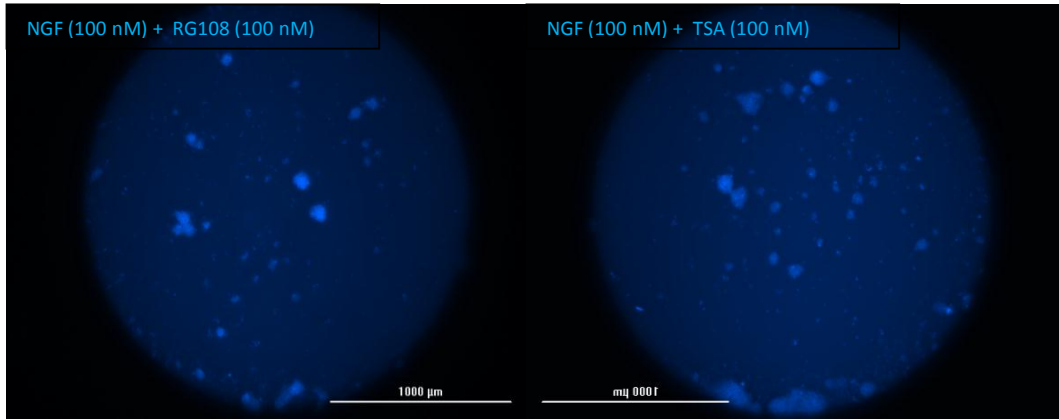
PC-12 Adh hücreleri, farklılaşma besiyeri içinde RTCA DP migrasyon yönteminde kullanılan konsantrasyonlar ile The Oris™ Cell Migration ölçüm kiti kullanılarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda, migrasyon yapmış hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33258 floresan boya ile

boyanmış, ve Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader kullanılarak fotoğraflanmıştır.

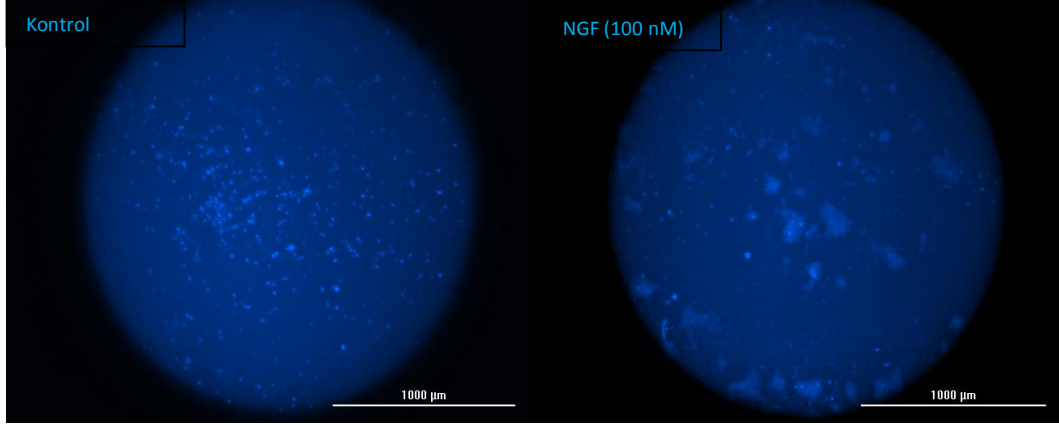
Şekil 34-39'de görüldüğü gibi ve gerçek zamanlı analiz sistemi migrasyon sonuçlarımıza da paralel olarak PC-12 Adh hücrelerinin kontrol ve NGF gruplarına göre sırasıyla NGF+TSA(100 nM) ve NGF+RG108(100nM) ilaç kombinasyonlarında migrasyonun artmış olduğu görülmüştür.



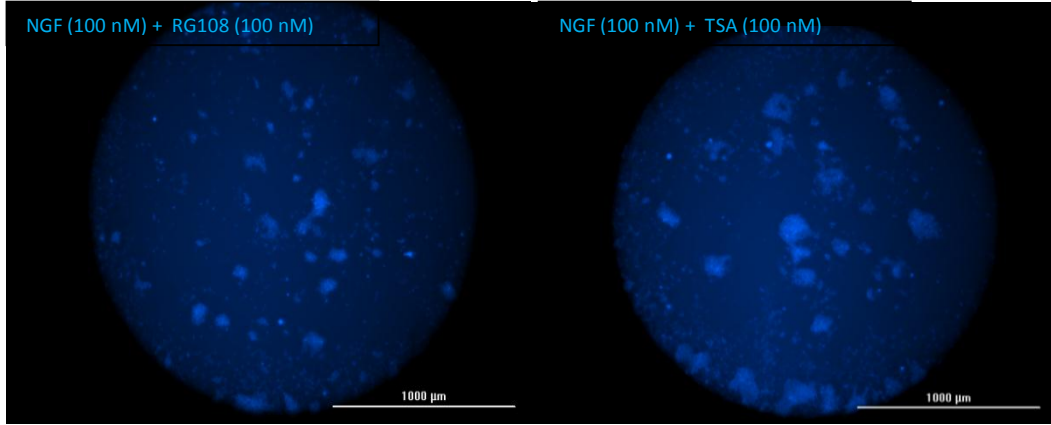
Şekil 34. Kontrol ve NGF (100 nM) Grubuna ait 24. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst 33258 ile Floresan Boyanmış Görüntüsü (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20)



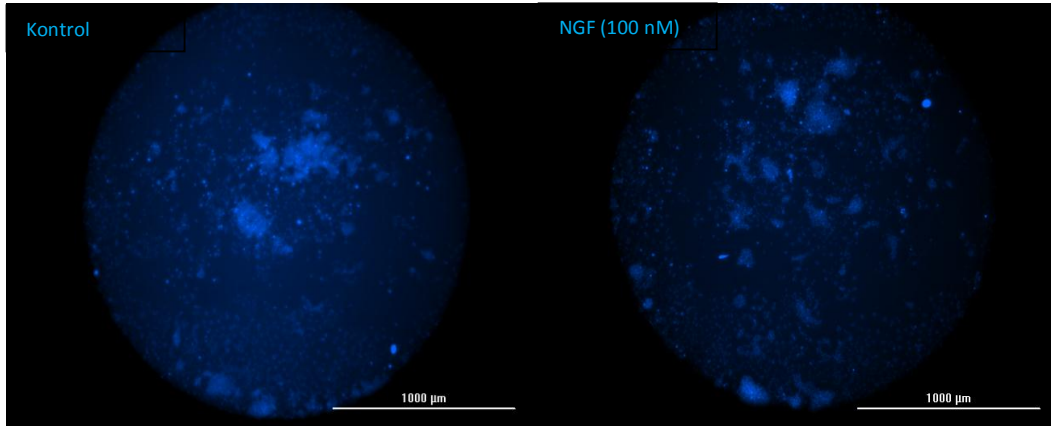
Şekil 35. NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) ve NGF (100 nM) +TSA (100 nM) 24. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst 33258 ile Floresan Boyanmış Görüntüsü (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20)



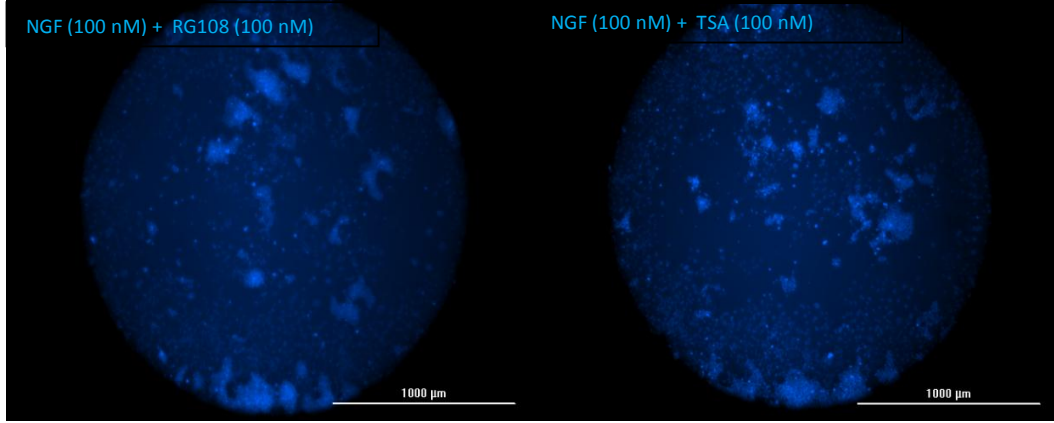
Şekil 36. Kontrol ve NGF (100 nM) Grubuna ait 48. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst 33258 ile Floresan Boyanmış Görüntüsü (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader Objektif x20)



Şekil 37. NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) ve NGF (100 nM) +TSA (100 nM) 48. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst 33258 ile Floresan Boyanmış Görüntüsü (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader Objektif x20)



Şekil 38. Kontrol ve NGF (100 nM) Grubuna ait 72. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst 33258 ile Floresan Boyanmış Görüntüsü (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader Objektif x20)



Şekil 39. NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) ve NGF (100 nM) +TSA (100 nM) 72. Saatteki Migrasyon Yapan PC-12 Adh Hücrelerinin Hoechst 33258 ile Floresan Boyanmış Görüntüsü (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader Objektif x20)

Embriyo gelişimi sırasında milyonlarca sinir hücresi ventriküler ve subventriküler bölgeden, santral sinir sistemindeki yerlerine hareket ederler. Embriyonun gelişimi sırasında nöronlar, doğru yerlere göç ederek uygun sinapsları yapmadıklarında gelişim geriliklerine rastlanmaktadır. Pek çok nörodejeneratif hastalığın sebebi de nöronal migrasyon bozukluklarından kaynaklanmaktadır (Reiner ve ark., 2009).

Yapılan literatür taramasında, TSA ve RG108 ile RTCA DP sisteminde PC-12 Adh hücrelerinin invazyon ve migrasyonu üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. TSA ile vasküler düz kas hücreleri ile yapılan bir migrasyon deneyinde pipet ucuyla plaka tabanı çizilmiş ve 48 saat sonra 0.5 µmol/L TSA konsantrasyonu içeren hücrelerin migrasyonunun kontrol grubuna göre daha hızlı olduğu bulunmuştur. TSA'nın, reaktif oksijen radikallerinden *thioredoxin 1* seviyesini azaltarak migrasyonu hızlandırdığı bildirilmiştir (Songi ve ark., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada da pek çok esansiyel protein kompleksinin yapısında yer alan bir protein olan, insan hematopoietik kök hücresi 117 proteininin (HSPC117) hücre migrasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. İnsan plasenta koryokarsinom 3 hücrelerinin (JEG-3) bulunduğu plakanın tabanı bir pipet ucu yardımıyla çizilmiş ve 50, 75 nM konsantrasyonda bir histon deasetilaz inhibitörü olan TSA ve RG108 ile aynı gruptan bir DNMT inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisitidin ile 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3 günün sonunda bu iki ilaç grubunda hücre migrasyonunun artırdığı bildirilmiştir (Ma ve ark., 2014).

Nörit gelişiminden farklı olarak TSA'nın, küçük hücreli akciğer kanserinde (Seol ve ark. 2014), endometriyal karsinoma hücrelerinde (Yang ve ark., 2013), endotelial hücrelerde (Takada ve ark., 2006), hepatik satellit hücrelerde (Rombouts ve ark., 2002), kolon karsinoma (Kim ve ark., 2003) hücrelerinde migrasyonu inhibe ettiği, endometriyal adenokarsinoma hücrelerinde ise migrasyonu indüklediğini bildiren (Uchida ve ark., 2007) çalışmalar vardır. Ayrıca RG108 ve TSA'nın kombine halde HL-60 (küçük hücreli akciğer kanseri) hücre hattında migrasyonu inhibe ettiğine dair de bir çalışma bulunmaktadır (Jurate ve ark., 2012).

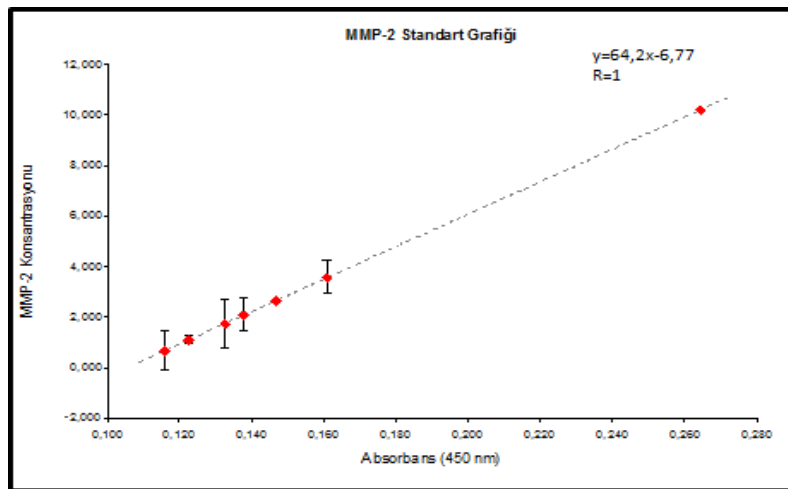
MMP-2 (Matriks Metalloproteinaz-2) Miktarının Belirlenmesi

Bu çalışmada TSA ve RG108'in özellikle hücre migrasyonu ve nörit uzaması ile ilişkisini araştırmak için NGF + TSA ve RG108'in farklı konsantrasyonları ile farklılaşma medyumunda 7 gün inkübe edilen PC-12 Adh hücre süpernatantlarındaki MMP-2 miktarları USCN Life Science Rat MMP 2 ELISA kiti (Katalog no: SEA100Ra) kullanılarak belirlenmiştir.

MMP-2 miktarını belirlemek için önce belirli MMP-2 standartlarının 450 nm'deki absorptans değerlerine göre bir standart eğri çizilmiştir (**Şekil 39**). Bu eğrinin hazırlanmasında kit içeriğinde yer alan ve MMP-2 miktarları bilinen standartların kit prosedürüne göre ölçülen absorptans değerleri kullanılmıştır. Daha sonra MMP-2 standart grafiğinden elde edilen formüle göre ($y=ax+b$), NGF ve TSA ile RG108, kombinasyonların absorptans değerlerine göre örneklerin MMP-2 miktarları hesaplanmıştır.

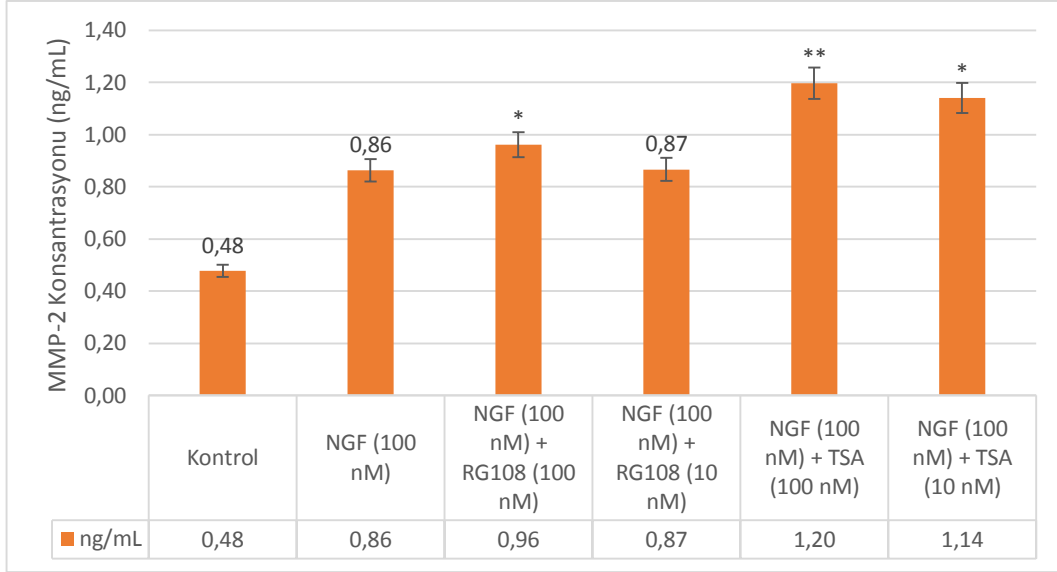
Tablo 6. MMP-2 Standartlarının 450 nm'deki Absorptans Değerleri

MMP-2 Standartları	450 nm'deki Absorptans Değerleri	
10 ng/mL	0,265	0,282
5 ng/mL	0,152	0,17
2,5 ng/mL	0,151	0,114
1,25 ng/mL	0,127	0,148
0,625 ng/mL	0,147	0,109
0,312 ng/mL	0,124	0,107
0,156 ng/mL	0,079	0,101



Şekil 40. MMP 2 Standart Grafiği (n=2; ort±st.sapma)

PC-12 Adh hücrelerine uygulanan konsantrasyonlarının 7 günlük inkübasyonu sonunda, gruplara ait süpernatantların ELİZA'da 450 nm'de ölçülen MMP-2 absorptans değerlerine karşılık gelen MMP-2 miktarlarını (ng/mL) gösteren grafik **Şekil 40**'da görülmektedir.



Şekil 41. RG108 ve TSA konsantrasyonlarının 7. Gün sonunda PC-12 Adh Hücre Hattı Üzerinde MMP-2 Miktarına Etkisi (n=5; ort±st.sapma) ($p<0.05^*$, $p<0.01^{}$)**

Santral sinir sistemi gelişimi sırasında, hücre migrasyonu, nörit gelişimi ve sinaptik plastisite gibi olaylarda MMP-2 önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Galko ve Tessier-Lavigne, 2000; Webber ve ark., 2002). MMP-2, büyüme konisinde yer alır ve nörit gelişimi sırasında, santral sinir sisteminin ekstraselüler matris proteinlerinden olan kondrotitin sülfat proteoglikanlarını (CSPGs) proteolitik olarak parçalayarak nörit gelişiminde görev alır (Hayashita ve ark., 2001).

MMP'lerin, NGF gibi nörotrofik faktörlerin inaktif formları üzerindeki proteolitik süreçlerde ve aktif formlarına dönüşmelerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2001). Bu nedenle, MMP'ler hücrenin fizyolojik ve patolojik durumlarda migrasyonu gibi temel fonksiyonların sürdürülebilmesi için esansiyeldir. Sinir sisteminde, fizyolojik ve patolojik doku modellemesi sırasında hücre hareketliliğini MMP'lerin sağladığına dair kanıtlar mevcuttur (Ould-Yahoui ve ark., 2013).

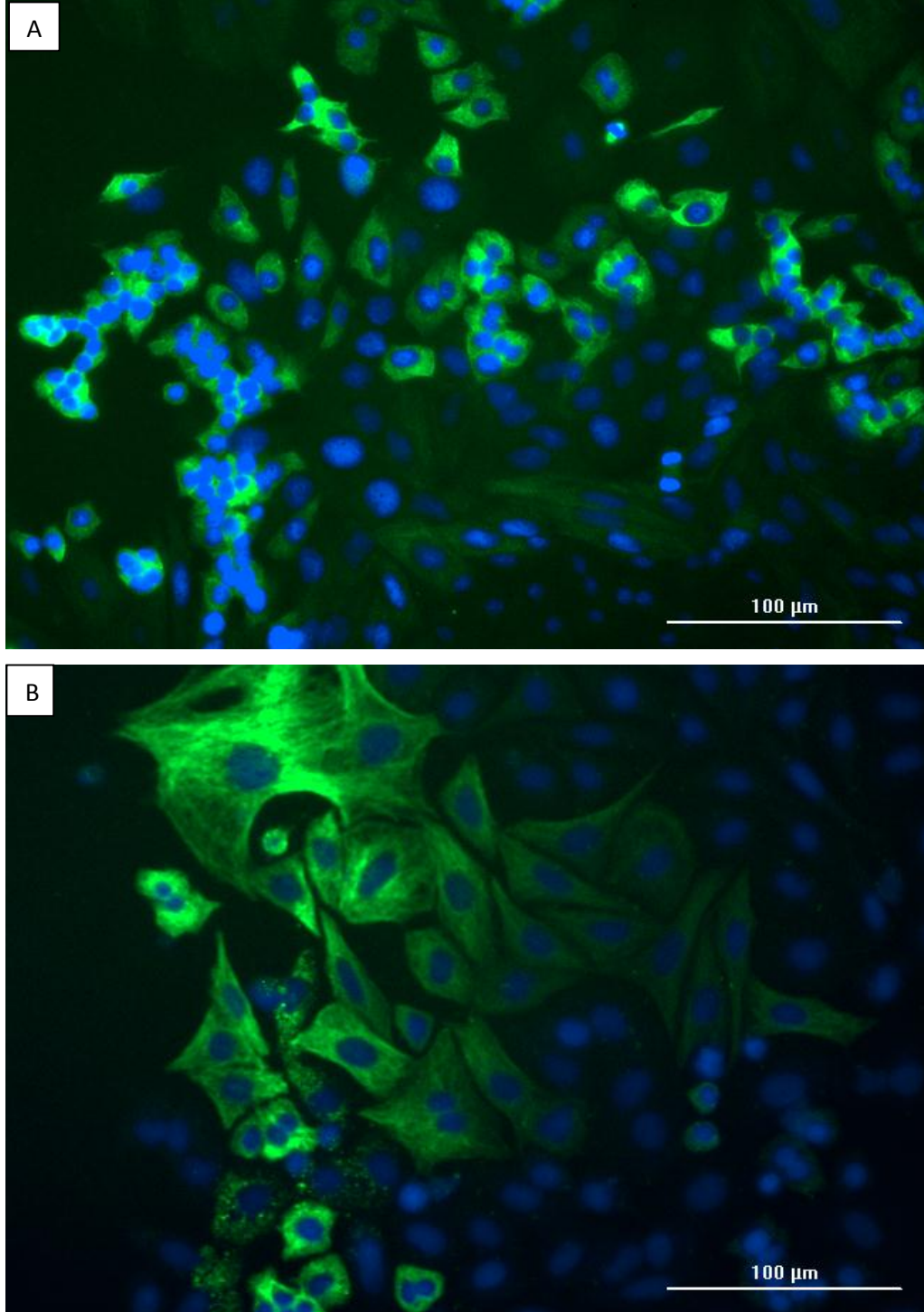
Bu çalışmada PC12-Adh hücrelerinde kontrol (%0.1 DMSO), 100 nM NGF, NGF + RG108(100nM), NGF + RG108(10 nM), NGF + TSA(100 nM), NGF + TSA(10 nM) gruplarına ait 7. gün sonundaki MMP-2 miktarları sırasıyla 0.48, 0.86, 0.96, 0.87, 1.20 ng/mL, 1.14 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar migrasyon ve nörit analiz sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir (Şekil 41).

Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre, MMP-2 düzeyi kontrole göre NGF + TSA (100 nM) konsantrasyonda $p<0.01^{**}$, NGF + TSA (10 nM) ve NGF + RG108 (100 nM) konsantrasyonlarda da $p<0.05^*$ anlamlılıkta artış göstermiştir.

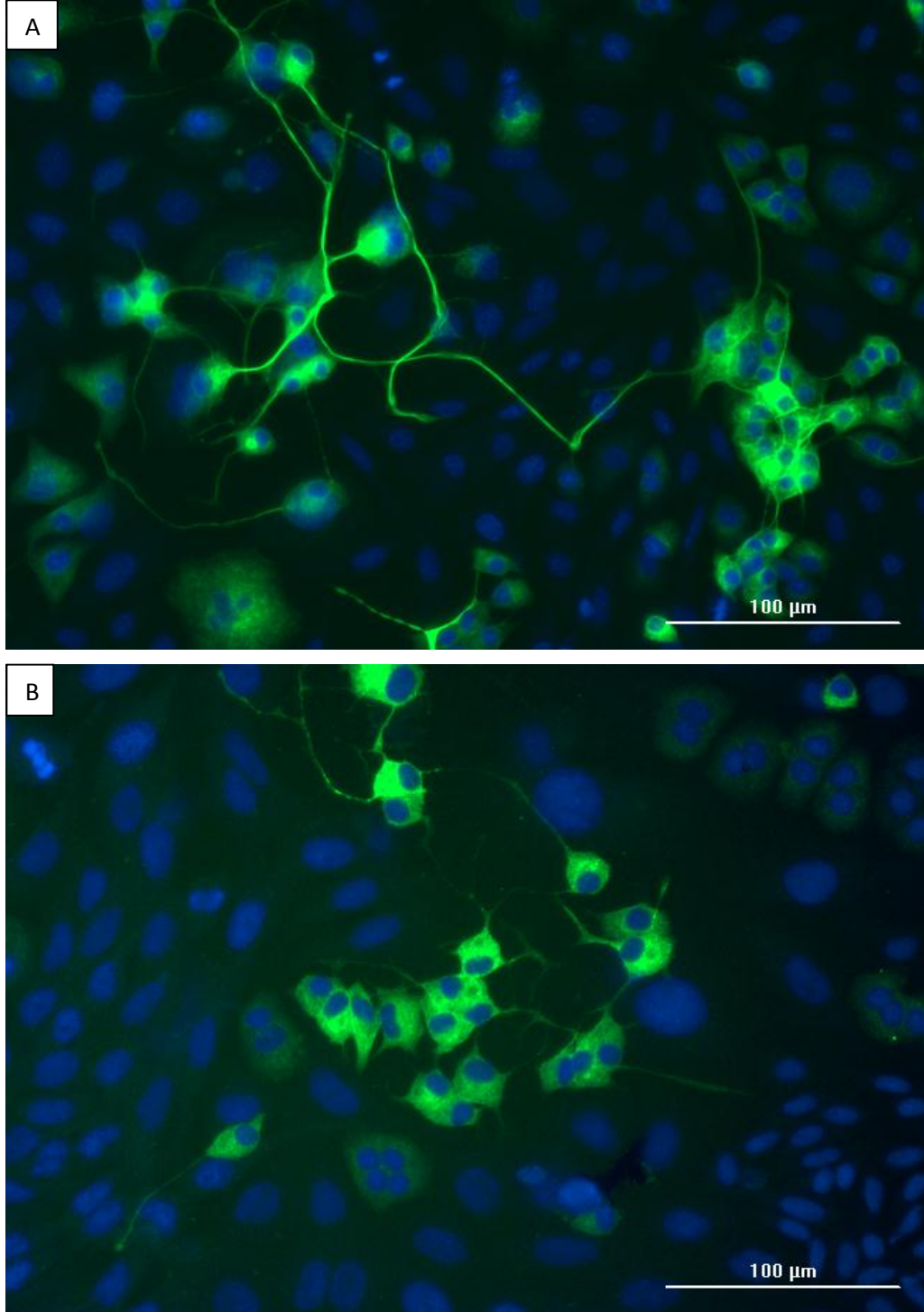
AlexaFluor®488 Ve Hoechst 33258 İle İmmüno Floresan Boyama

Şekil 42-47'da, 7. günün sonunda nörit farklılaşma ve uzamasının olduğu NGF + TSA ve NGF + RG108 kombine gruplarının kontrol ve pozitif kontrol NGF grubuna göre floresan görüntülerinin karşılaştırılması görülmektedir. Bu çalışmada, nöronal iskeletin yapısında bulunan beta-III tubuline özgü bir antikör olan anti-beta III tubulin (Abcam, ab78078) ile PC-12 Adh hücrelerindeki tubulinler işaretlenmiş

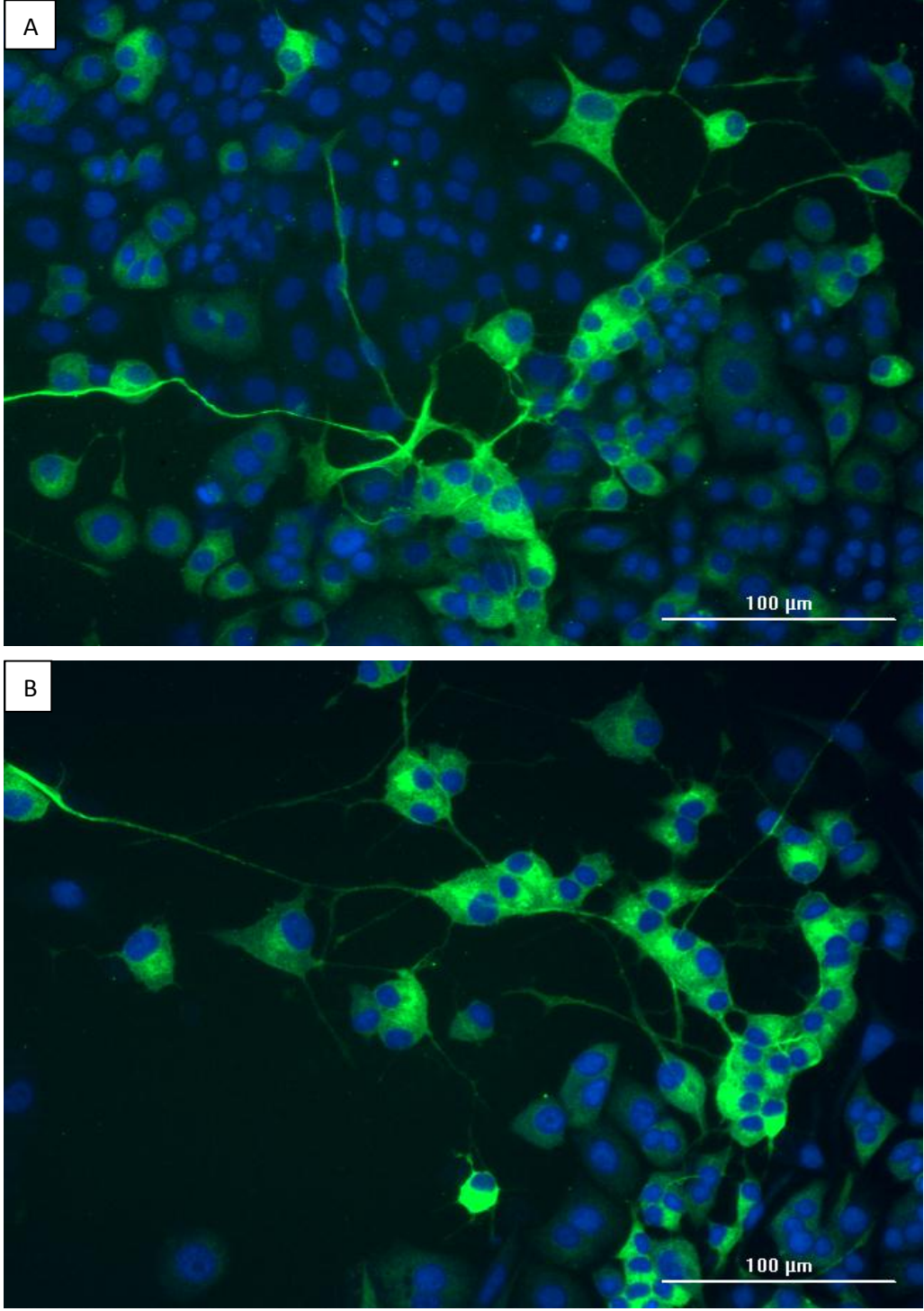
ve arkasından keçi anti-fare IgG H&L AlexaFluor®488 (Abcam, ab150113) ile beta-III tubulinler immünofloresan olarak boyanmıştır. Mikrotübül boyamasının ardından Hoechst 33342 ile nükleus boyaması yapılmıştır.



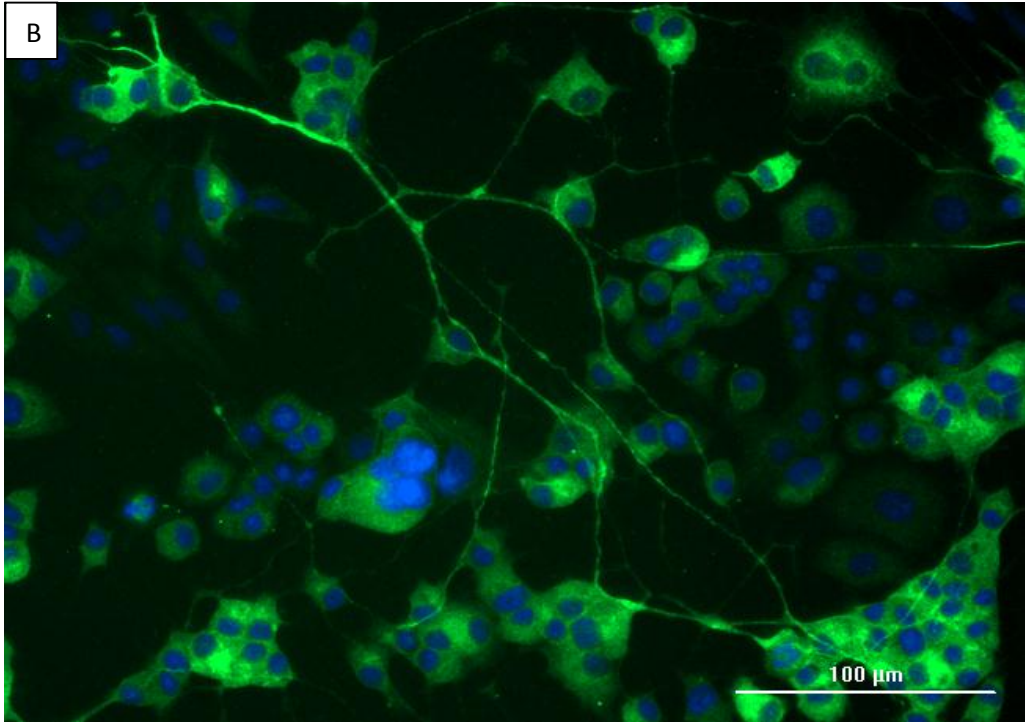
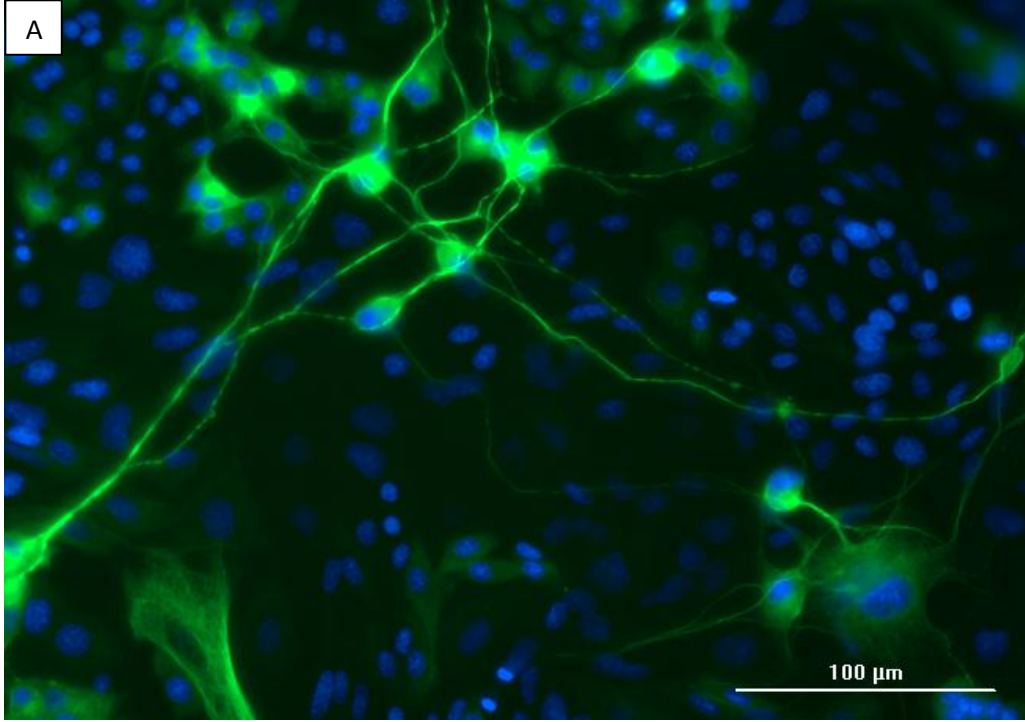
Şekil 42. Kontrol (%0.1 DMSO) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmünofloresan Görüntüsü (A ve B) (yeşil: AlexaFluor®488, mavi: Hoechst 33342, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20).



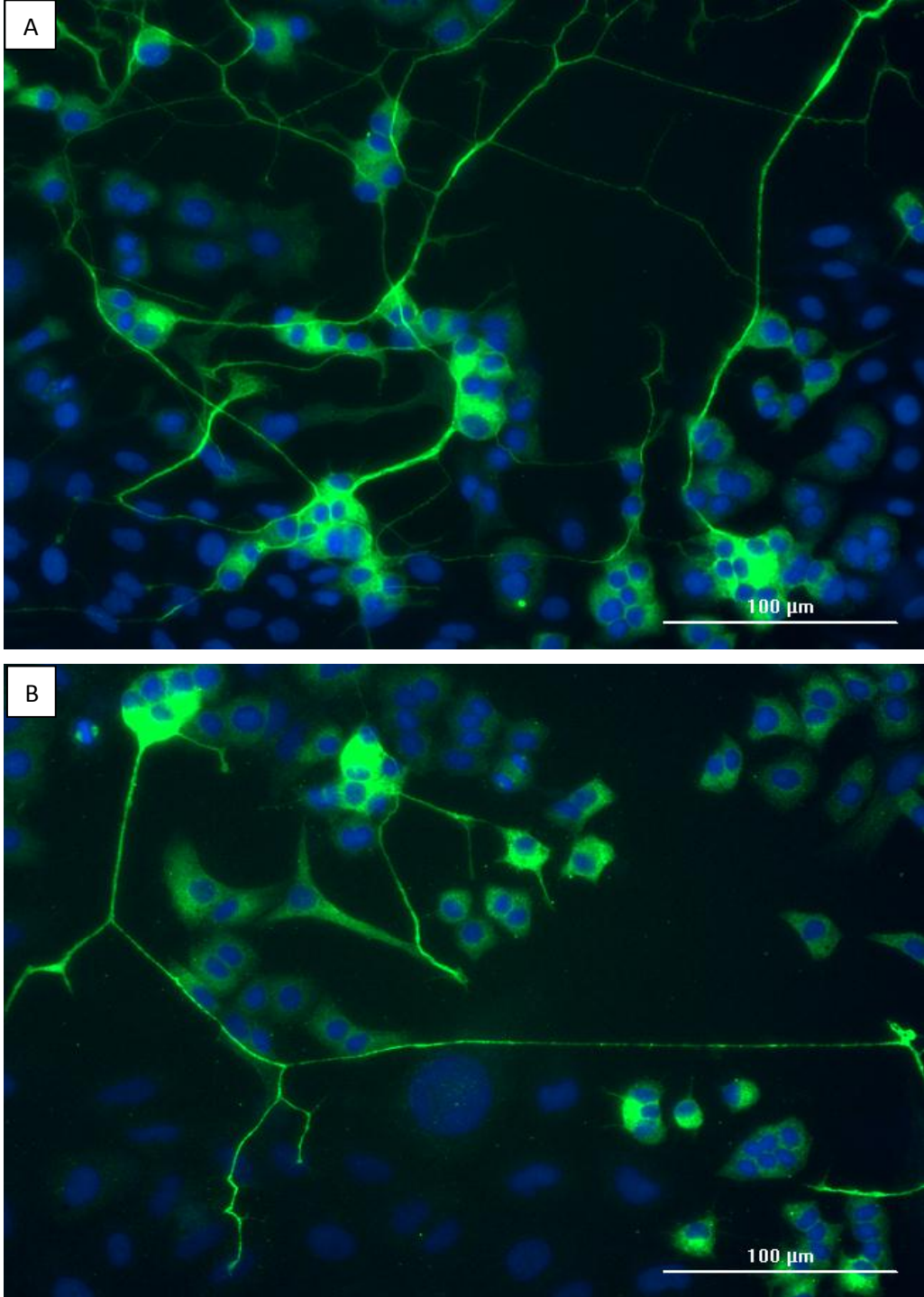
Şekil 43. NGF (100 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü (A ve B) (yeşil: AlexaFluor@488, mavi: Hoechst 33342, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20)



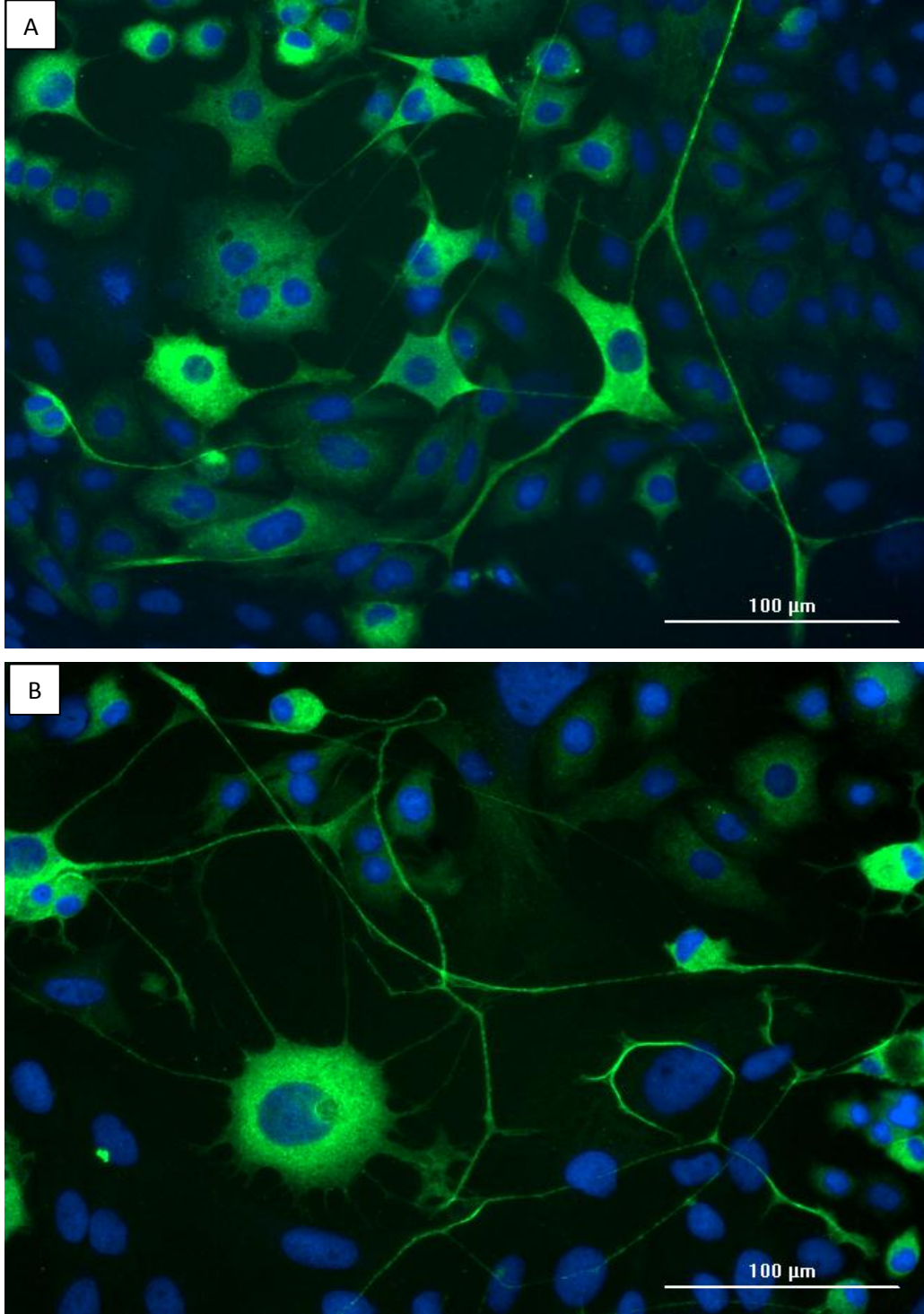
Şekil 44. NGF (100 nM) + RG108 (10 nM) Grubu Ait PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü (A ve B) (yeşil: AlexaFluor®488, mavi: Hoechst 33342, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20)



Şekil 45. NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü (A ve B) (yeşil: AlexaFluor®488, mavi: Hoechst 33342, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20)



Şekil 46. NGF (100 nM) + TSA (10 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü (A ve B) (yeşil: AlexaFluor®488, mavi: Hoechst 33342, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader Objective x20)



Şekil 47. NGF (100 nM) + TSA (100 nM) Grubu PC-12 Adh Hücrelerinin 7. Günün Sonundaki İmmüno Floresan Görüntüsü (A ve B) (yeşil: AlexaFluor®488, mavi: Hoechst 33342, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Objektif x20)

Yapılan literatür taramasında, nöritlerin sekonder antikor kullanılarak immüno floresan boyalarla boyanması yöntemini içeren pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Uzun yıllardır kullanılan bir yöntemdir. 1988 yılında yapılan bir çalışmada, NGF ile indüklenen nörit gelişimi sırasında mikrotübül ile ilişkili proteinlerin (MAPs) ekspresyonu araştırılmıştır. Anti beta III tubulin kullanılarak

yapılan immünofloresan boyamada, olgun nöron hücrelerin karakteristik bir proteini olan MAP1'in ekspresyonu, PC-12 hücrelerindeki nörit gelişimi sırasında artmamış, tam aksine gelişmekte olan nöronlarda ifade edilen MAP3 ve MAP5 ekspresyonu artmıştır (Brugg ve Matus, 1988).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, NGF ve proNGF'nin PC-12 hücreleri üzerindeki nörit gelişimini etkileme mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışmada, aktin ve beta tubulin antikoları immünofloresan boyalar ile boyanarak hücre iskeletindeki dağılımlarına bakılmıştır (D'Onofrio ve ark., 2011).

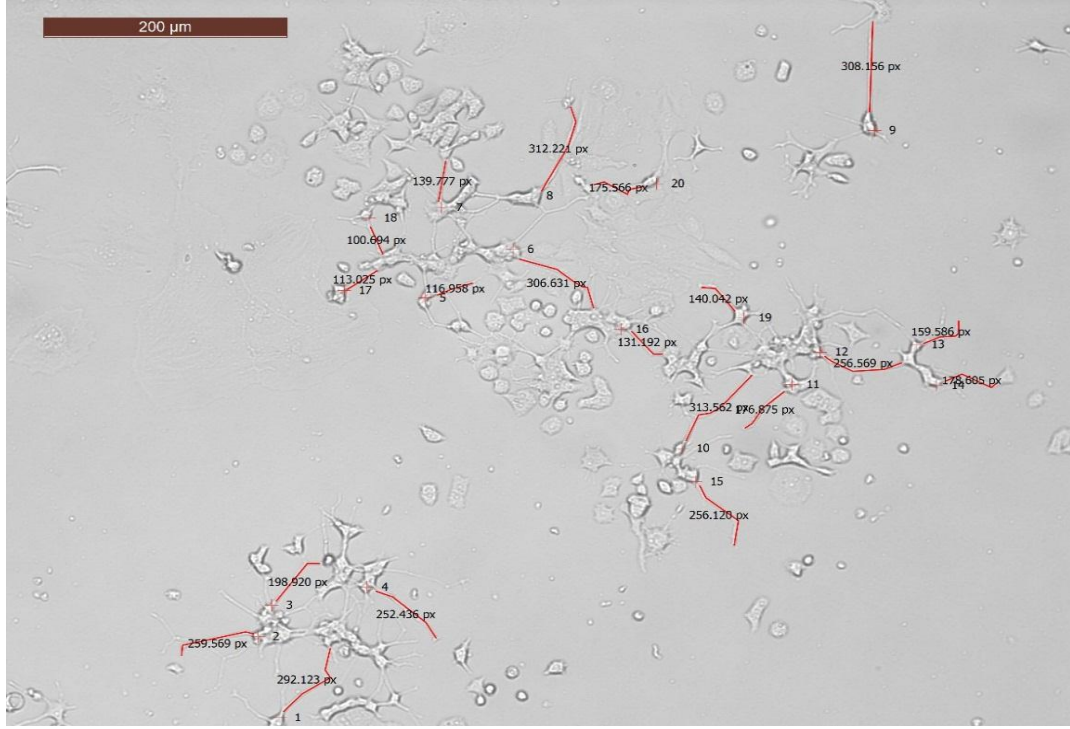
NGF ile farklılaşması indüklenen PC-12 hücrelerindeki, tau ve aktin proteinlerinin yerleşimlerinin araştırıldığı bir çalışmada, tubulin antikoları kullanılmış ve tau ve aktin arasındaki NGF tarafından indüklenmiş etkileşime mikrotübüllerin bir katkısının olmadığı gösterilmiştir (Yu ve Rasenick, 2006).

PC-12 hücrelerinin alt klonu olan NS-1 hücreleri ile yapılan bir nörotoksite çalışmasında, daha önce nörit gelişimini inhibe ettiği bildirilmiş 16 adet kimyasal kullanılmıştır. NS-1 hücreleri 100 ng/mL NGF ile 72 saat inkübe edildikten sonra anti-beta III tubulin primer antikoru ile tubulinler işaretlenmiş, sonrasında AlexaFluor488 ile floresan boyama yapılmış, kuyucuklar fotoğraflanmış ve nörit analizi yapılmıştır. Aynı işlem 1 μ M – 1mM konsantrasyon aralığında kimyasalların uygulandığı kuyucuklar için de yapılmıştır. Daha sonra hücre canlılığı ve nörit uzunluğu ölçülerek inhibisyon analizi yapılmıştır (Radio ve ark., 2008).

Nörit Uzunluğu Analizi

Şekil 48-52'de herbir grupta nörit analizi için kullanılan 5 farklı fotoğraftan, birer örnek görülmektedir. Fotoğraflar Leica DM 300 Inverted mikroskop ile çekilmiş ve nörit uzunluğu mikroskobun analiz programı ile piksel cinsinden ölçülmüştür. Daha sonra gruba ait tüm nörit uzunlukları toplanmış, 100'e bölünmüş ve herbir grup için bir nöritin ortalama uzunluğu elde edilmiştir. Daha sonra piksel cinsinden elde edilen bu değer mikrometreye çevrilerek de grafiklendirilmiştir (**Şekil 53**).

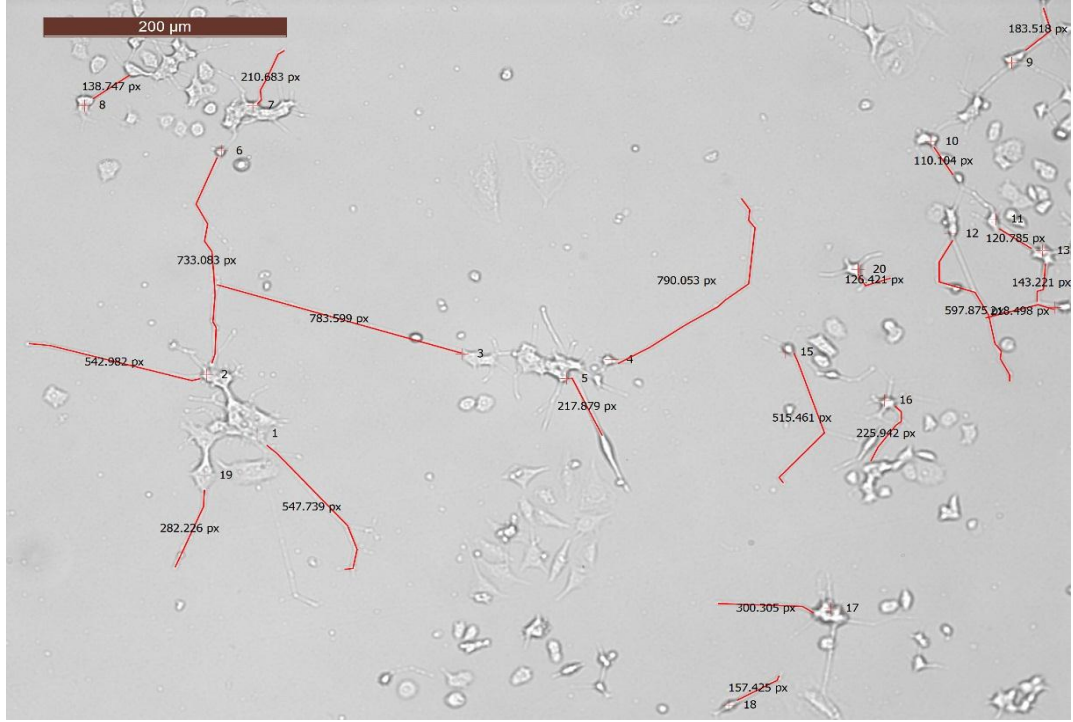
Çalışmamızda **Şekil 53'**de görüldüğü gibi, gruplar arasında nörit uzunluğu en fazla NGF (100 nM) + TSA (100 nM) konsntrasyonda belirlenmiş olup, ortalama nörit uzunluğu 1430.71 μ m olarak hesaplanmıştır. NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) uygulanan grupta ortalama nörit uzunluğu 1185.61; NGF (100 nM)+TSA (10 nM)'da 1169.67 ve NGF (100 nM) + RG108 (10 nM) grubunda da 1139.28 olarak analiz edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu nörit gelişimi ve uzamasında etkili olduğu bilinen 100 nM NGF (pozitif kontrol) grubuna göre ortalama nörit uzunluğu NGF + TSA (100 nM)'da $p<0.001^{***}$, NGF + TSA (10 nM) ve NGF + RG108 (100 nM)'da $p<0.01^{**}$, NGF + RG108 (10 nM) grubunda da $p<0.05^{*}$ olarak anlamlı bulunmuştur. Nörit uzunluğu sonuçlarımız morfolojik görüntü ve migrasyon analiz sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda nörit uzaması üzerine Trikostatın A'nın, RG108'den daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir.



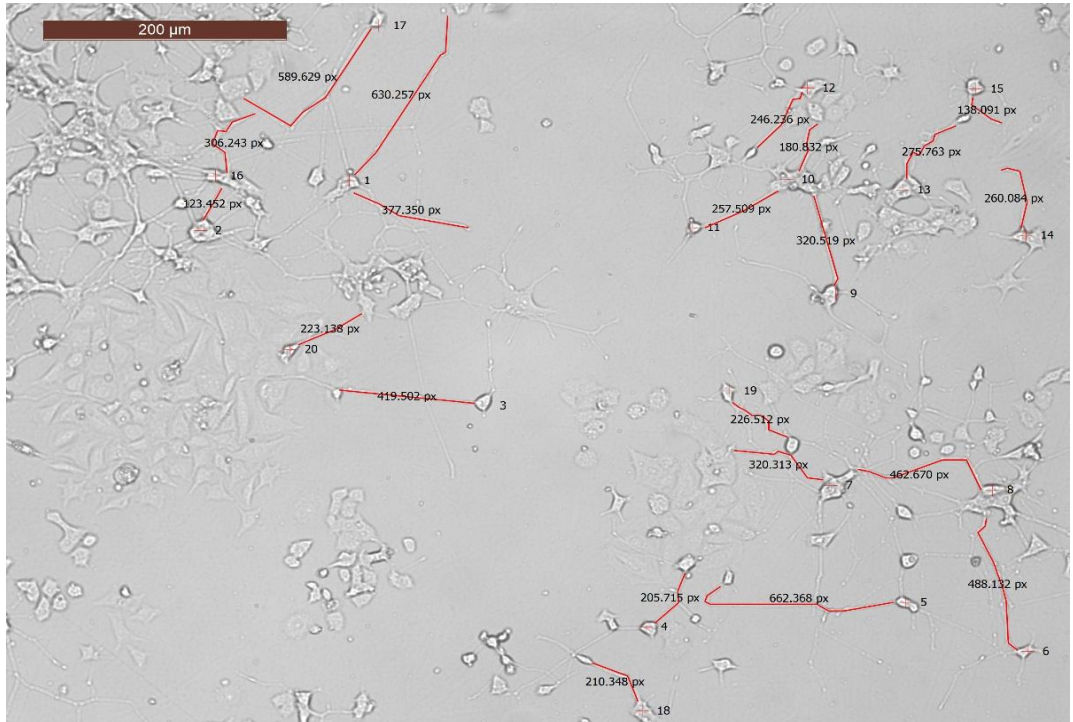
Şekil 48. PC-12 Adh Hücrelerinin NGF (100 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nörütünün Ve Nörütün Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü (Leica DM 300 Inverted mikroskop büyütmesi x100)



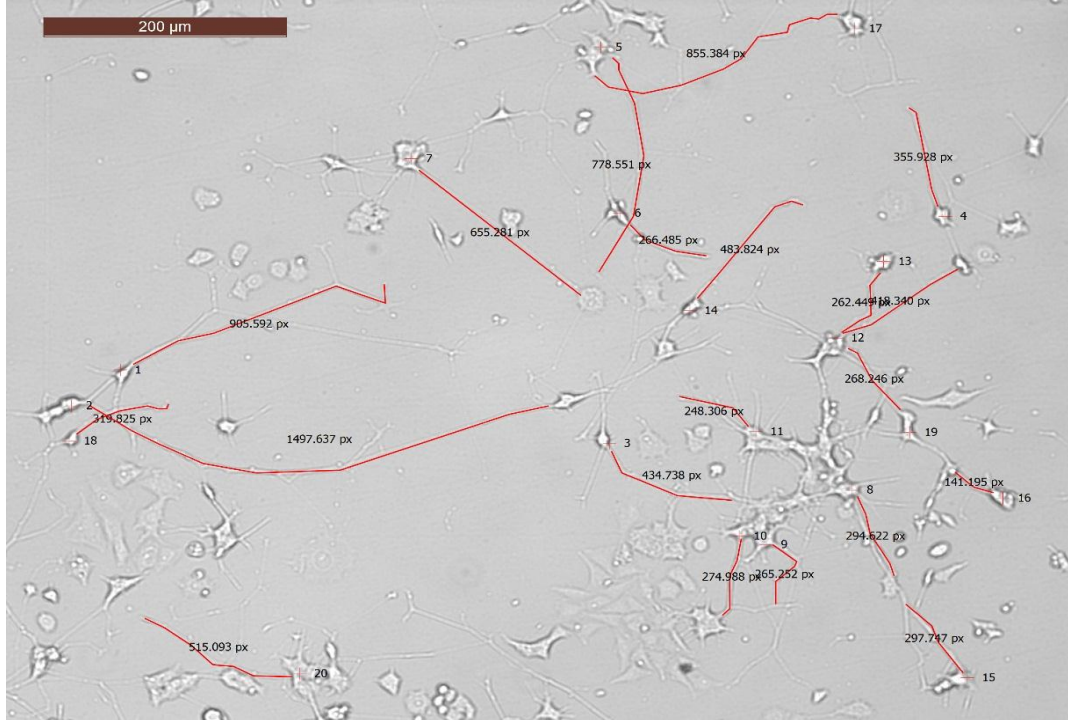
Şekil 49. PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + RG108 (10 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nörütünün Ve Nörütün Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü (Leica DM 300 Inverted mikroskop büyütmesi x100)



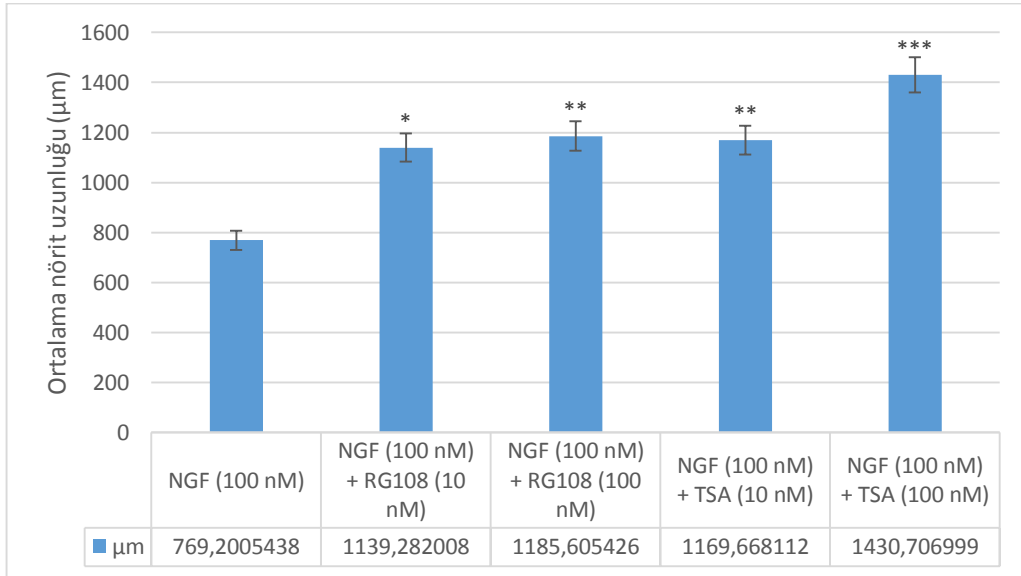
Şekil 50. PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + RG108 (100 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü (Leica DM 300 Inverted mikroskop büyütmesi x100)



Şekil 51. PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + TSA (10 nM) İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nöritinin Ve Nöritin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü (Leica DM 300 Inverted mikroskop büyütmesi x100)



Şekil 52. PC12-Adh hücrelerinin NGF (100 nM) + TSA (100 nM) ile 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Rasgele Seçilen 20 Hücrenin En Uzun Nörinin Ve Nörin Yaptığı En Uzun Dalın Analiz Görüntüsü (Leica DM 300 Inverted mikroskop büyütmesi x100)



Şekil 53. PC-12 Adh Hücrelerinin TSA Ve RG108 Konsantrasyonları İle 7 Gün İnkübasyonu Sonunda Gruplara Göre Ortalama Nörin Uzunluğu (5 farklı rastgele alanda toplam 100 nörin uzunluğunun ortalaması) ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{}$, $p < 0.001^{***}$)**

Bu çalışmada, nörin uzunluğu analizi, nörin büyümesi gözlenen NGF (100 nM), NGF (100 nM) + RG108 (10, 100 nM) ve NGF (100 nM) + TSA (10, 100 nM) konsantrasyonları için yapılmıştır. Nörin uzunluğu analizi için rasgele çekilen fotoğraflardan en az 20 nörin bulunan fotoğraflar arasında her konsantrasyon grubu için 5 adet fotoğraf olmak üzere toplamda 25 fotoğraf seçilmiştir. Bir fotoğrafta 20,

toplamda bir konsantrasyon için ise 100 hücrenin nörit uzunluğu mikroskobun analiz programı ile piksel cinsinden ölçülmüştür. Daha sonra uzunluklar toplanmış, 100'e bölünmüş ve her konsantrasyon grubu için bir nöritin ortalama uzunluğu elde edilmiştir. Sonrasında piksel cinsinden elde edilen değerler mikrometreye çevrilerek bir grafik çizilmiştir. Bizim çalışmamıza paralel olarak, Takashi ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada, PC-12 hücre farklılaşmasının kantitatif analizi için 3 farklı yöntem değerlendirilmiştir. Öncelikle ELISA yöntemiyle, nörit gelişimi sırasında ifadesi artan β -tubulin III gibi nöronal markerların ölçümü yapılmıştır. Daha sonra farklılaşma sırasında miktarı azalan laktat dehidrogenaz (LDH) ve miktarı artan mitokondriyal NADH-dehidrogenaz aktivitesine bakılmıştır. Sonrasında, PC-12 hücreleri 96'lı plakalara 15000 hücre/cm² yoğunlukta ekilmiş, iki gün sonra büyüme besiyeri çeşitli nörotrofik faktörler içeren (NGF, 2E11, EGF (epidermal büyüme faktörü), bFGF (fibroblast büyüme faktörü) ve IL-6 farklılaşma besiyerleri ile değiştirilmiştir. 5 günlük inkübasyon süresi sonunda, hücre somasının 2 katı uzunluğundaki nöritler pozitif olarak kabul edilmiş ve her hücredeki en uzun nörit ölçülmüştür. Her plaka için 100 hücreden fazla ölçüm yapılarak nörit analizi yapılmıştır. En uzun nörit uzunluğu 100 ng/mL NGF kullanılarak elde edilmiştir, elde edilen nörit analizi sonuçları, diğer 2 yöntem sonuçları ile de paralellik göstermiştir (Takashi ve ark., 2002). Bizim çalışmamızda da, bu çalışmaya benzer olarak nörit indüksiyonu için 100 ng/mL NGF kullanılmış ve nörit uzamasında etkili olduğu görülmüştür. Yapılan literatür taramasında bir DNA metiltransferaz inhibitörü olan RG108'in nörit gelişimi ve uzaması üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Trikostatın A'nın ve diğer histon deasetilaz inhibitörlerinin, nöron farklılaşması ve uzaması üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (Hasan ve ark., 2013; Suzuki-Mizushima ve ark., 2002; Brandon ve ark., 2007; Gaub ve ark., 2010). Biz de bu çalışmada nörit gelişimi ve uzamasında etkili olduğu bilinen NGF ve Trikostatın A'nın etkileri ile yeni bir DNA metiltransferaz inhibitörü olan RG108'in etkilerini karşılaştırmayı amaçladık. Bulgularımıza göre PC-12 Adh hücrelerinde NGF + TSA (100 nM) konsantrasyonda nörit uzunluğunu en fazla (1430.70 μ m) belirlememize rağmen, NGF + RG108 (100 nM) konsantrasyonda da nörit gelişiminin olduğu ve nörit uzunluğunun 1185.61 μ m olduğunu belirledik.

Nörotoksikanların PC-12 hücreleri üzerindeki indükleyici etkisinin incelendiği bir çalışmada ise nörit analizi yanında, Western blotlama ile GAP-43 ve sinapsin I miktarlarına bakılmıştır. PC-12 hücreleri, tip I kollajen ile kaplanmış 12'li plakalara büyüme besiyeri içerisinde 2×10^3 yoğunlukta ekilmiş ve iki saat sonra besiyeri 50 ng/mL NGF ve/veya ilaç konsantrasyonlarını içeren (MAP kinaz inhibitörü U0126 5-30 μ M ve PKC inhibitörü bisindolilmaleimide I 1.25-5 μ M) serumsuz farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücrelere 2., 4., ve 6. günde NGF eklenmiştir. 7 gün boyunca, her kuyudan 2 alan, toplamda yaklaşık 10 alan fotoğraflanmıştır. Hücre somasına eşit boyda uzantısı olan her hücre nörit pozitif kabul edilmiş ve toplam

nörit pozitif hücre sayısı bulunmuştur. Daha sonra NIH Image software kullanılarak nörit pozitif hücrelerin en uzun nöritleri ölçülmüş ve nörit uzunlukları toplanmış ve ortalama alınmıştır. Nörit analizi sonuçları ile nörit gelişimi sırasında ifadesi artan GAP-43 protein miktarları, doğru orantılı bulunmuştur. Bu nedenle GAP-43, PC-12 hücre farklılaşması için bir indikatör olabileceği bildirilmiştir (Kaberi ve ark., 2004).

Tamplenizza ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada, yüzey topografisinin PC-12 farklılaşmasındaki etkileri incelenmiştir. Deney boyunca hücreler, 50 ng/mL NGF içeren farklılaşma besiyerinde veya NGF içermeyen serumsuz besiyerinde, düz ya da TiO₂ ile kaplı yüzeylerde inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48. saatte hücreler fotoğraflanmıştır. Nörit uzunluğu 20 µM'ın üzerinde olan hücreler nörit pozitif olarak kabul edilmiştir ve pozitif nöritin en uzun dalı ve eğer varsa yaptığı en uzun dallanma ölçülerek nörit uzunluğu hesaplanmış ve aritmetik ortalamaları bulunmuştur. 20x ve 40x'lik objektifler ile rasgele çekilen fotoğraflar taranarak önce fotoğraftaki toplam hücre sayısı (N), daha sonra nörit pozitif hücre sayısı (n) bulunmuş ve farklılaşma faktörü, $R=100*n/N$ formülüyle hesaplanmıştır. Her konsantrasyon için en az 100 hücre ölçülmüştür. Deney sonucunda TiO₂ kaplı yüzeyin, nörit gelişimini, NOS (nitrik oksit sentaz) ekspresyonunu artırarak pERK1/2 sinyal yolağı üzerinden aktive ettiği sonucuna varılmıştır (Tamplenizza ve ark., 2013).

Liao ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir araştırmada, curcuminoidlerin PC-12 hücrelerindeki nörit gelişimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, poly-L-lizin kaplı 6'lı plakalara 3×10^5 hücre/mL yoğunlukta büyüme besiyeri içerisinde ekim yapılmış, 24 saat sonra 30 dakika MEK1/2, U0126 inhibitörleriyle inkübe edilmiştir. Hücreler üzerine farklılaşma besiyeri içerisinde curcumin, DMC (demetoksicurcumin) ve BDMC (bisdemetoksikurcumin) (10, 20 µM) konsantrasyonları ile kontrol gruplarına da (DMSO (%0.1), ve NGF (50 ng/mL)) uygulanmıştır. 72 saat sonra her kuyudan en az 100 hücre içeren 2 alan fotoğraflanmış, en az hücre soması ile eşit uzunlukta nöritlere sahip hücreler sayılmış ve nörit uzunlukları ölçülmüştür. Daha sonra her konsantrasyona ait ortalama nörit uzunluğu bulunmuştur. Nörit uzunluğu üzerine en etkili curcuminoid, curcumin 20 µM'dır. Western blot analizleri sonucunda kurcumin ve DMC'in CREB proteinini fosforile ettiği ve CRE-reporter gen aktivitesini indüklediği bildirilmiştir (Liao ve ark., 2012).

Nörorejenerasyon, nöronların endojen olarak korunması, nöroplastisite ve nörit büyümesini kapsayan bir kavramdır (Enciu ve ark., 2011). Nörojenezin başlıca morfolojik karakteristiği, nörit gelişimini takip eden akson ve dendritlerin dallanmasıdır (Kiryushko ve ark., 2004). Nörit oluşumu ve şekillenmesi temel olarak sinir sistemi gelişimi ve patogenezi ile ilişkilendirilmektedir (Hagg, 2009).

Nörit gelişimi, nöronların gelişimi sırasında hedeflerine ulaşmak için oluşturdukları çıkıntıların bir ağ haline gelmesi ve bunun sonucunda nöronal bağlantıların oluşması olarak açıklanabilen bir süreçtir. PC12 hücreleri nöronal fenotipin

farklılaşması için yaygın olarak kullanılan bir in vitro modelidir. Ancak bu hücreler, sempatik nöronlara benzer özellikler gösterse de belirgin akson ve sinaps yapmamaları kullanımlarını sınırlamaktadır ve ilerleyen pasajlarda hücre fenotipi bölünmeye bağlı olarak bozulmaktadır. *In vitro* nöronal farklılaşma genellikle nörojenik ligandların reseptöre bağlanması sonucunda tetiklenir. Bağlanma sonrasında, çeşitli intraselüler sinyal yolları aktive olur ve bu aktivasyon hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve nörit oluşumu ile sonuçlanır.

Nöropatolojik süreçlerde, histonların hücresel asetilasyon homeostazisinin bozulması son yıllarda dikkat çekmiştir (Hahnen ve ark., 2008). Pek çok çalışma özellikle, nörodejenerasyonun aşırı histon deasetilasyonu ile sonuçlanan histon asetiltransferaz aktivitesindeki (HAT) genel düşüş ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Jin ve ark., 2011; Rouaux ve ark., 2003). Bu nedenle HDAC inhibitörlerinin terapötik etkileri çeşitli nörodejeneratif hastalıklar üzerinde test edilmiş ve Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral sklerozis ve deneysel otoimmün ensefalomyelit modelleri üzerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

HDACi, DNA ile ilişkili proteinlerin asetilasyonunu düzenler ve böylece kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonel aktivitede değişikliklere neden olur (Bolden ve ark., 2006). Küçük moleküllü HDAC inhibitörleri ile HDAC aktivitesinin inhibe olabilmesi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde önemli kazanmıştır (Cheng ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda, valproik asidin(VPA) hipokampal nöronal progenitör hücrelerdeki nöronal farklılaşmayı artırdığı(Hsieh ve ark., 2004, Yu ve ark., 2009), suberoilanilid hidroksumit asit (SAHA), MS-275 ve M344 gibi HDAC inhibitörlerinin de erişkin önbeyin prekürsör hücrelerinde nöronal farklılaşmayı arttırdığı rapor edilmiştir. (Siebzehnrubl ve ark., 2007). HDAC enzim inhibisyonunun, transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi kolaylaştıran promotör lokusların açılmasını sağlayan histon asetilasyonunda artışa neden olarak Bu etki pek çok genin ekspresyonunda artırdığı açıklanmıştır (Robert ve ark., 2010). Özellikle bir HDACi olan TSA'nın hücre döngüsünü G1 ve G2 fazında durdurarak nöronal farklılaşmayı indüklediği bildirilmiştir (David ve ark., 2001). Biermann ve arkadaşlarının bir çalışmasında da TSA'nın embriyonik fare nöronal kök hücrelerinde astrosit farklılaşmasını azaltarak nöronal farklılaşmayı artırdığı gösterilmiştir (Biermann ve ark., 2011). TSA'nın, rat hipokampal nöral progenitör hücrelerinde, nöro 2a hücrelerinde ve retinal ganglion hücre hattı RGC-5 hücrelerinde farklılaşmayı indüklediği ve nörit gelişimini artırdığı gösterilmiştir (Schwechter ve ark., 2007). TSA tarafından indüklenen kortikal nöronal büyüme ve nörojenez ERK (Hao ve ark., 2004) ve JNK (Yamauchi ve ark., 2007) yolağının aktivasyonunu ve GSK3 regülasyonunu (Hall ve ark., 2002) içerdiği açıklanmıştır. Ayrıca TSA'nın, bellek konsolidasyonu sırasında belirli genlerin ekspresyonunu artırdığı (Vecsey ve ark., 2007) ve sıçan inme modellerinde, nöronal sağ kalımı artırdığı (Jeonga ve ark., 2003) ve nöroproteksiyonu sağladığı (Xu ve ark., 2007) gösterilmiştir. Hasan ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada, Sprague-Dawley cinsi sıçan embriyosu serebral korteks üzerinde iskemi modeli geliştirilmiş ve TSA ve valproik asidin BDNF ekspresyon seviyelerini artırarak nörit gelişimini indüklediği ve nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir(Hasan ve ark., 2013). Başka bir çalışmada

bir HDAİ olan sodyum bütiratın ve trikostatin A'nın PC-12 hücrelerindeki nörit gelişimi ve uzaması üzerinde etkili olduğu açıklanmıştır (Suzuki-Mizushima ve ark., 2002). Di Giovanni ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, tümör supressör p53 proteininin nöronal apoptozu indüklediği yolaktan farklı bir post-translasyonel yolak üzerinden nörit gelişimi ve akson rejenerasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Di Giovanni ve ark., 2006). Bir çalışmada da, TSA'nın, transkripsiyona bağlı bir mekanizma ile nörit gelişimini artırdığı ve nöron gelişimi markerlarından olan GAP-43 proteininin ekspresyonunu artırdığı da gösterilmiştir. (Gaub ve ark., 2010).

DNA metilasyonu en sık çalışılan epigenetik mekanizma olup, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısı, X-kromozom inaktivasyonu, genomik "imprinting" in düzenlenmesi ve kromatin kararlılığının korunmasında fonksiyon görmektedir (Robertson, 2005). DNA metilasyonunun transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metilli DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek genlerin ifadesini baskıladığı bildirilmiştir (Bora ve Yurter, 2007). Modifiye edilmiş histonlar gibi metillenmiş CpG nükleotidleri de transkripsiyonel baskılayıcıları çalıştırarak ya da transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek gen ekspresyonunu düzenlerler (Miranda ve Jones, 2007; Greenberg ve ark., 1986).

DNA metiltransferazlar, memeli genomlarında S-adenozilmetiyonin'den sitozine bir metil grubunun transferine aracılık eden tek enzim olarak bilinmektedir (Goll & Bestor, 2005). Anormal DNA metilasyonu, kanser de dahil pek çok patoloji için en iyi karakterize edilmiş epigenetik özelliktir (Robertson, 2005).

Son yıllarda geliştirilmiş olan bir DNMTi olan RG108, HCT116 hücre hattında promotör metilasyonu tarafından baskılanan P16^{INK4a} ve TIMP3 gibi tümör baskılayıcı genleri aktive ettiği gösterilmiştir (Stresemann ve ark., 2006).

Shoumei ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, hücre ya da dokuya özgü farklılaşmada epigenetik yeniden programlamanın rolünün anlaşılabilmesi için PC-12 hücrelerinin NGF ile indüklenerek nöronal hücrelere dönüşümünde DNA metiltransferazların rolü araştırılmıştır. Bu çalışmada farklılaşma sırasında DNMT1 ve DNMT3a enzim seviyelerinin oldukça azaldığı, DNMT3b'nin ise arttığı bulunmuştur (Shoumei ve ark., 2005).

Miller ve Sweat tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, sıçanlarda korku şartlanması eğitiminden sonra hipokampal DNMT mRNA ekspresyonunda ve hipokampusün CA1 bölgesindeki DNMT'ların 5-aza-deoksisitinin ve zebularine ile inhibisyonundan sonra donma davranışının belirgin ölçüde azaldığı bu nedenle DNMT'ların anıların bir araya getirilmesinde gerekli olduğunu öne sürmüştür. DNA metilasyonunun bellek baskılayıcı gen olan PP1'in susturulmasını önlediği düşünülmüştür. *Reelin* gibi bazı spesifik genlerin metilasyonunda artışa da neden olduğu bildirilmiştir. Reelinin, nöronal migrasyon ve nöroplastisite sırasında yüksek miktarda ifade edilen hücre-hücre kontrollerinden sorumlu bir ekstraselüler

matriks glikoproteini olduğu açıklanmıştır (Weeber ve ark., 2002; D'arcangelo, 2005).

Bu tez çalışmasında, PC-12 Adh hücrelerinde nörit analizi, başka kantitatif yöntemlerle desteklenmiş, RTCA DP hücre indeksi grafikleri, migrasyon analizleri, MMP-2 miktarları ve PC-12 hücrelerinde floresan boyalarla morfolojik olarak nörit görüntüleri, nörit uzunluk analizi sonuçlarımız ile paralellik göstermiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; özellikle kanser tedavisinde kullanılabileceği üzerinde çalışmaları devam eden HDAC inhibitörü TSA ve DNMT inhibitörü RG108'in nöronal farklılaşmadaki epigenetik etkilerini *in vitro* hücre kültürü ortamında araştırdık. Yapılan literatür taramasında, farklı epigenetik mekanizmaları kullanan bu iki ilacın nörit gelişimi üzerinde etkilerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmaması, bu çalışmanın özgün değerini arttırmaktadır. Bu tez çalışmasında PC-12 Adh hücreleri üzerinde nörotrofik faktör olarak NGF (100 nM) uygulaması yapılan hücrelere göre NGF (100 nM) + TSA (10, 100 nM) ve NGF (100 nM) + RG108 (10, 100 nM)'in ilaç kombinasyonlarında nöronal farklılaşma ve nörit uzamasının anlamlı olduğunu belirledik. Ancak bir HDAC inhibitörü olan TSA nörit uzamasında bir DNMT inhibitörü olan RG108'e göre daha etkili olduğunu bulduk. Nöronal farklılaşma ve nörit uzamasındaki morfolojik bulgularımızı, gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde hücre farklılaşması, migrasyonu ve invazyonu çalışmaları ile elde ettiğimiz hücre indeks ve ELISA MMP-2 değerlerindeki artışla destekledik.

Daha çok kanser tedavisine yönelik çalışmalarda kullanılan bu iki ilacın epigenetik mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik epigenetik mekanizmaları içeren birçok hipotez mevcuttur. Biz de bu tez çalışması ile iki farklı epigenetik mekanizmanın nöronal gelişim ve nörit uzamasındaki etkisini karşılaştırarak, nörodejeneratif hastalıklarda bu iki ilacın potansiyel etkilerini araştırdık.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, TSA ve RG108'in kombine uygulamalarının da kullanıldığı yeni hücresel mekanizmaların (apoptoz ve antikanser gibi) açıklanması gerektiği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Allen, N.J., Barres, A.B., Neuroscience: Glia — more than just brain glue, *Nature*, 457, 675-677 (2009).
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., Mirsky, A.E., Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis., *Proc Natl Acad Sci USA*, 51,786-794 (1964).
- Balasubramanian, V., Boddeke, E., Bakels, R., Kust, B., Kooistra, S., Veneman, A., Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells., *Neuroscience*, 143, 939–951 (2006).
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell Research*, 21, 381-395 (2011).
- Bartkowska, K., Turlejski, K., Djavadian, R.L., Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system, *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*, 70, 454–467 (2010).
- Batty, N., Malouf, G. G., Issa, J. P., Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents., *Cancer Letters*, 280, 192–200 (2009).
- Bayram, A., İğci, M., Sirtuin Genleri Ve İşlevleri, *Fırat Tıp Derg*, 18(3), 136-140 (2013).
- Bertos, N. R., Wang, A. H., Yang, X. J., Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation., *Biochem. Cell Biol.*, 79, 243–252 (2001).
- Beutner, E.H., Immunofluorescent Staining: The Fluorescent Antibody Method, *New York Bacteriol Rev.*,25(1), 49–76 (1961).
- Bhaumik, S.R., Smith, E., Shilatifard, A., Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis., *Nature Struct. Mol. Biol.*, 14, 1008–1016 (2007).
- Biermann, J., Boyle, J., Pielen, A., Lagreze, W.A., Histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and valproic acid delay spontaneous cell death in purified rat retinal ganglion cells., *Mol Vis*, 17, 395–403 (2011).
- Bird, A., CpG-rich islands and the function of DNA methylation., *Nature*, 321, 209-213 (1986).
- Bird, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory., *Genes Dev*, 16, 6–21 (2002).
- Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W., Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, *Nat.Rev.Drug Discov.*, 5, 769–784 (2006).
- Bora, G., Yurter, H.E., Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 48-54 (2007).
- Bredesen, D.E., Rao, R.V., Mehlen P., Cell death in the nervous system., *Nature*, 443, 796-802 (2006).

- Brueckner, B., Boy, R.G., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H.C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M. and Lyko, F., Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases., *Cancer Res.*, 65, 6305-6311 (2005).
- Brueckner, B., Boy, R.G., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H.C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M., Lyko, F., Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes by a Novel Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Methyltransferases, *Cancer Res*, 65(14) (2005).
- Brugg, B., Matus, A., PC12 Cells Express Juvenile Microtubule-associated Proteins during Nerve Growth Factor-induced Neurite Outgrowth, *The Journal of Cell Biology*, 107, 644-650 (1988).
- Brunton, L.L., Lazo, S.J., Parker, L.K., Santral Sinir Sistemine Etkili İlaçlar, Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temelleri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 317-318 (2009).
- Butler, R., Bates, G.P., Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders., *Nature Rev. Neurosci.*, 7, 784–796 (2006).
- Cairns, B.R., The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters., *Nature*, 461, 193-8 (2009).
- Campos, E.I., Reinberg, D., Histones: annotating chromatin., *Annu Rev Genet*, 43, 559-99 (2009).
- Carey, N., La Thangue, N.B., Histone deacetylase inhibitors: gathering pace., *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6, 369–375 (2006).
- Chalazonitis, A., Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system, *Prog. Brain Res.*, 146, 243–263 (2004).
- Chen, Y.F., Zeng, X., Zhang, K., Lai, B.Q., Ling, E.A., Zeng, Y.S., Neurotrophin-3 stimulates migration of mesenchymal stem cells overexpressing TrkC, *Curr. Med. Chem.*, 20, 3022–3033 (2013).
- Cheng, H., Liao, K.K., Liao, S.F., Chuang, T.Y., Shih, Y.H., Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia, *Spine*, 29, 284-288 (2004).
- Cheng, J.C., Matsen, C.B., Gonzales, F.A., Ye, W., Greer, S., Marquez, V.E, Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine., *J Natl Cancer Inst*, 95, 399–409 (2003).
- Chuang, D., Leng, Y., Zoya, M., Kim, H.J., Chiu C.T., Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions, *Trends in Neurosciences*, 32(11), 591-601 (2009).
- Chuang, J.C., Jones, P.A., Epigenetics and microRNAs., *Pediatr Res.*, 61(5 Pt 2), 24-29 (2007).

- Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., DNA independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation., *Mol Cell*, 25, 297-308 (2007).
- Constantinides, P.G., Jones, P.A., Gevers, W., Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment, *Nature*, 267, 364-366 (1977) .
- Constantinides, P.G., Taylor, S.M., Jones, P.A., Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides, *Dev. Biol.*, 66, 57-71 (1978) .
- Çakmur, R., Parkinson Hastalığı ve Medikal Tedavisi, *Klinik Gelişim*, 1, 53-60 (2009).
- D'Onofrio, M., Paoletti, F., Arisi, I., Brandi, R., Malerba, F., Fasulo, L., Cattaneo, A., NGF and proNGF Regulate Functionally Distinct mRNAs in PC12 Cells: An Early Gene Expression Profiling, *PLoS ONE*, 6(6), 20839 (2011).
- Da Silva, J.S., Dotti, C.G.,. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis., *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 694–704 (2002).
- D'Arcangelo, G., Apoer2: a reelin receptor to remember., *Neuron*, 47(4), 471-3 (2005).
- Darya, K., Vladimir, B., Bock, E., Regulators of Neurite Outgrowth: Role of Cell Adhesion Molecules, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014, 140–154 (2004).
- Davie, J.R., Spencer, V.A., Control of histone modifications., *J. Cell. Biochem.*, 75(32), 141–148 (1999).
- Dawson, M.A., Bannister, A.J., Gottgens, B., JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin, *Nature*, 461, 819-822 (2009).
- Denis, H., Ndlovu, M.N., Fuks, F., Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms, *EMBO reports*, 12, 647–656 (2011).
- Denu, J.M., The Sir 2 family of protein deacetylases., *Curr. opin. Chem. Biol.*, 9, 431–440 (2005).
- Dhobale, M., Neurotrophins: Role in adverse pregnancy outcome, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 37, 8–14 (2014).
- Di Giovanni, S., Knights, C.D., Rao, M., Yakovlev, A., Beers, J., Catania, J., The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration., *EMBO J*, 25, 4084–4096 (2006).
- Dong-Dong, C., Qing-Cheng, Y., Zhi-Chang, Z., Cui-Xia, Y., Yi-Wen, L., Antitumor Activity of Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A in Osteosarcoma Cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13 (2012).

- Dwane, S., Durack, E., Kiely, P.A., Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration, *BMC Research Notes*, 11, 6:366 (2013).
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, AP., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature*, 63, 429-457 (2004).
- Enciu, A.M., Nicolescu, M.I., Manole, C.G., Muresanu, D.F., Popescu, L.M., Popescu, B.O.,
- Erol, D., Elyas, Z., Ünal, S., Psikiyatrik hastalıkların gelişiminde epigenetik mekanizmalar, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 20(1), 109-114 (2010).
- Ertan, S., Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri, *Nörolog Olmayanlar İçin Nöroloji Sempozyum Dizisi*, 42, 249-254 (2005).
- Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines., *Cancer Res*, 63, 7563 – 70 (2003).
- Feinberg, A., The Epigenetics of cancer etiology., *Cancer Biology*, 14, 427- 432 (2004).
- Finkel, R., Clark, M.A., Cubeddu, L.X., Chapter 8: Neurodegenerative Diseases, *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*, 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 94-104 (2009).
- Fournel, M., Bonfils, C., Hou, Y., Yan, P. T., Trachy-Bourget, M. C., Kalita, A., MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo., *Molecular Cancer Therapeutics*, 7, 759–768 (2008).
- Fournier, A.E., GrandPre, T., Strittmatter, S.M., Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration., *Nature*, 409 (6818), 341-346 (2001).
- Gan, L., Mucke, L., Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration., *Neuron*, 58, 10–14 (2008).
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., Atadja, P., Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family., *J. Biol. Chem.*, 277, 25748–25755 (2002).
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., CpG islands in vertebrate genomes., *J Mol Biol*, 196, 261-282 (1987).
- Gaub, P., Tedeschi, A., Puttagunta, R., Nguyen, T., Schmandke, A., Di Giovanni, S., HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation, *Cell Death and Differentiation*, 17, 1392–1408 (2010).
- Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation., *Science*, 300, 489–92 (2003).

- Genç, Ş., Akhisaroğlu, M., Genç, K., Eritropoetin'in Pc12 Hücre Hattında Amiloid-Beta Peptid İle Oluşturulan Nörotoksisiteye Karşı Koruyucu Etkisi, *Geriatrici*, 5(L), 2 (2002).
- Geraldo, S., Gordon-Weeks, P.R., Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering, *Journal of Cell Science*, 122, 3595-3604 (2009).
- Gigante, A., Bevilacqua, C., Pagnotta, A., Manzotti, S., Toesca, A., Greco, F., Expression of NGF Trka and p75 in human cartilage, *Eur. J. Histochem.*, 47, 339–344(2003).
- Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E., Acetylation and deacetylation of non-histone proteins., *Gene*, 363, 15–23 (2005).
- Goll, M.G., Bestor, T.H., Eukaryotic cytosine methyltransferases., *Annu Rev Biochem*, 74, 481–514 (2005).
- Goodman, C., Mechanisms and molecules that control growth cone guidance., *Annu. Rev. Neurosci.*, 19, 341–377 (1996).
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A., Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription., *Science*, 234, 80–83 (1986).
- Grégoire, S., Xiao, L., Nie, J., Zhang, X., Xu, M., Li, J., Wong, J., Seto, E., Yang, X.J., Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2., *Mol. Cell. Biol.*, 27, 1280–1295 (2007).
- Grozinger, C.M., Schreiber, S.L., Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 7835–7840 (2000).
- Guyton, C.A., Hall, E.J., Bölüm 60 Otonom Sinir sistemi ve Böbreküstü (Adrenal) Bezi Medullası, *Textbook of Medical Physiology*, Çavuşoğlu, H., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 697-708 (2001).
- Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N., The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy, *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 32–42 (2009).
- Hagg, T., From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis., *Neuroscientist*, 15, 20–27 (2009).
- Haigang, G., Zhilian, Y., Controlled Release Strategy Based on Biodegradable Microspheres for Neurodegenerative Disease Therapy, *Basic Principles of Peripheral Nerve Disorders*, Seyed Mansoor Rayegani, Intech, 47-62 (2012).
- Hall, A.C., Brennan, A., Goold, R.G., Cleverley, K., Lucas, F.R., Gordon-Weeks, P.R., Salinas, P.C., Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons., *Mol Cell Neurosci*, 20(2), 257–270 (2002).
- Hallows, W.C., Lee, S., Denu, J.M., Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 10230–10235 (2006).

- Hamnera, J.B., Simsa, T.L., Cutshawa, A., Dickson, P.V., Rosatia, S., McGee, M., Nga, C.Y., Davidoff, A.M., The efficacy of combination therapy using adeno-associated virus—interferon β and trichostatin A in vitro and in a murine model of neuroblastoma, *Journal of Pediatric Surgery*, 43(1), 177–183 (2008).
- Hao, Y., Creson, T., Zhang, L., Li, P., Du, F., Yuan, P., Gould, T.D., Manji, H.K., Chen, G., Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis., *J Neurosci*, 24(29), 6590–6599 (2004).
- Hasan, M.R., Kim, J.H., Kim, Y.J., Kwon, K.J., Shin, C.Y., Kim, H.Y., Han, S.H., Choi, D.H., Lee, J., Effect of HDAC Inhibitors on Neuroprotection and Neurite Outgrowth in Primary Rat Cortical Neurons Following Ischemic Insult, *Neurochem Res*, 38, 1921–1934 (2013).
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., Hottiger, M.O., Nuclear ADP ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?, *Microbiol Mol Biol Rev*, 70, 789-829 (2006).
- Hebbel, R.P., Vercellotti, G.M., Pace, B.S., Solovey, A.N., Kollander, R., Abanonu, C.F., Nguyen, J., Vineyard, J.V., Belcher, J.D., Abdulla, F., Osifuye, S., Eaton, J.W., Slungaard A., The HDAC inhibitors trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid exhibit multiple modalities of benefit for the vascular pathobiology of sickle transgenic mice, *Blood*, 115(12), 2483–2490 (2010).
- Hershko, A., Ciechanover, A., The ubiquitin system., *Annu Rev Biochem*, 67, 425-479 (1998).
- Hodawadekar, S.C., Marmorstein, R., Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design., *Oncogene*, 26, 5528-5540 (2007).
- Holliday, R., Epigenetics: a historical overview., *Epigenetics*, 1(2), 76-80 (2006).
- Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., Eden, A., Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice., *Oncogene*, 27, 404–408 (2008).
- Hsieh, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E., Gage, F.H., Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells., *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 16659–16664 (2004).
- Huang, C., Borchers, C.H., Schaller, M.D., Jacobson, K., Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells., *J Cell Biol*, 26,593–602 (2004).
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., Yao, T.P., HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase., *Nature*, 417, 455–458 (2002).
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., Yao, T.P., HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase., *Nature* 417, 455–458 (2002).

- Hudson, C.D., Morris, P.J., Latchman, D.S., Budhram-Mahadeo, V.S., Brn-3a transcription factor blocks p53-mediated activation of proapoptotic target genes Noxa and Bax in vitro and in vivo to determine cell fate., *J Biol Chem*, 280, 11851–11858 (2005).
- Humphrey, G.W., Wang, Y.H., Hirai, T., Padmanabhan, R., Panchision, D.M., Newell, L.F., McKay, R.D., Howard, B.H., Complementary roles for histone deacetylases 1, 2, and 3 in differentiation of pluripotent stem cells., *Differentiation*, 76, 348–356 (2008).
- Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R. 3rd, Squinto, S.P., Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 3060–3064 (1992).
- İzmirli, M., Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar, *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51 (2013).
- Jeonga, M.R., Hashimoto, R., Senatorova, V.V., Fujimaki, K., Rena, M., Leeb, M.S., Chuanga, D., Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition, *542(1–3)*, 74–78 (2003).
- Jiang, H., Poirier, M.A., Liang, Y., Pei, Z., Weiskittel, C.E., Smith, W.W., Depletion of CBP is directly linked with cellular toxicity caused by mutant huntingtin., *Neurobiol Dis*, 23, 543–551 (2006).
- Jiang, Y., Bressler, J., Beaudet, L.A., Epigenetics and human disease., *Annu Rev Genet*, 5, 479-510 (2004).
- Johnstone, R.W., Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 287-299 (2002).
- Jones, P.A., Baylin, S.B., The fundamental role of epigenetic events in cancer., *Nat Rev Genet*, 3(6), 415–28 (2002).
- Jones, P.A., Taylor, S.M., Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation., *Cell*, 20, 85 – 93 (1980).
- Jurate, S., Treigyte, G., Borutinskaite, V.V., Navakauskiene, R., Antileukemic Activity Of Combined Epigenetic Agents, Dnmt Inhibitors Zebularine And RG108 With HDAC Inhibitors, Against Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 17, 501-525 (2012).
- Kaberi, P.D., Freudenrich, T.M., Mundy, W.R., Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures, *Neurotoxicol Teratol.*, 26(3), 397-406 (2004).
- Kazantsev, A.G., Thompson, L.M., Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 854–868 (2008).

- Kierszenbaum, A.L., 8. Sinir dokusu, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Demir, R., Palme Yayıncılık, Ankara, 222 (2006).
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snove, O., Rossi, J.J., MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells., *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 16230-16235 (2008).
- Kim, H., Li, Q., Hempstead, B.L., Madri, J.A., Paracrine and autocrine functions of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain derived endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 279, 33538–33546 (2004).
- Kim, H.J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.S., Chen, P.S., Chuang, D.M., Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action., *J Pharmacol Exp Ther*, 321(3), 892–901 (2007).
- Kim, J., Guermah, M., McGinty, R.K., RAD6-mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells., *Cell*, 137, 459-471 (2009).
- Kim, J.E., Li, S., GrandPre, T., Qiu, D., Strittmatter, S.M., Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B., *Neuron*, 38 (2), 187-199 (2003).
- Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N.V., White, M., Yang, X.J., Zhao, Y., Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey., *Mol. Cell*, 23, 607–618 (2006).
- Kim, Y., Park, H., Lim, Y., Han, I., Kwon, H.J., Woods, A., Oh, E.S., Decreased syndecan-2 expression correlates with trichostatin-A induced-morphological changes and reduced tumorigenic activity in colon carcinoma cells., *Oncogene*, 22, 826–830 (2003).
- Kiryushko, D., Berezin, V., Bock, E., Regulators of neurite outgrowth: Role of cell adhesion molecules., *Ann. NY Acad. Sci.*, 1014, 140–154 (2004).
- Kotan, Z., Sarandöl, A., Eker, S.S., Saygın, S., Akkaya, C., Depresyon, Nöroplastisite ve Nörotrofik Faktörler, *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches In Psychiatry*, 1, 22-35 (2009).
- Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function., *Cell*, 128, 693–705 (2007).
- Kretsovali, A., Hadjimichael, C., Charmpilas, N., Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation and reprogramming, *Stem Cells Int.*, 2012, 184154 (2012).
- Kumari, S., Swaminathan, A., Chatterjee, S., Senapati, P., Boopathi, R., Kundu, T.K., Chapter 1: Chromatin Organization, Epigenetics and Differentiation: An Evolutionary Perspective, *Epigenetics: Development and Disease*, Springer, 3-4 (2013).

- Kurdistani, S.K., Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view., *Br J Cancer*, 97(1), 1–5 (2007).
- Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression., *Cell*, 89, 349–356 (1997).
- Laird, P.W., The power and the promise of DNA methylation markers., *Nat Rev Cancer*, 3(4), 253-282 (2003).
- Lee, J.H., Park, J.H., Jung, Y., Kim, J.H., Jong, H.S., Kim, T.Y., Bang, Y.J., Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells, *Mol Cancer Ther*, 5(12) (2006).
- Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E.C., Lee, J.K., Porro, G., Pagani, P., Modena, D., Moras, M.L., Pozzi, P., Reznikov, L.L., Siegmund, B., Fantuzzi G., Dinarello C.A., Mascagni, P., The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo, *Mol.Med.*, 11, 1–15 (2005).
- Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R., Targeted mutation of the DNANA methyltransferase gene results in embryonic lethality., *Cell*, 69, 915–926 (1992).
- Liang, G., Lin, J.C.Y., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J.C., Nguyen, C.T., Weisenberger, D.J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F.A., Jones P.A., Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(19), 7357–62 (2004).
- Liao, K.K., Wu, M.J., Chen, P.Y., Huang, S.W., Chiu, S.J., Ho, C.T., Yen, J.H., Curcuminoids Promote Neurite Outgrowth in PC12 Cells through MAPK/ERK- and PKC-Dependent Pathways, *J. Agric.Food Chem.*, 60, 433–443 (2012).
- Libby, P., Lee, R.T., Matrix matters., *Circulation*, 102, 1874-6 (2000).
- Lin, X., Asgari, K., Putzi, M.J., Gage, W.R., Yu, X., Cornblatt, B.S., Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide., *Cancer Res*, 61, 8611–6 (2001).
- Liu, H., Hu, Q., Kaufman, A., D’Ercole, A.J., Ye, P., Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain., *J. Neurosci. Res.*, 86, 537–543 (2008).
- Liu, L.T, Chang, H.C., Chiang, L.C., Hung, W.C., Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res*, 63, 3069–3072 (2003).
- Liu, Q.R., Walther, D., Drgon, T., Polesskaya, O., Lesnick, T.G., Strain, K.J., De Andrade, M., Bower, J.H., Maraganore, D.M., Uhl, G.R., Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease, *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet.*, 134, 93–103 (2005).

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., Molecular Cell Biology. 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 968-93 (1999).
- Luo, L., O'Leary, D.D., Axon retraction and degeneration in development and disease, *Annu Rev Neurosci.*, 28, 127-56 (2005).
- Lüleyap, H.Ü., Bölüm 18: Kök Hücre, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Adana, 365, (2008).
- Lyko, F., Brown, R., DNA Methyltransferase Inhibitors and the Development of Epigenetic Cancer Therapies, *Journal of the National Cancer Institute*, 97(20) (2005).
- Ma, H., Qi, M.Y., Zhang, X., Zhang, Y.L., Wang, L., Li, Z.Q., Fu, B., Wang, W.T. Liu, D., HSPC117 Is Regulated by Epigenetic Modification and Is Involved in the Migration of JEG-3 Cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 10936-10949 (2014).
- Mai, A., Massa, S., Rotili, D., Cerbara, I., Valente, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy., *Med. Res. Rev.*, 25, 261–309 (2005).
- Majdzadeh, N., Morrison, B. E., D'Mello, S. R., Class IIA HDACs in the regulation of neurodegeneration., *Front. Biosci.*, 13, 1072–1082 (2008).
- Marks, P.A., Dokmanovic, M., Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents., *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 14, 1497–1511 (2005).
- Martin, C., Zhang, Y., Mechanisms of epigenetic inheritance., *Curr Opin Cell Biol*, 19(3), 266-272 (2007).
- Martin, M., Kettmann, R., Dequiedt, F., Class Iia histone deacetylases: regulating the regulators., *Oncogene*, 26, 5450–5467 (2007).
- Martino, G., Franklin, R.J., Van Evercooren, A.B., Kerr, D.A., Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects., *Nat Rev Neurol*, 6, 247–255 (2010).
- Maruoka, H., Hosokawa, R., Hirata, Y., Kawa, H., Okamoto, K., New Orally Bioavailable 2-aminobenzamide-type Histone Deacetylase Inhibitor Promotes Neurite Outgrowth via histone H3 Modification in PC12 cells: a Possible Therapeutic Candidate for Neuronal Diseases., *J Bioengineer & Biomedical Sci*, S5:001 (2012).
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., Yoshida, M., In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation., *EMBO J.*, 21, 6820–6831 (2002).
- Michan, S., Sinclair, D., Sirtuins in mammals: insights into their biological function., *Biochem. J.*, 404, 1–13 (2007).

- Michishita, E., McCord, R.A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T.L., Barrett, J.C., Chang, H.Y., Bohr, V.A., Ried, T., Gozani, O., Chua, K.F., SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin., *Nature*, 452, 492–496 (2008).
- Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., Horikawa, I., Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins., *Mol. Biol. Cell*, 16, 4623–4635 (2005).
- Miller, C.A., Sweatt, J.D., Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53, 857–869 (2007).
- Mingorance-Le Meur, A., Mohebiany, A.N., O'Connor, T.P., Varicones and Growth Cones: Two Neurite Terminals in PC12 Cells., *Plos One*, 4(2), 4334 (2009).
- Miranda, T.B., Jones, P.A., DNA methylation: the nuts and bolts of repression, *J Cell Physiol*, 213, 384–390 (2007).
- Miremadi, A., Oestergaard, M.Z., Pharoah, P.D., Caldas, C., Cancer genetics of epigenetic genes., *Hum Mol Genet*, 16, 28–49 (2007).
- Moazed, D., Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence., *Nature*, 457(7228), 413–420 (2009).
- Momparler, R.L., Momparler, L.F., Samson, J., Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia., *Leuk Res*, 8, 1043 – 9 (1984).
- Momparler, R.L., Pharmacology of 5-Aza-20-deoxycytidine (decitabine), *Semin. Hematol.*, 42, 9-16 (2005).
- Montgomery, R.L., Hsieh, J., Barbosa, A.C., Richardson, J.A., Olson, E.N., Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development., *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 7876–7881 (2009).
- Morrison, B.E., Majdzadeh, N., Zhang, X., Lyles, A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., D'Mello, S.R., Neuroprotection by Histone Deacetylase-Related Protein, *Mol. Cell Biol.*, 26(9), 3550 (2006).
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J Immunol Methods.*, 65(1-2), 55-63 (1983).
- Moyers, S.B., Kumar, N.B., Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials., *Nutr Rev*, 62, 204 – 11 (2004).
- Nagase, H., Woessner, J.F., Matrix metalloproteinases., *J Biol Chem*, 274, 21491-4 (1999).
- Nakagawa, H., Hasumi, K., Woo, J.T., Nagai, K., Wachi, M., Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent

apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate., *Carcinogenesis*, 25, 1567–74 (2004).

Neuroregeneration in neurodegenerative disorders., *BMC Neurol.*, 11, 75 (2011).

Nieoullon, A., Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects, *Journal of Applied Biomedicine.*, 9 (4), 173–183 (2011).

Nieto, M., Samper, E., Fraga, M.F., Gonzalez de Buitrago, G., Esteller, M., Serrano, M., The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine., *Oncogene*, 23, 735 – 43 (2004).

Ohuchi, T., Maruoka, S., Sakudo, A., Arai, T., Assay-based quantitative analysis of PC12 cell differentiation, *J Neurosci Methods*, 118(1), 1–8 (2002).

Oki, M., Aihara, H., Ito, T., Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases, *Subcell Biochem*, 41, 319-336 (2007).

Ooi, S.K., Bestor, T.H., The colorful history of active DNA demethylation., *Cell*, 133, 1145–1148 (2008).

Öztürk, G.B., Karan, M.A., Alzheimer Hastalığının Fizyopatolojisi, *Klinik Gelişim*, 3, 36-45, (2009).

Papa, J., Baylin, S.B., The epigenomics of cancer., *Cell*, 128, 683–692 (2007).

Patapoutian, A., Reichardt, L.F., Trk receptors: mediators of neurotrophin action, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11, 272–280 (2001).

Persengiev, S.P., Kilpatrick, D.L., The DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine specifically alters the expression of helix–loop–helix proteins Id1, Id2 and Id3 during neuronal differentiation, *NeuroReport*, 8, 2091–2095 (1997).

Petrie, K., Guidez, F., Howell, L., Healy, L., Waxman, S., Greaves, M., Zelent, A., The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms., *J. Biol. Chem.*, 278, 16059–16072 (2003).

Phillips, T., The role of methylation in gene expression., *Nature Education*, 1(1), 116 (2008).

Pina, I.C., Gautschi, J.T., Wang, G.Y., Sanders, M.L., Schmitz, F.J., France, D., Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase., *J Org Chem*, 68, 3866 – 73 (2003).

Ponting, C.P., Oliver, P.L., Reik, W., Evolution and functions of long noncoding RNAs., *Cell*, 136, 629-641 (2009).

Portela, A., Esteller, M., Epigenetic modifications and human disease., *Nat Biotechnol*, 28, 1057–1068 (2010).

Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., Timmusk, T., Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters, *Genomics*, 90, 397–406 (2007).

Purro, S. A., Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E. and Salinas, P. C. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli., *J. Neurosci.*, 28, 8644-8654 (2008).

Purves, D., Augustine, G.A., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M., *Modulation of Movement by the Basal Ganglia - Box A. Huntington's Disease, Neuroscience (2nd ed.)*, Sunderland, MA: Sinauer Associates. (2001).

Radio, N.M., Breier, J.M., Shafer, T.J., Mundy, W.R., *Assessment of Chemical Effects on Neurite Outgrowth in PC12 cells Using High Content Screening, Toxicological Sciences*, 105(1), 106–118 (2008).

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., *Section 4: The Nervous System, The Rang and Dale's Pharmacology 7th Edition*, Elsevier, (2011).

Rasenick, M. M., Yu, J., Tau associates with actin in differentiating PC12 cells, *FASEB J* 20, 1452-1461 (2006).

Reik, W., Dean, W., Walter, J, *Epigenetic reprogramming in mammalian development.*, *Science*, 293, 1089–1093 (2001).

Reiner, O., Shmueli, A., Sapir, T., *Neuronal Migration and Neurodegeneration: 2 Sides of the Same Coin, Cereb. Cortex*, 19(1), 42-48 (2009).

Robertson, D.K., *DNA methylation and human disease.*, *Nature Rev Genet*, 6, 597-610 (2005).

Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease.*, *Nat Rev Genet*, 6, 597–610 (2005).

Rombouts, K., Knittel, T., Machesky, L., Braet, F., Wielant, A., Hellemans, K., De Bleser, P., Gelman, I., Ramadori, G., Geerts, A., *Actin filament formation, reorganization and migration are impaired in hepatic stellate cells under influence of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor.*, *J Hepatol*, 37, 788–796 (2002).

Rouaux, C., Jokic, N., Mbebi, C., Boutillier, S., Loeffler, J.P., Boutillier, A.L., *Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration.*, *EMBO J*, 22, 6537–6549 (2003).

Saha, R.N., Pahan, K., *HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis.*, *Cell Death Differ*, 13, 539–550 (2006).

Santi, D.V., Norment, A., Garrett, C.E., *Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6993–7 (1984).

Santo, L., Hideshima, T., Kung, A. L., Tseng, J. C., Tamang, D., Yang, M., *Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma.*, *Blood*, 119, 2579–2589 (2012).

- Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., Boeke, J.D., The biochemistry of sirtuins., *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 435–465 (2006).
- Schaefers, A.T., Teuchert-Noodt, G., Developmental neuroplasticity and the origin of neurodegenerative diseases., *World J Biol Psychiatry*, (2013).
- Schaefers, A.T.U., Teuchert-Noodt, G., Developmental neuroplasticity and the origin of neurodegenerative diseases, *The World Journal of Biological Psychiatry*, 1–13 (2013).
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T.A., Silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin., *Genes Dev*, 18(11), 1251–62 (2004).
- Schwechter, B.R., Millet, L.E., Levin, L.A., Histone Deacetylase Inhibition–Mediated Differentiation of RGC-5 Cells and Interaction with Survival, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 48(6), 2845–2857 (2007).
- Schwer, B., North, B.J., Frye, R.A., Ott, M., Verdin, E., The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase., *J. Cell Biol.*, 158, 647–657 (2002).
- Segal, R.A., Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations, *Annu. Rev. Neurosci.*, 26, 299–330 (2003).
- Selekler, K., Alois Alzheimer Ve Alzheimer Hastalığı, *Turkish Journal Of Geriatrics Supplement*, 3, 9-14 (2010).
- Seligson, D.B., Horvath, S., Shi, T., Yu. H., Tze, S., Grunstein M Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence, *Nature*, 435, 1262-1266 (2005).
- Seol, H.S., Akiyama, Y., Shimada, S., Lee, H.J., Kim, T.I., Chun, S.M., Singh, S.R., Jang, S.J., Epigenetic silencing of microRNA-373 to epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer through IRAK2 and LAMP1 axes., *Cancer Lett.*, 8 (2014).
- Shio, Y., Eisenman, R.N., Histone sumoylation is associated with transcriptional repression., *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 13225-13230 (2003).
- Shukla, S.D., Velazquez, J., French, S.W., Lu, S.C., Ticku, M.K., Zakhari, S., Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol., *Alcohol Clin Exp Res*, 32(9), 1525–1534 (2008).
- Shumei, B., Kalpana, G., Jharna, D., Sarmila, M., Sung, O.Y., Samson, T.J., DNA Methyltransferase 3b Regulates Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells by Recruiting Histone Deacetylase 2, *Molecular And Cellular Biology*, 25(2), 751–766 (2005).
- Siebzehnruhl, F.A., Buslei, R., Eyupoglu, I.Y., Seufert, S., Hahnen, E., Blumcke, I., Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells., *Exp Brain Res*, 176, 672–678 (2007).

Siedlecki, P., Boy, R.G., Comagic, S., Establishment and functional validation of a structural homology model for human DNA methyltransferase 1., *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 558–63 (2003).

Sigalotti, L., Covre, A., Fratta, E., Parisi, G., Colizzi, F., Rizzo, A., Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies., *J Transl Med*, 8, 56 (2010).

Skovronsky, D.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications., *Annu Rev Pathol*, 1, 151-70 (2006).

Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C., Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair, *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 1217–1281 (2001).

Songi S., Kang, S.W., Choi, C., Trichostatin A enhances proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by downregulating thioredoxin 1, *Cardiovascular Research*, 85, 241–249 (2010).

Southwood, C.M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M.A., Gow, A., Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system., *Neurochem. Res.*, 32, 187–195 (2007).

Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G., Allis, C.D., Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*., *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(26), 14967–72 (1999).

Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H., Lyko, F., Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines, *Cancer Res.*, 66, 2794-2800 (2006).

Sun, S., Han, Y., Liu, J., Fang, Y., Tian, Y., Trichostatin A Targets the Mitochondrial Respiratory Chain, Increasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production to Trigger Apoptosis in Human Breast Cancer Cells., *Plos One*, 9(3), e91610 (2014).

Suzuki, T., Tanaka, R., Hamada, S., Nakagawa, H., Miyata, N., Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 1124–1127 (2010).

Suzuki-Mizushima, Y., Gohda, E., Okamura, T., Kanasaki, K., Yamamoto, I., Enhancement of NGF- and cholera toxin-induced neurite outgrowth by butyrate in PC12 cells, *Brain Research*, 951, 209–217 (2002).

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1., *Science*, 324, 930–935. (2009).

Takada, Y., Gillenwater, A., Ichikawa, H., Aggarwal, B.B., Suberoylanilide hydroxamic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes

- osteoclastogenesis by suppressing nuclear factor- κ B activation., *J Biol Chem*, 281, 5612–5622 (2006).
- Tamplenizza, M., Lenardi, C., Maffioli, E., Nonnis, S., Negri, A., Forti, S., Sogne, E., De Astis, S., Matteoli, M., Schulte, C., Milani, P., Tedeschi, G., Nitric oxide synthase mediates PC12 differentiation induced by the surface topography of nanostructured TiO₂, *Journal of Nanobiotechnology*, 11(35) (2013).
- Taner D., *Sinir Sistemine Giriş, Fonksiyonel Nöroanatomi, Odtü Yayıncılık*, 1-13 (2013).
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., Horio, Y., Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1., *J. Biol. Chem.*, 282, 6823–6832 (2007).
- Tedeschi, A., Nguyen, T., Puttagunta, R., Gaub, P., Di Giovanni, S.A., p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration., *Cell Death Differ*, 16, 543–554 (2009).
- Teter, B., Ashford, J.W., Neuroplasticity in Alzheimer's disease, *Journal of Neuroscience Research*, 70, 402–437 (2002).
- Thiagalingam, S., Cheng, K.H., Lee, H.J., Mineva, N., Thiagalingam, A., Ponte, J.F., Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code., *Ann. NY Acad. Sci.*, 983, 84–100 (2003).
- Thoenen, H., Neurotrophic factor and neuronal plasticity, *Science*, 270, 593–598 (1995).
- Tohda, C., Kuboyama, T., Komatsu, K., Search for natural products related to regeneration of the neuronal network., *Neurosignals*, 14, 34–45 (2005).
- Tong, J.J., Liu, J., Bertos, N.R., Yang, X.J., Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain., *Nucleic Acids Res.*, 30, 1114–1123 (2002).
- Uchida, H., Maruyama, T., Ono, M., Ohta, K., Kajitani, T., Masuda, H., Nagashima, T., Arase, T., Asada, H., Yoshimura, Y., Histone Deacetylase Inhibitors Stimulate Cell Migration in Human Endometrial Adenocarcinoma Cells through Up-Regulation of Glycodelin, 148 (2) (2007).
- Uluç, K., İşak, B., Tanrıdağ, T., Us, Ö., ALS patofizyolojisi: Neyi, Ne kadar biliyoruz?, *Marmara Medical Journal*, 21(1), 102-111 (2008).
- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.L., Alt, F.W., Serrano, L., Sternglanz, R., Reinberg, D., SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys16 during mitosis., *Genes Dev.*, 20, 1256–1261 (2006).
- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A., Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation., *J Neurosci*, 27(23), 6128–6140 (2007).

- Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C., Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo, *Clin Cancer Res*, 7, 971 (2001).
- Villar-Garea, A., Fraga, M.F., Espada, J., Esteller, M., Procaine is a DNA demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells., *Cancer Res*, 63, 4984–9 (2003).
- Waddington, C. H., The epigenotype, 1942., *Int J Epidemiol*, 41, 10–13 (2012).
- Waetzig, V., Herdegen, T., The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential for PC12 cell neuritogenesis and converges at the level of target proteins., *Mol Cell Neurosci*, 24, 238–249 (2003).
- Wang, H., Cheng, H., Wang, K., Wen, T., Different effects of histone deacetylase inhibitors nicotinamide and trichostatin A (TSA) in C17.2 neural stem cells, *J Neural Transm*, 11, 1307-15 (2012)
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing., *Nature*, 431, 873-878 (2004).
- Wang, S., Yan-Neale, Y., Zeremski, M., Cohen, D., Transcription regulation by histone deacetylases., *Novartis Found. Symp.*, 259, 238–245 (2004).
- Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning., *J. Biol. Chem.*, 277(42), 39944–52 (2002).
- Welle, A., Horn, S., Schimmelpfeng, J., Kalka, D., Photo-chemically patterned polymer surfaces for controlled PC-12 adhesion and neurite guidance, *Journal of Neuroscience Methods*, 142, 243–250 (2005).
- Wen, Y., Perissi, V., Staszewski, L.M., Yang, W., Krones, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Seto, E., The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 7202–7207 (2000).
- Woolf, C.J., No Nogo: now where to go?, *Neuron*, 38 (2), 153-156. (2003).
- Xhemalce, B., Dawson, M.A., Bannister, A.J., Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell Research*, 21, 381-395 (2011).
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B., Marks, P.A., Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action., *Oncogene*, 26(37), 5541–5552 (2007).
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Murabe, M., Fujiwara, Y., Sanbe, A., Fujita, Y., Murase, S., Tanoue, A., Gadd45a, the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate paxillin in N1E—115 neuroblastoma cells., *Exp Cell Res*, 313(9), 1886–1896 (2007).
- Yamazaki, M., Chiba, K., Mohri, T., Fundamental role of nitric oxide in neuritogenesis of PC12h cells., *Br J Pharmacol*, 146, 662–669 (2005).

Yang, T., Qiu, H., Bao, W., Li, B., Lu, C., Du, G., Luo, X., Wang, L., Wan, X., Epigenetic inactivation of EFEMP1 is associated with tumor suppressive function in endometrial carcinoma., *PLoS One*, 28, 8(6) (2013).

Yang, W.M., Tsai, S.C., Wen, Y. D., Fejer, G., Seto, E., Functional domains of histone deacetylase-3., *J. Biol. Chem.*, 277, 9447–9454 (2002).

Yang, X., Lay, F., Han, H., Jones, P.A., Targeting DNA methylation for epigenetic therapy, *Trends Pharmacol. Sci.*, 31, 536-546 (2010).

Yankner, B.A., Lu, T., Loerch, P., The aging brain., *Annu Rev Pathol.*, 3, 41-66 (2008).

Yu J.Z., Rasenick, M.M., Tau associates with actin in differentiating PC12 cells, *FASEB J.* 20, 1452–1461 (2006).

Yu, I.T., Park, J.Y., Kim, S.H., Lee, J.S., Kim, Y.S., Son, H., Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation., *Neuropharmacology*, 56, 473–480 (2009).

Zagris, N., Extracellular matrix in development of the early embryo., *Micron*, 32, 427–438 (2001).

Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Olson, E.N., Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation., *Mol. Cell. Biol.*, 22, 7302–7312 (2002).

Zhou, L., Cheng, X., Connolly, B.A., Dickman, M.J., Hurd, P.J., Hornby, D.P., Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases., *J Mol Biol*, 321, 591 – 9 (2002).

Zhou, Q., Dalgard, C.L., Wynder, C., Doughty, M.L., Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells., *BMC Neurosci*, 12, 50 (2011).

http-1 Sinir sistemi, <http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1210/unite09.pdf> (03.03.2014).

http-2 Sinir sistemi fizyolojisi, <http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1219/unite09.pdf> (5.8.2014).

http-3 Cells of the Nervous System <http://www.albany.edu/faculty/cafrye/apsy601/Ch.02cellsofthenervoussystem.html> (06.04.2014).

http-4 <http://en.wikipedia.org/wiki/Neuron> (13.8.14)

http-5 What is neurodegenerative disease? <http://www.neurodegenerationresearch.eu/about/what> (5.8.2014).

http-6 Epigenetik ve Epigenomik, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf, (4.5.2014)

http-7 <http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Phil-Carp-Fig-1-Nucleosoma-.jpg>
(12.6.2014)

http-8 <http://www.bhpress.org/asr/2012/09/20/alexander-ferrera-lab-work-on-september-20th/nucleosome-2/> (12.6.2014)

http-9 <http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html> (20.05.2014)

http-10

http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_DP_Brochure_ACEA_LoRes.pdf (20.05.2014)