

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β -AMİLOİD PEPTİD VARLIĞINDA
NÖRONAL KALSİYUM/KALMODULİN-
BAĞIMLI PROTEİN KİNAZ 2 (CaMK-II)
DEĞİŞİMLERİNİN NÖRODEJENERASYON
SÜRECİNE ETKİSİ**

ELİF İSTİRMAN

BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970002

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β -AMİLOİD PEPTİD VARLIĞINDA
NÖRONAL KALSİYUM/KALMODULİN-
BAĞIMLI PROTEİN KİNAZ 2 (CaMK-II)
DEĞİŞİMLERİNİN NÖRODEJENERASYON
SÜRECİNE ETKİSİ**

**BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ELİF İSTİRMAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Pınar AKAN

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2019.KB.SAG.048 kodu ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-201697000

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Elif Iştirman, ' **β -AMİLOİD PEPTİD VARLIĞINDA NÖRONAL KALSİYUM/KALMODULİN-BAĞIMLI PROTEİN KİNAZ 2 (CaMK-II) DEĞİŞİMLERİNİN NÖRODEJENERASYON SÜRECİNE ETKİSİ**' konulu Yüksek Lisans tezini 23/01/2020 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Pınar AKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Sezer UYSAL

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

ÜYE

Prof. Dr. Fatma TANELİ

Celal Bayar Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

ÜYE

Prof. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

ÜYE

Doç. Dr. Nilgün YENER

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Cevval ULMAN

Celal Bayar Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Alzheimer Hastalığı	6
2.1.1. <i>Beta Amiloid (Aβ) Peptid</i>	7
2.2. Kalsiyum Sinyalizasyonu	7
2.2.1. <i>Beyinde Kalsiyum Sinyal İletimi</i>	8
2.3. Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMK-II)	9
2.3.1. <i>CaMK-II ve Alzheimer ilişkisi</i>	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Araştırmanın Tipi	12
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	12
3.3. Araştırma Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	12
3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali	12
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	12
3.6. Veri Toplama Araçları	12
3.6.1. <i>Hücre Kültürü</i>	14
3.6.2. <i>Aβ Peptid Uygulaması</i>	15
3.6.3. <i>KN93 İnhibitör Uygulanması</i>	16

3.6.4. Aβ Peptid ve KN93 İnhibitör Uygulaması	16
3.6.6.Hücre Canlılık Testleri	17
3.6.7.Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR veya qPZR)	19
3.6.8. BCA Protein Tayini	19
3.6.9. İmmünfloresan Boyama	20
3.6.10. CaMK-II beta düzeyinin belirlenmesi.....	21
3.6.11. Hücre Kültür Ortamı Ca ⁺² Seviyelerinin Ölçümü.....	22
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	24
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	24
3.10. Etik Kurul Onayı.....	24
4. BULGULAR	25
4.1. Aβ Peptid Toksikite Modeli	25
4.2. Aβ Peptid Toksikite Modelinde KN93 ve Ca ⁺² Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	26
4.2.1. MTT Sonuçları	26
4.2.2. LDH Düzeyine Göre Sitotoksikite Sonuçları	27
4.3. CaMK-II İzoformlarının RT-qPZR İle Değerlendirilmesi.....	29
4.4. İmmünfloresan Boyama İle Hücre İzoformu Varlığının Değerlendirilmesi.....	34
4.5. ELISA İle CaMK-II Beta Miktarlarının Değerlendirilmesi.....	38
4.6. Hücre Kültür Ortamındaki Ca ⁺² Seviyelerinin Değişimi.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR.....	45
8. EKLER	48
8.1. Ek-1 Etik Kurul Onayı	48
8.2. Ek-2 Özgeçmiş.....	50

8.3. Ek-3 Çalışma İzni.....	52
-----------------------------	----



TABLO DİZİNİ

Tablo 1 : Çalışmada kullanılan cihazlar	13
Tablo 2 : Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	14
Tablo 3: Oluşturulan deney grupları ve yapılan uygulamalar	16



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Tetrazolyum halkasından formazan ürün oluşumu.....	17
Şekil 2: LDH Kalibrasyon Eğrisi	18
Şekil 3: BSA standart eğri grafiği	20
Şekil 4: ELISA Standart Grafiği	22
Şekil 5: SH-SY5Y hücrelerinde agregate A β fragmanlarının 72. saatin sonunda hücre canlılığına etkisi. (Sonuçlar dokuz çalışmanın ortalaması \pm SD olarak verilmiştir. * Kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark, n=9)	25
Şekil 6: SH-SY5Y'lerde 72 saat A β , A β + KN93 ve sadece KN93 uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi (* Kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark, n=3).....	26
Şekil 7: SH-SY5Y'lerde Ca ⁺² ve KN93 + Ca ⁺² uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi (* Kontrol grubuna göre, ** Ca ⁺² uygulamasına göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark, n=3)	27
Şekil 8: A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında LDH aktivite sonuçları (* Kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark, n=3)	27
Şekil 9: KN93, Ca ⁺² ve Ca ⁺² + KN93 gruplarına ait LDH aktivite değerleri	28
Şekil 10 A/B: CaMK-II alfa izoformu gen ekspresyon değişimleri..	29
Şekil 11 A/B: CaMK-II beta izoformu gen ekspresyon değişimleri.....	30
Şekil 12 A/B: CaMK-II gama izoformu gen ekspresyon değişimleri.....	31
Şekil 13: CaMK-II delta izoformu gen ekspresyon değişimleri.	32
Şekil 14: A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında CaMK-II izoformlarına ait gen ekspresyon değişimleri	33
Şekil 15: Ca ⁺² ve Ca ⁺² + KN93 gruplarında CaMK-II izoformlarına ait gen ekspresyon değişimleri	33
Şekil 16: A β uygulaması sonrası CaMK-II izoformlarına ait gen ekspresyon değişimleri	34
Şekil 17: Kontrol grubuna ait immünfloresan görüntüleri. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.....	35
Şekil 18: 24 saat A β uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.....	35
Şekil 19: 24 saat A β + KN93 uygulaması yapılan gruba ait DAPI görüntüsü.....	36
Şekil 20: Sadece Ca ⁺² uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.....	36

Şekil 21: Ca ⁺² + KN93 uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.....	37
Şekil 22: 24 saat KN93 uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.....	37
Şekil 23 A./B: A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında CaMK-II beta izoformu değişimleri / KN93, Ca ⁺² ve Ca ⁺² + KN93 gruplarında CaMK-II beta izoformu değişimleri	38
Şekil 24: Deney gruplarında belirlenen hücre kültür ortamı Ca ⁺² miktarları	39



KISALTMALAR

ATP: Adenozin Trifosfat

AH: Alzheimer Hastalığı

A β : Amiloid Beta Peptid

AMPAR: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolproprionik asit reseptörü

APP: Amiloid Prekürsör Protein

Bim: Bcl-2-interacting Mediator of Cell Death

BSA: Bovin Serum Albumin

Ca⁺²: Kalsiyum

CaMK-II: Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2

CaM: Kalmodulin

cDNA: Komplementer DNA

DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DMSO: Dimetil sülfoksit

E-UDP: Erken-Uzun Dönem Potensiyasyon

ELISA: Enzim İşaretle İmmünosorbent Analiz

FBS: Fetal Bovin Serum

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

G-UDP: Geç-Uzun Dönem Potensiyasyon

mRNA: mesajcı RNA

NFY: Nörofibriler Yumaklar

NMDAR: N-metil-D-aspartat Reseptörü

PBS: Fosfat Tamponlu Fizyolojik Solüsyon

sAPP: Çözünür (Solubl) Amiloid Prekürsör Protein

SP: Senil Plaklar

UDD: Uzun Dönem Depresyon

UDP: Uzun Dönem Potensiyasyon

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgisini, deneyimini ve sabrını benden esirgemeyen, desteğini sadece bilimsel anlamda sınırlı bırakmayıp her konuda beni destekleyen, sevgisini ve enerjisini her daim hissettiğim sevgili danışman hocam Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Eğitimim boyunca bilgi birikimleri ve deneyimlerinden yararlanmak şansına eriştiğim değerli Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Bu zorlu dönemi atlatmamda yardımcı olan, deneyimlerinin yanında benimle sevgilerini de paylaşmış olan yüksek lisans ve doktora eğitimindeki sevgili arkadaşlarıma,

Her zaman arkamda olduklarını bildiğim, bana sonsuz sevgi, güven ve destek veren sevgili annem Müzeyyen ISTIRMAN'a, babam Şeref ISTIRMAN'a ve canım kardeşim Elçin ARSLAN'a,

Çalışmamıza destek veren Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürlerimi en içten şekilde sunuyorum.

Elif ISTIRMAN

**β -AMİLOİD PEPTİD VARLIĞINDA NÖRONAL KALSİYUM/KALMODULİN-
BAĞIMLI PROTEİN KİNAZ 2 (CaMK-II) DEĞİŞİMLERİNİN
NÖRODEJENERASYON SÜRECİNE ETKİSİ**

Elif Iştirman

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı, 35340 İnciraltı, İzmir**

ÖZET

Demansın en yaygın şekli olarak karşımıza çıkan Alzheimer hastalığı (AH) bilişsel fonksiyon azalmasının görüldüğü ilerleyici bir nörodejenerasyon durumudur. Hafızanın oluşturulmasında CaMK-II kilit bir enzim olup hem geçmiş hem de şimdiki hücrel aktiviteyi temsil eden "sürekli" bir kalsiyum sinyallemesinin dinamik doğasına özgü, geçici bilgileri entegre ettiği ileri sürülmektedir. Ancak, dört izoformu olan CaMK-II enzim sinyalinin yokluğunda veya değişiminde hücrel aktivite/fizyolojinin nasıl etkilendiği henüz net olarak tanımlanamamıştır. Bu tez projesinde, in vitro Alzheimer modeli oluşturularak, ekstraselüler A β 1-42 varlığının, nöronal CaMK-II izoform değişimleri ve hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

SH-SY5Y hücrelerine, önceden agrege edilmiş A β 1-42 peptidi 72 saat süresince uygulandı. CaMK-II enzim inhibitörü KN93 varlığı ve yokluğunda MTT ve LDH testi ile hücre canlılığı ve hücre kültür ortamındaki kalsiyum düzeyi fotometrik olarak değerlendirildi. CaMK-II enzimi alfa, beta, gama ve delta izoformlarının m-RNA ekspresyon değişimleri RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Hücrel beta ve alfa izoformlarının değişimi ELISA yöntemi ve immünfloresan mikroskopi ile değerlendirildi. 10 μ M A β 1-42 uygulaması hücre canlılığını %50 oranında azaltırken LDH salınımını benzer oranda arttırdı ($p < 0,05$). KN93 uygulaması ise A β 1-42 toksisitesine karşı koruyucu etki göstermedi. A β 1-42 uygulamasının, CaMK-II enzimi mRNA ekspresyonlarını kontrol grubuna göre belirgin azalttığı ($p < 0,05$), alfa izoformunun hücrel birikimine neden olduğu belirlendi.

Bu tez çalışması ile literatür taramamıza göre ilk kez, Alzheimer hastalığının temel patolojik bulgularından olan amiloid plakları oluşturan A β peptidlerin toksik konsantrasyonlarda CaMK-II enziminin izoformlarının ifadesini ve düzeyini değiştirebildiği gösterildi. Nöronal

CaMK-II enzim izoform değişimlerinin hücre sağ kalımında kritik bir basamak olduğu ve hücrenin kendisini koruması için tetiklendiği düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: Amiloid beta, CaMK-II, nöronal hücre ölümü, CaMK-II izoformları



**EFFECTS OF NEURONAL CALCIUM/ CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN
KINASE 2 (CAMK-II) CHANGES ON THE NEURODEGENERATION PROCESS IN
THE PRESENCE OF β -AMILOID PEPTIDE**

Elif Iştirman

Dokuz Eylül University Health Science Institute

Biochemistry Department, 35340 Inciraltı, Izmir

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), which is the most common form of dementia, is a progressive neurodegeneration condition in which cognitive dysfunction is observed. CaMK-II is a key enzyme in the creation of memory, and it is claimed to integrate temporary information specific to the dynamic nature of a "continuous" calcium signaling representing both past and present cellular activity. However, how the cellular activity / physiology was affected in the absence or exchange of the CaMK-II enzyme signal with its four isoforms has not yet been clearly defined.

In this thesis, it was aimed to evaluate the effect of extracellular A β 1-42 presence on neuronal CaMK-II isoform changes and cell viability by creating an in vitro Alzheimer model. The pre-aggregated A β 1-42 peptide was applied to SH-SY5Y cells for 72 hours. In the presence and absence of CaMK-II enzyme inhibitor KN93, cell viability and calcium level in the cell culture medium were evaluated photometrically by MTT and LDH test. The m-RNA expression changes of CaMK-II enzyme alpha, beta, gamma and delta isoforms were determined using RT-PCR method. The changes of cellular beta and alpha isoforms were evaluated by ELISA method and immunofluorescence microscopy. Application of 10 μ M A β 1-42 decreased cell viability by 50% while increasing LDH release similarly (p <0.05). KN93 application did not have a protective effect against A β 1-42 toxicity. Application of A β 1-42 was found to significantly reduce CaMK-II enzyme mRNA expressions compared to the control group (p <0.05), causing alpha cellular accumulation of alpha isoform.

According to our literature review, for the first time, it was shown that A β peptides can change the expression and level of isoforms of the enzyme CaMK-II at toxic concentrations. It can be thought that neuronal CaMK-II enzyme isoform changes are a critical step in cell survival and triggered to protect the cell itself.

Keywords: Amyloid beta, CaMK-II, neuronal cell death, CaMK-II isoforms

1. GİRİŞ VE AMAC

Ortalama yaşam süresi, artan yaşam kalitesi ve sağlık bakım başarısına bağlı olarak uzamaktadır. Dünya üzerinde daha fazla yaşlı nüfus bulunması, demansiyel hastalıkların görülme sıklığını ve bu hastalıklara karşı olan farkındalığı arttırmıştır.

Alzheimer Hastalığı (AH), genel bilişsel fonksiyon azalmasının görüldüğü ilerleyici bir nörodejenerasyon durumu olup demansın en yaygın şekli olarak karşımıza çıkmaktadır. Alzheimer patofizyolojisi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış olmasına karşın, henüz net bir sonuç ve buna bağlı olarak etkin bir tedavi ortaya konulabilmiş değildir.

Öğrenme/hafıza ilişkili hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi, öğrenme ve hafıza mekanizmalarını ve bu mekanizmalarda görev alan molekülleri incelemeyi gerektirmektedir. Son yıllarda protein kinazlar hakkında yapılan çalışmalar, bu enzimlerin hafıza oluşumu, sağlamlaştırılması veya silinmesindeki rollerini ortaya çıkarmış ve onları ilgi çekici bir araştırma konusu haline getirmiştir.

Öğrenme ve hafızanın temelini oluşturan nöroplastisite proseslerinde protein kinazlar karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan biri olan kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz 2 (CaMK-II) kritik bir öneme sahiptir. Bellek oluşturulmasında esansiyel olan CaMK-II ve alt akımında bulunan diğer kinazlar (Kalsiyum/kalmodulin kinaz kaskadı, ERK1/2, PKA, PKG, PI3K yolağı) öğrenme ve hafıza sağlamlaştırılması sürecinde rol alırlar.

Dört farklı izoforma (α , β , γ ve δ) sahip CaMK-II'nin α izoformunun, sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda esansiyel olduğu knock-in fareler üzerinde gerçekleştirilen incelemeler ile gösterilmiştir. CaMK-II'nin, Ras GTPaz'ın aktif ve inaktif formları üzerine etkili olduğunu gösteren araştırmaların olması, CaMK-II'nin ERK sinyal yolağı üzerinden hücre proliferasyonu, differansiyasyonu ve apoptozu regülasyonunda etkisini düşündürmüştür.

Total CaMK-II seviyesinin incelendiği, AH modellemede kullanılan Tg2576 fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada çıkan sonuçlar; total CaMK-II seviyesinde bir değişiklik olmadığını fakat aktivitede bir azalmanın olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar seçimli bir kayıp olduğuna işaret etmektedir. Amiloid beta ($A\beta$) toksisitesine maruz bırakılan primer kültürlerde ise CaMK-II aktivasyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Ancak hücre canlılığı üzerine, CaMK-II aktivite ve izoform değişimlerinin etkileri ve/veya bu etkilerin oluşum mekanizması henüz net olarak tanımlanmamıştır.

“A β toksisitesi altında artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, eş zamanlı olarak kalsiyum/kalmodulin bağımlı kinaz aktivasyonunu değiştirebilir ve CaMK-II aktivasyon değişimleri, hücre canlılığını Ras ve/veya ERK sinyal yolağı üzerinden etkileyebilir.“ hipotezinden yola çıkılarak gerçekleştirilen bu çalışma ile, literatür taramamıza göre ilk kez, CaMK-II enzim düzeyi ve izoformlarının nöronal hücre canlılığı ile ilişkisi, SH-SY5Y hücreleri üzerinde oluşturulan in vitro Alzheimer modelinde gösterilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AH), seçici bilişsel işlevlerin -özellikle belleğe bağlı olanlar- ilerleyici kaybı ile karakterizedir [1]. Yaşa bağlı demansın en yaygın biçimi olarak karşımıza çıkan AH, Dünya çapında 24 milyon insanı etkilemektedir ve bu sayının 2050 yılına kadar dört katına çıkacağı tahmin edilmektedir [2].

AH vakalarının büyük çoğunluğu (>% 95) sporadiktir. İleri yaşla beraber apolipoprotein E4 (ApoE4) polimorfizmi, hipertansiyon, kalp hastalığı ve diyabet, AH gelişiminde ana risk faktörlerini oluşturur [3]. Hastalık mikroskopik düzeyde, β -amiloid peptitten (A β) şekillenen senil plaklar (SP) ve hiperfosforile tau kaynaklı nörofibriler yumaklar (NFY) ile karakterizedir [4]. Dejenerasyon sürecinde hasta beyinleri, sinaptik kayıp, bozulmuş nörotransmisyon ve azalmış metabolizmayı içeren bir takım morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere uğrar. Gerçekleşen bu değişikliklerin hepsi nöronal ölüme katkıda bulunur [3].

SP'ler ve NFY'leri "pozitif", sinaptik kayıp ve sonrasında neden olduğu nöronal kaybı "negatif" lezyonlar olarak tanımlayacak olursak; pozitif lezyonlar post mortem incelemeler sırasında yararlı tanısal belirteçler olsalar da bilişsel düşüş ilerlemesi, negatif lezyonlarla daha koreledir. Hafif kognitif bozukluk ile erken-hafif AH arasında değişen semptomlara sahip hastalar üzerinde yapılan çalışmalar, hasta beyinlerindeki sinaptik tomurcukların ve diğer sinaptik elementlerin kaybolduğunu göstermiştir [1]. Hafıza oluşumu ve depolanması süreçlerinde öneme sahip olan bu özelliklerin en belirgin kayıplarını hipokampal ve kortikal bölgeler göstermektedir. AH'da sinaptik disfonksiyonun ortaya çıkma mekanizması tam manasıyla bilinmemekle beraber A β oligomerlerinin, sinaptik bölgelere doğrudan bağlanma yoluyla uzun dönem potensiyasyonu azalttığı (UDP) [5][6] ve uzun dönem depresyon oluşumunu (UDD) kolaylaştırdığı [7] yapılan in vitro çalışmalarca gösterilmiştir.

Hastalığın multifaktöriyel olması, AH patogenezinin tam olarak açıklanmasını güçleştirmektedir. Nedensel faktörlerden yola çıkılarak ortaya amiloid kaskad, tau, kolinerjik ve inflamasyon hipotezi gibi çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Fakat yapılan patolojik

çalışmalarda A β 'nin olmazsa olmaz bir bulgu olması, *amiloid kaskad hipotezini* AH patogenezi için dominant model haline getirmiştir.

2.1.1. Beta Amiloid (A β) Peptid

Amiloid kaskad hipotezi, amiloid prekürsör proteinin (APP) metabolizma ürünü olan A β 'nin anormal üretim ve/veya klirens sonucu birikiminin, AH patolojisi ile sonuçlanacak bir dizi olaya neden olabileceğini önermektedir.

APP bir transmembran glikoprotein olup sentezi birçok hücre tarafından gerçekleştirilir. Çeşitli izoformlarından olan APP695, APP751 ve APP770 üç majör izoformdur ve sırası ile 695, 751 ve 770 amino asit içerirler. APP metabolizasyonu iki yolla gerçekleşmektedir: *amiloidojenik* ve *amiloidojenik olmayan* yolak. Amiloidojenik olmayan yolakta, APP ilk olarak α -sekretaz, sonrasında γ -sekretazca proteolitik işleme uğrar. APP metabolizmasının α -sekretazca yıkım yolağı çoğu hücrede yaygın olan yolaktır.

Amiloidojenik yolakta ise APP ilk olarak β -sekretaz tarafından kesime uğrar. Bu yıkımın ürünleri olarak sAPP β (Soluble/Çözünür APP- β) ve β -C-terminal fragmanı salınır. Akabinde sAPP β 'nin γ -sekretaz kompleksince yıkımı neticesinde de 39 ila 43 amino asit içeren A β fragmanları oluşur. A β fragmanları -özellikle A β -42 izoformu- nörodejenerasyon sürecinde oksiradikallerin oluşumu, hücre membranı lipidik disregülasyonu sonucunda kalsiyum hemostazının bozulması gibi sitotoksik etkiye sahiptirler. Bu fragmanlar devamında AH'nı histopatolojik olarak karakterize eden çözünmez yapıları yani SP'ları oluştururlar [2]. Bunun yanında APP'nin, η -sekretazca proteolizi sonucu oluşan amiloid- η ürünlerinin de AH patolojisine katkısı olabileceğini gösteren yeni sonuçlar mevcuttur [8].

2.2. Kalsiyum Sinyalizasyonu

Kalsiyum (Ca⁺²), hücrenel yaşamın neredeyse her yönünü etkilemektedir. Çoğu intraselüler ve ekstraselüler süreçte -sağkalım, apoptoz, differansiyasyon, proliferasyon, büyüme, transkripsiyon- anahtar iyon olarak yer alır. Yapılan çalışmalar, Ca⁺² sinyal düzensizliğinin kalp hastalığı, şizofreni, bipolar bozukluk ve AH gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. Beyinde Ca⁺²'un, sinaptik aktivite ve hafıza oluşumu kontrolünde

elzem olması, hücresel (Ca^{+2}) homeostazının, AH'nin hem sporadik hem de ailesel formlarında bozulduğuna ve A β oluşumunu ve tau hiperfosforilasyonunu teşvik edebileceğine ilişkin önemli kanıtlar bulunması AH patolojisinin anlaşılmasında Ca^{+2} sinyali alt akım moleküllerinin araştırılmasını gerekli kılmıştır.

2.2.1. Beyinde Kalsiyum Sinyal İletimi

Beyin fonksiyonları, postsinaptik nöronlarda bir dizi biyokimyasal sinyal olayını indükleyen nörotransmitterlerin salınması yolu ile spesifik sinapslarda kendini gösterir. Bu sinyallerden en belirgin olanı ise Ca^{+2} seviyelerindeki hızlı ve geçici artıştır. Ca^{+2} konsantrasyonundaki ($[Ca^{+2}]$) artış, sinapslarda kısa ve uzun süreli olmak üzere çeşitli değişikliklere sebep olur. Sinapslardaki lokal değişikliklerin yanında postsinaptik nöronlarda $[Ca^{+2}]$ artması, dendrik gelişim, nöronal sağkalım ve sinaptik plastisite için gerekli olan kaskadları aktive eder [9].

Dinlenme durumunda, nöronlarda serbest sitosolik $[Ca^{+2}]$ 200 nM civarında iken elektriksel veya reseptör-aracılı stimülasyon üzerine hücre içi $[Ca^{+2}]$ düşük mikromolar konsantrasyonlara yükselir. Uyarı sonrası intraselüler $[Ca^{+2}]$ hücre dışı Ca^{+2} akışı ve hücre depolarından $[Ca^{+2}]$ salınım mekanizması ile arttırılır. Hücre dışı $[Ca^{+2}]$, hücre içine oranla daha yüksektir. Böylece ligand-kapılı iyon kanalları (glutamat ve asetilkolin gibi) ve voltaj-kapılı Ca^{+2} kanallarının açılması ile hücre içine Ca^{+2} akışı gerçekleşir. Hücre içi ana Ca^{+2} deposu endoplazmik retikulum (ER) olup hücre içine Ca^{+2} salınımı, inositol 1,4,5-trifosfat (InsP3R) ve ryanodin (RyR) reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla gerçekleştirilir. Bazal Ca^{+2} seviyeleri, güçlü kalsiyum-bağlayan ve kalsiyum-tamponlama proteinleri ya da ER membranında bulunan Sarko/ER kalsiyum-ATPaz (SERCA) aracılı korunur [9].

2.2.1.1. Öğrenme ve Hafızada Kalsiyum Sinyali

Öğrenme ve hafızaya nöronal plastisite aracılık etmektedir. Nöronal plastisite, sinaptik plastisiteyi, sinaptogenez, içsel uyarılabilirliğin modülasyonunu ve nörogenez içerir.

Sinaptik plastisitenin, beyinde bilginin işlenmesi ile öğrenme ve hafıza temeli oluşturmada önemli olduğu düşünülmektedir. Sinaptik plastisite için yaygın olarak incelenen

modeller UDP ve UDD'dur. UDP, sinapsların aktiviteye bağılı olarak güçlendirilmesidir ve üç geçici faza ayrılır. Bunlardan ilki kısa dönem potensiyasyon (KDP)'dur ve sinaptik iletimin, - sinaptik vezikül salınım artışı sonucunda- geçici olarak arttırıldığı süreçtir. Protein kinaz ve sentezinden bağımsız olması ile karakterize edilir. Bir sonraki faz erken-uzun dönem potensiyasyon (E-UDP) olup çeşitli protein kinazların aktivasyonu ve post sinaptik membrana glutamat reseptörlerinin yerleştirilmesi ile ifade edilir. Hipokampus CA1 bölgesi majör model sistem olup LTP üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki; glutamat bağlanması ve postsinaptik depolarizasyon sonucu N-metil-D-aspartat reseptör (NMDAR) kanalları açılır ve hücre içine Ca^{+2} akışı gerçekleşir. Ca^{+2} -bağlayıcı protein kalmodulin, hafıza oluşumunda rol alan molekülleri aktive eder. Aktive edilen moleküllerden biri olan kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz 2 (CaMK-II), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolproprionik asit reseptörünü (AMPA) fosforile eder. Bu fosforilasyon iletkenliği arttırır ve sinaptik etkinlikte kısa vadeli bir artış yaratır. Üçüncü faz geç-uzun dönem potensiyasyon (G-UDP)'dur ve birkaç saatten birkaç güne kadar sürebilir. Uzun dönem hafıza ile ilişkilendirilir. G-UDP için kritik biyokimyasal özellik, yeni gen ekspresyonu ve protein sentezinin gerekliliğidir [9].

Tüm UDP tiplerinin indüksiyonu için gerekli olan olay, postsinaptik diken içine Ca^{+2} akışı olarak görülmektedir ve hafıza devamlılığının, hücre içine Ca^{+2} giriş süresi tarafından belirlendiği düşünülmektedir. Kısa süreli bir Ca^{+2} akışı yalnızca kısa süreli bellek oluşumunda rol alan enzimleri aktive ederken, daha kalıcı bir Ca^{+2} akışı tarafından aktivasyonu sağlanan enzimler uzun süreli bellek depolamayı başlatabilir.

2.3. Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMK-II)

CaMK-II, kalsiyum/kalmodulin bağımlı kinaz ailesi içinde yer alan bir serin/treonin kinaz olup öğrenme ve hafıza oluşumu için önemlidir. Hafızanın oluşturulmasında; CaMK-II aktivitesinin arttığı, blokajının ise mekanizmanın bozulmasına sebep olduğu gösterilmiştir [10]–[15]. Öğrenme ve hafızanın yanında, CaMK-II'nin hücre canlılığı üzerine de etkili olabileceğini düşündüren bir takım sonuçlar mevcuttur. Ortaya çıkarılan p135 SynGAP-CaMK-II etkileşimi bunun temelini oluşturmaktadır. ERK aktivasyonu çeşitli yollar aracılı gerçekleşir. Bunlardan biri de Ras-aracılı aktivasyondur. Ras bir GTPaz olup aktivasyonu GEF, inaktivasyonu GAP adı verilen proteinlerce sağlanır. Glutaminerjik sinapslarda bol

bulunan p135 SynGAP'ın CaMK-II tarafından geçici olarak inhibe edildiği gösterilmesi, CaMK-II ve hücre canlılığı ilişkisi üzerine önemli bir fikir sunmuştur [9].

Dodekamerik bir holoenzim olan CaMK-II, “ α , β , γ ve δ ” alt birimlerinden oluşur. Bu altbirimlerden α - ve β -'nin nöronlardaki ekspresyonları, diğer altbirimlere oranla 3-4 kat daha fazla olup bu altbirimler homo- ya da heteromerik holoenzim oluşturabilir. Predominant izoformlar olan α - ve β -CaMK-II'nin fonksiyonları ise birbirinden farklıdır. β -CaMK-II'nin sinaptik plastisite ve hafıza mekanizmalarında üstlendiği görev enzimatik aktivitesinden daha çok yapısaldır. F-aktine bağlanarak sinapslardaki morfolojik değişiklikleri düzenler. Aynı zamanda enzimin sinaptik dikene translokasyonunu sağlar. α -CaMK-II aktivitesi ise hipokampus-bağımlı hafıza için temel rol oynar. Yapılan çalışmalar hafıza oluşumu sırasında CaMK-II aktivitesinin arttığını; α -CaMK-II gen delesyonunun bozulmuş uzamsal hafızaya sebep olduğunu göstermiştir [1].

CaMK-II holoenzimleri Ca^{+2}/CaM bağlanması yanında, sinapslarda bulunan NMDA reseptörleri ve L-tip voltaj duyarlı kalsiyum kanallarınca (VGCC) da aktive edilebilir. İzomerlerden α -CaMK-II ise aktivitesi yönünden önemli bir özelliğe sahiptir. Enzim, treonin-286 artığı üzerinden otofosforilasyona uğrayabilir. Bu otofosforilasyon, altbirimler arasındaki bir etkileşim sonucu oluşur ve enzim aktivitesini Ca^{+2}/CaM -bağımlıdan bağımsızla çevirir ve α -CaMK-II'nin bir hafıza molekülü olarak davranmasını sağlar. Bununla tutarlı olarak, T286-eksikliği bulunan knock-in fareler üzerinde yapılan çalışmalar, otofosforilasyonun, hipokampal CA1 sinapslarında NMDAR-bağımlı G-UDP için temel olarak önemli olduğunu göstermiştir [1].

α - ve β -CaMK-II'nin aksine gama (γ) izoformu, 25 yıl önceki keşfinden bu yana sinirbilim araştırmalarının hedefi olarak az ilgi görmüştür. Olgun memeli beyinde zengin miktarda bulunmasının yanında kalp, düz kas ve karaciğerde de yüksek ekspresyona sahiptir. Bununla birlikte beyinde γ -CaMK-II'nin önemi, CAMK2G'deki varyasyonların sağlıksız bellek performansı ve mental retardasyon ile ilişkili bulunduğu genetik çalışmalardan anlaşılabilir. Çok sayıda kanıt, L-tip voltaj duyarlı kalsiyum kanalları yakınında bulunan Ca/CaM 'nin, gen ekspresyonunun düzenlenmesi amacı ile γ -CaMK-II tarafından çekirdeğe taşındığını göstermiştir [16]. İzofom deltanın (δ) sağladığı katkı, izofom değişimleri, önemi hakkında ise literatürde henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır.

2.3.1. CaMK-II ve Alzheimer ilişkisi

Öğrenme ve hafıza mekanizmalarında bu kadar önemli bir role sahip olduğu anlaşılan CaMK-II, AH patogenezinin anlaşılması ve etkin bir tedavinin geliştirilebilmesi açısından önemli bir aday olmuştur. Bu amaçla hasta bireylerin beyinleri üzerinde post mortem incelemeler yapılmış; in vitro veya hayvanlar üzerinde AH modelleri oluşturulmuştur. Post mortem doku ile yapılan yarı kantitatif western blot uygulamaları α -CaMK-II protein ekspresyon düzeyinin, AH'nin şiddetli evrelerinde hipokampus, frontal korteks ve diğer kortikal alanlarda değişmediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, yapılan immünohistokimyasal analizler eksitator sinapsların, hipokampal alan CA1'de seçimli olarak yitirildiğini göstermiştir. Erken dönem western blot analizleri, şiddetli AH beyni hipokampus ve frontal korteksinde α -CaMK-II T286 otofosforilasyonunun azaldığını göstermiştir.

Post mortem analizlerde olduğu gibi AH modelleri üzerine yapılan çalışmalar da CaMK-II düzenlenmesinde anormallikler olduğunu göstermektedir. En yaygın kullanılan AH modellerinden biri APPSwe mutasyonunu taşıyan Tg2576 faresidir. Bu farelerin frontal kortekslerinde, total α / β -CaMK-II seviyeleri değişiklik göstermezken; hücre içi dağılımda sinapstan sitosole anlamlı bir değişiklik mevcuttur. Bu değişiklik aktif α -CaMK-II seviyelerinde görülmekte olup sinaptik kayba bağlı değildir. Bu durum selektif CaMK-II kaybına işaret etmektedir. Yaygın olarak kullanılan başka bir fare modeli hem APP hem de presenilin-1 mutasyonlarını içerir. Bu fareler üzerinde yapılan çalışmalar, p(T286)- α -CaMK-II'nin hipokampal ekspresyonunun değiştiğini ve CaM miktarının arttığını göstermiştir. A β oligomeri ile muamele edilen primer nöron kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar, α -CaMK-II aktivasyonunda bozulmalar olduğunu göstermiştir [1]. Amiloid beta varlığının hipokampal LTP sırasında CaMK-II otofosforilasyonunu ve AMPA reseptör aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir [17].

CaMK-II ve nöronal hücre ölümü ilişkisi hakkında kompleks ve çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Yapılan bir primer kültür çalışması, A β toksisitesine karşı CaMK-II enziminin spesifik olarak inhibe edilmesinin kısmi bir nöroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermiştir [18]. Diğer taraftan Zhao ve arkadaşları, 2016 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada [19] ise CaMK-II'nin önemli bir proapoptotik protein olan Bim'in (Bcl-2-interacting mediator of cell death) transkripsiyonel ifadesini bastırdığını ileri sürmüşlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel nitelikte in vitro bir çalışmadır.

3.2.Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Deneyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Haziran 2019-2020 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3.Araştırma Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları

Çalışmamızda ticari olarak satın alınmış olan insan kaynaklı nöronal hücre kültür hattı (SH-SY5Y) kullanılarak A β toksisitesi deney modeli oluşturuldu.

Oluşturulan deney koşulu kendi içinde üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 kez olmak üzere tekrarlanarak n=9 olacak şekilde teyit edildi.

3.4.Araştırmanın Çalışma Materyali

Çalışmamızda nöroblastoma hastasının kemik iliği biyopsisinden elde edilen SK-N-SH hücre hattının bir alt klonu olan SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır.

3.5.Araştırmanın Değişkenleri

Bu araştırmanın değişkenleri:

- CaMK-II enzim seviyeleri, hücre canlılık yüzdeleri (bağımlı değişken)
- A β uygulaması (bağımsız değişken)

3.6.Veri Toplama Araçları

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve kimyasal malzemeler Tablo 1 ve 2'de listelenmiştir.

Tablo 1 :Çalışmada kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	MODEL- KOD
Laminer-air flow	Holten Lamin Air Biosafe 1.2
Karbondioksit inkübatörü	Nuaire Us Autoflow NU-4750
Ters-faz ışık mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Santrifüj	Eppendorf 5810 R
Akış Sitometre	Beckman Coulter –Epics XL.MCL
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Forma Model 705
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik 2031
Azot tankı	MVE Cryogenics cryosystem 4000
Plak okuyucu	BioTek ELX 800
Buz makinası	Scotsman AF-100
Otoklav	Hirayama HICLAVE HV-50
Etüv	Thermo Heraeus
Sonikatör	Sonic Materials
pH metre	Orion, USA Model 420
Hassas terazi	Precisa XB 220 A
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q ZLX55003Y
PCR cihazı	

Tablo 2 : Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

KİMYASAL MALZEME ADI	ÜRETİCİ FİRMA-KOD
Ultra saf su	Biochrom L0020
Asetik asit	Merck K24209656 728
Etanol	Riedel-de Haen 32221
Metanol	Riedel-de Haen 34860
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom S01115
Donör at serum (DHS)	Biochrom S9133
Sığır serum albumin (BSA)	Thermo 23209
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma D 5796
Poli D Lizin	Sigma P1149
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom L1815
MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)	Appllichem A2231,0001
Amiloid beta fragman 1-42	Sigma A9810
BCA Protein kiti	Pierce 23225
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma D2650
Hoechst 33342 (HO) boyası	Thermo Scientific Pierce Fluorescent Stain
Tripsin-EDTA	Biochrom L2143
Penisilin/Streptomisin	Biochrom A2210
Triton X-100	Sigma T 8787

3.6.1. Hücre Kültürü

A β toksisitesi ile ilgili hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla kullanılan, insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y hücreleri çalışmamızda kullanılmıştır. Ticari olarak eldesi

sağlanan hücreler %15 FBS, 100 µg/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren komplet DMEM/F-12 kültür ortamında %5 CO₂ varlığında ve 37°C'de inkübe edildi. Deneylere geçilmeden önce, hücrelerin %80 konfluent olması beklendi ve bu süre zarfında eski ortamlar haftada iki kez yeni kültür ortamı ile değiştirildi. %80 sıklığa ulaşan hücreler pasajlanarak 12'li/96'lı hücre kültür kaplarına kuyucuk başına sırası ile 8x10⁴ ve 1,6x10⁴ yoğunluğunda hücre bulanacak şekilde %1,7 FBS içeren DMEM/F-12 ortamıyla birlikte eklendi. Son hacimlerin sırasıyla 1 ml/ 200 µl olmasına dikkat edildi. İlk 24 saat boyunca hücrelerin plak yüzeyine tutunabilmeleri için hücreler %5 CO₂ varlığında ve 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında, oluşturulan deney gruplarına uygun olarak gerekli uygulamalar gerçekleştirildi.

3.6.2. Aβ Peptid Uygulaması

Aβ stok solüsyonu, dengeli tuz çözeltisi içeren fosfat tamponu (PBS) ve dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlandı. Stok solüsyonlar tükeninceye kadar -20°C'de saklandı. Gerekli seyreltmeler %1,7 serum içeren ortamlarla yapılmış olup uygun konsantrasyonlardaki solüsyonlar her uygulamadan önce taze olarak hazırlandı.

Aβ peptid uygulama dozu, yapılan ön deneyler sonucunda belirlendi. Kontrol grubuna göre ~%50 canlılığı azaltan konsantrasyon, toksisite uygulama dozu olarak belirlenmiş olup 10µM uygulandı. Uygulama öncesinde solüsyonlar 37°C 72 saat inkübe edilerek pre-agrege edildi ve sonrasında kültür ortamına eklendi. Hücreler, Aβ fragmanları ile 72 saat boyunca muamele edildi.

Aβ nöronal toksisite modeli oluşturulurken kullanılan DMSO'nun, hücrelere toksik etki oluşturmaması için son konsantrasyonu %1 olacak şekilde uygulandı. Ayrıca hücrelere %2, %1, %0.5, %0.25'lik DMSO uygulaması yapılarak değerlendirilen hücre canlılığı testleri sonucunda %1 ve altında DMSO uygulamasının hücre canlılığında anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi.

3.6.3. KN93 İnhibitör Uygulanması

12 ve 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve yüzeye tutundurulmuş olan hücrelere son konsantrasyonu 5 μM olacak şekilde KN93, %1,7 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM/F-12 hücre kültür ortamı uygulandı. Son hacimlerin sırası ile 1 ml / 200 μl olmasına dikkat edildi. %5 CO_2 içeren inkübatörde 37° C’de 72 saat boyunca inkübe edilmesinin ardından gerekli testler uygulandı.

3.6.4. A β Peptid ve KN93 İnhibitör Uygulanması

A β toksisitesinin yanında, inhibitör varlığında CaMK-II düzeylerini inceleyebilmek ve hücre canlılığına etkisini gözlemleyebilmek adına deney düzeneği oluşturuldu (Tablo-3). 12’li/96’lı hücre kültür kaplarına ekilen ve yüzeye tutunması sağlanan hücrelere %1,7 FBS içeren kültür ortamı ile birlikte son konsantrasyonlar 10 μM ve 5 μM olacak şekilde A β ve KN93 uygulandı. Son hacimlerin sırası ile 1 ml/ 200 μl olmasına dikkat edildi. 72 saat sonunda gerekli testlerin uygulamalarına geçildi.

Tablo 3: Oluşturulan deney grupları ve yapılan uygulamalar

Kontrol Grubu	Herhangi bir uygulama yapılmadı
Aβ Grubu	72 saat 10 μM A β uygulaması
Aβ + KN93 Grubu	72 saat 10 μM A β ve 5 μM KN93 uygulaması
KN93 Grubu	72 saat 5 μM KN93 uygulaması
Ca$^{+2}$ grubu (+ kontrol)	Son 1 saatte 1,25 μM Ca $^{+2}$ uygulaması
Ca$^{+2}$ + KN93 grubu	72 saat KN93 + son 1 saat 1 M μCa^{+2} uygulaması

3.6.5. Ca $^{+2}$ Uygulanması

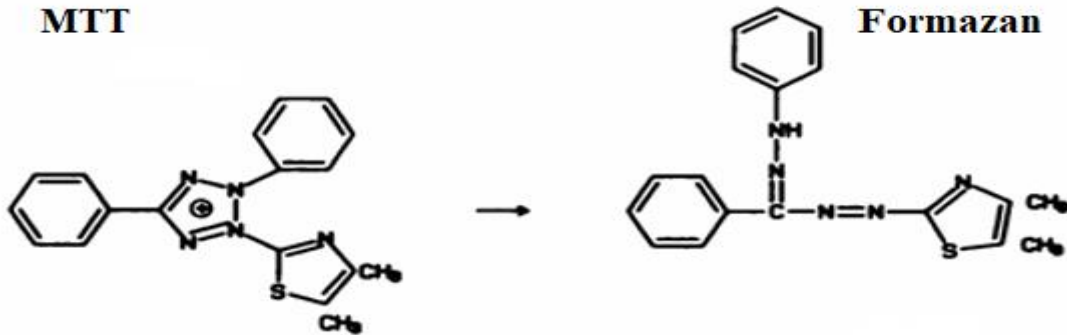
CaMK-II düzeylerini incelemek için pozitif kontrol olarak önceden belirtilen şekilde ekimi yapılmış olan hücrelere, son konsantrasyon 1,25 μM olacak şekilde CaCl $_2$ çözeltisi uygulandı. Stok 2,5 mM’lık CaCl $_2$ çözeltisinden 10 μl alınıp PBS ile son hacmi 10 ml’ye tamamlandı. Sadece Ca $^{+2}$ uygulaması yapılacak olan grubun hücre kültür ortamlarının yarı

hacimleri uzaklaştırıldı. Eldesi sağlanan 2,5 µM'lık çözeltilerden 12'li ve 96'lı hücre kültür plakları için sırasıyla 500 ve 100 µl uygulandı. KN93 + Ca⁺² uygulaması yapılacak olan grubun hücre kültür ortamlarının tamamı çekilerek 12'li hücre kültür plağı için 500'er, 96'lı hücre kültür plağı için ise 100'er µl inhibitör ve Ca⁺² çözeltilerinden eklendi. 72. saatin sonunda ise gerekli analizler gerçekleştirildi.

3.6.6.Hücre Canlılık Testleri

3.6.6.1.MTT Hücre Canlılık Testi

Daha önce belirtilen Aβ ve KN93 uygulamaları sonrasında Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide BioChemica (MTT) (AppliChem) kiti kullanılarak canlılık testi gerçekleştirildi. Bu yöntem canlı hücrelerin, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi aracılı tetrazolyum halkasını parçalaması ve sonucunda formazan kristalleri oluşturmaya dayanır (Şekil-1). Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Son hacmi 200 µl olan 96'lık plak kuyularından 110'ar µl çekildi ve kit talimatlarına uygun olarak 10 µl MTT solüsyonu eklendi. Böylece her kuyucuk için MTT son konsantrasyonu 0,5 mg/ml oldu. Plak 37°C'de %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde 3.5 saat bekletildi. 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz atıldı. Tüm kuyucuklara 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve 37°C'de 30 dakika bekletildi. 560 ve 670 nm'de absorbans ölçümleri alındı ve kontrol grubuna oranla % canlılık hesaplandı.

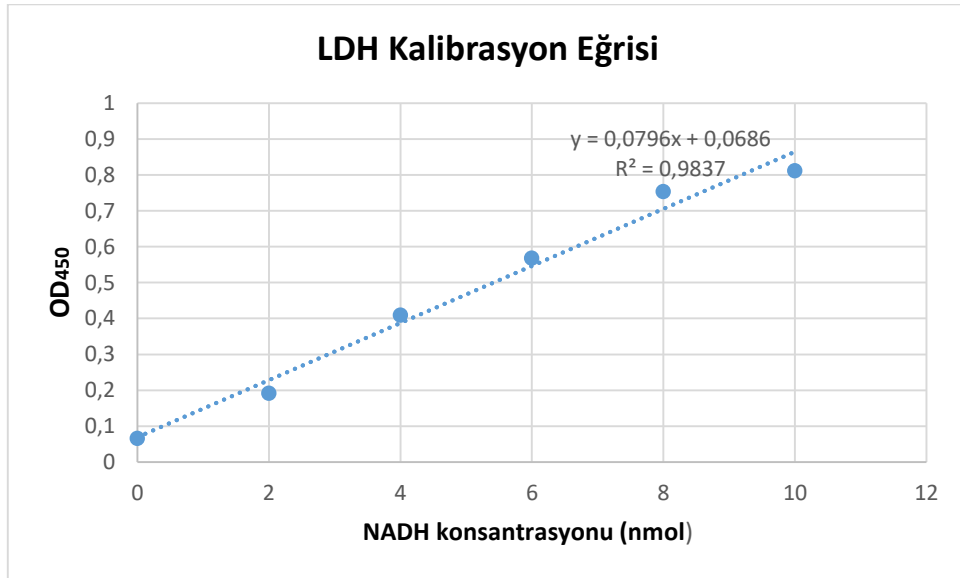


Şekil 1:Tetrazolyum halkasından formazan ürün oluşumu

3.6.6.2. Laktat Dehidrogenaz Testi

Bu yöntem bir oksidoredüktaz olan ve çok çeşitli organizmada bulunan laktat dehidrogenazın (LDH) kantifikasyonuna dayanmaktadır. Hücreler, hastalık veya hasar durumunda kan dolaşımına LDH salınımı yapar. Stabil bir enzim olan LDH'ın aktivite ölçümü hücresel hasarın belirlenmesinde kullanılır.

96'lık kültür plaklarına $1,6 \times 10^4$ hücre, son hacim 200 μ l olacak şekilde %1,7 FBS içeren komplet DMEM/F-12 ortamıyla birlikte eklendi. 72 saatlik uygulamalar sonunda Lactate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision) kullanılarak hücre canlılığı incelendi. 10,000 g'de 15 dakika santrifüj sonrasında süpernatantlar toplandı ve buz üzerinde bekletildi. 96'lık kültür plağına 50 μ l örnek eklendi. 0-2,5-5-7,5-10 ve 12,5 nmol konsantrasyonlarında standartlar son hacim 50 μ l olacak şekilde hazırlandı. Tüm örnek, standart ve pozitif kontrol kuyucuklarına 50 μ l reaksiyon karışımından eklendi. 450 nm'de ilk ölçüm alındı. Sonrasında 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 450 nm'de ikinci ölçüm alındı. Absorbans ölçüm sonuçlarına göre standart grafiği oluşturuldu. Grafik kullanılarak her örnek için, üretilen NADH miktarı hesaplandı.



Şekil 2: LDH Kalibrasyon Eğrisi

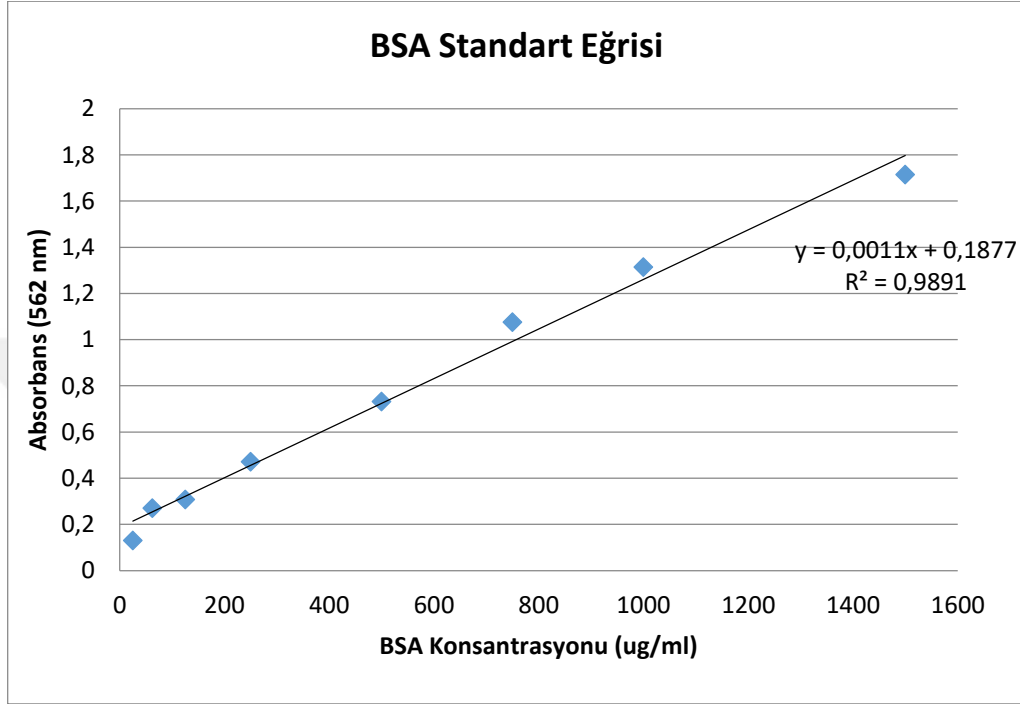
3.6.7. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR veya qPZR)

CaMK-II'nin izoformları olan α , β , γ ve δ 'nin değişimleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir. İlk olarak 8×10^4 hücre, komplet DMEM/F-12 ile birlikte son hacim 1 ml olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücreler, 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edilerek plak yüzeyine tutunmaları sağlandı. Daha önce belirtilen şekilde A β , KN93 ve Ca⁺² uygulamaları yapıldı. Uygulamaların sonunda, kuyucuklarda bulunan besi ortamı uzaklaştırıldı ve ölü hücrelerin uzaklaştırılması için PBS ile bir kez yıkama yapıldı. Hücrelerin yüzeyden kaldırılabilmesi adına, her kuyucuğa 300 μ l Tripsin-EDTA eklendi ve 3-4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültür plaklarına hafifçe vurularak hücrelerin yüzeyden tamamen kalkması sağlandı. Işık mikroskopu ile kontrolü yapıldı. Her kuyucuğa Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar yani 600 μ l kültür ortamından eklendi. Ortam/hücre karışımları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 250 g'de 5 dakika santrifüj sonunda süpernatantlar uzaklaştırıldı. GeneJet RNA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. RNA saflık ve konsantrasyonları Thermo Nanodrop 2000 cihazı yardımıyla belirlendi. High Capacity cDNA Reverse Transkription kiti (Applied Biosystems) kiti kullanılarak RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi sağlandı. qPZR kurulurken reaksiyon başına 12,5 μ l Qiagen Real Time SYBR Green Mastermix, 1,8 μ l cDNA, 0,6 μ l primer (GAPDH, CaMK-II (α , β , γ ve δ)) ve 5,1 μ l nükleaz içermeyen su kullanıldı. Tüm hazırlıklar buz üzerinde ve karanlıkta gerçekleştirildi. Rotor Gene Q cihazına PZR tüpleri (200 μ l'lik) yerleştirildi. Tm sıcaklıkları ve döngü ayarları primerlere uygun şekilde yapıldıktan sonra reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen sonuçların analizi yapıldı.

3.6.8. BCA Protein Tayini

Total protein miktarının tayini amacıyla BCA Protein Assay Kit II (BioVision) kullanılarak ölçümler yapıldı. Bu amaçla konsantrasyonu bilinen Bovin Serum Albumin (BSA) standart olarak kullanıldı. Standartlar, BSA konsantrasyonları 2000 - 1000 - 750 - 500 - 250 - 125 - 25 ve 0 μ g/ml olacak şekilde seri dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Her bir standart ve örnekten, 96'li plağa kuyucuk başına 25 μ l olacak şekilde eklendi. Sonrasında 200 μ l BCA kiti solüsyon karışımından eklendi ve karıştırıldı. Plak ışıktan korunması adına

örtüldü ve 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 562 nm’de absorbanans ölçümü alındı. Elde edilen absorbanans değerleri kullanılarak standart grafiği oluşturuldu ve eğim formülü kullanılarak örneklerin protein miktarları belirlendi.



Şekil 3: BSA standart eğri grafiği

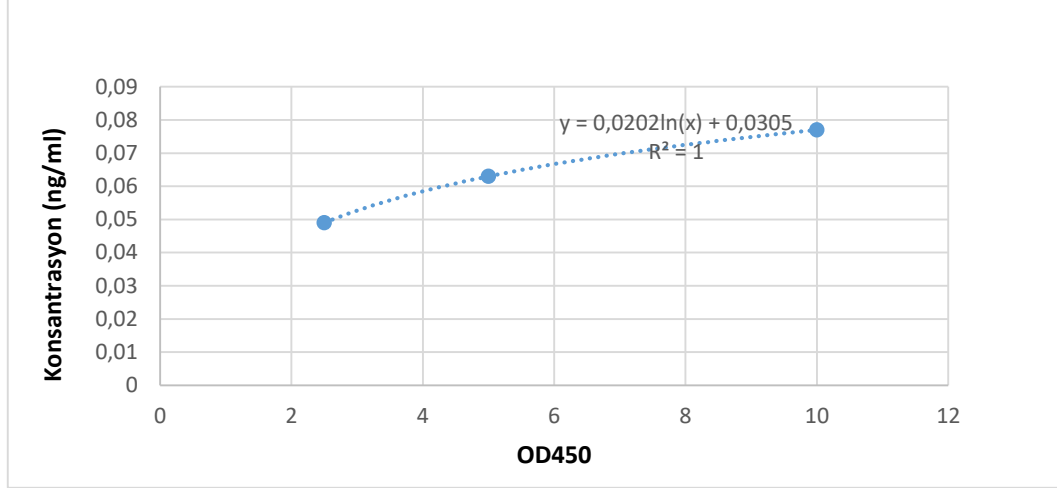
3.6.9. İmmünfloresan Boyama

96’lık hücre kültür plaklarına ekilen 5×10^4 hücreler, plak yüzeyine tutunabilmeleri için %1,7 FBS içeren komplet DMEM/F-12 ortamında 37°C’de %5 CO₂ varlığında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yukarıda belirtilen deney gruplarına ve uygulama konsantrasyonlarına bağlı kalınarak 24 saat Aβ, KN93 ve 23. saatin sonunda Ca²⁺ uygulandı. 24 saat sonunda kuyucuklardan ortamlar uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 200 µl PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama sonrasında kuyucuklara 200 µl soğuk metanol eklendi ve -20°C’de 5 dakika boyunca bekletildi. Metanol uzaklaştırıldı ve 200 µl PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Hücre zarı geçirgenliğini arttırmak adına 200 µl %0.1’lik PBS’te Triton X-100 çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Devamında Triton X-100 uzaklaştırıldı ve 200 µl PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Hücreler %2’lik PBS’te BSA çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında

1 saat bekletildi. Bloklama işlemi sonrasında yine 200 µl PBS ile 3 kez yıkama yapılarak primer antikor ekleme için hücreler hazır hale getirildi. %0.1'lik BSA çözeltisi kullanılarak 1:1000 oranında dilüe edilmiş olan CaMK-II- α (6G9) Mouse mAb (Cell Signaling Technology) primer antikor, kuyucuk başına 100 µl eklendi ve 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Primer antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve 200 µl PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Devamında gerçekleştirilen tüm basamakların karanlık ortamda yapılmasına dikkat edildi. %0.1'lik BSA'da 1:1000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor 647 Conjugate) (Cell Signaling Technology) her kuyucuğa 100 µl eklendi. Oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyon sonunda sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı. PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Ardından 0,1 µg/ml konsantrasyona sahip DAPI'den 100 µl kuyucuklara eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon sonucunda hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler hemen görüntülemeye alındı. Olympus IX/71 Ters Faz Floresans Mikroskop yardımıyla görüntülemeler yapıldı. Görüntüler x20 büyütmede alındı.

3.6.10. CaMK-II beta düzeyinin belirlenmesi

Deney gruplarında, CaMK-II beta miktarlarının belirlenmesi amacı ile Human CAMK2B/ CaMKII Beta ELISA kiti (LSBio) kullanıldı. Seri seyreltmeler yapılarak 10 - 5 - 2,5 - 0,625 - 0,313 - 0,157 ve 0 ng/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. 100 µl örnek, standart ve körden 96'lik plate kuyucuklarına eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar hızlı bir şekilde ters çevrilerek sıvının uzaklaştırılması sağlandı. 100 µl deteksiyon reaktifi A eklendi ve tekrar 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardan sıvı aspire edildi ve devamında kuyucuklar 3 kez yıkandı. 100 µl deteksiyon reaktifi B eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Aspirasyon ve 5 kez yıkama ardından 90 µl TMB substratı eklenerek 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Ardından 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve hemen 450 nm'de absorbans ölçümü alındı.

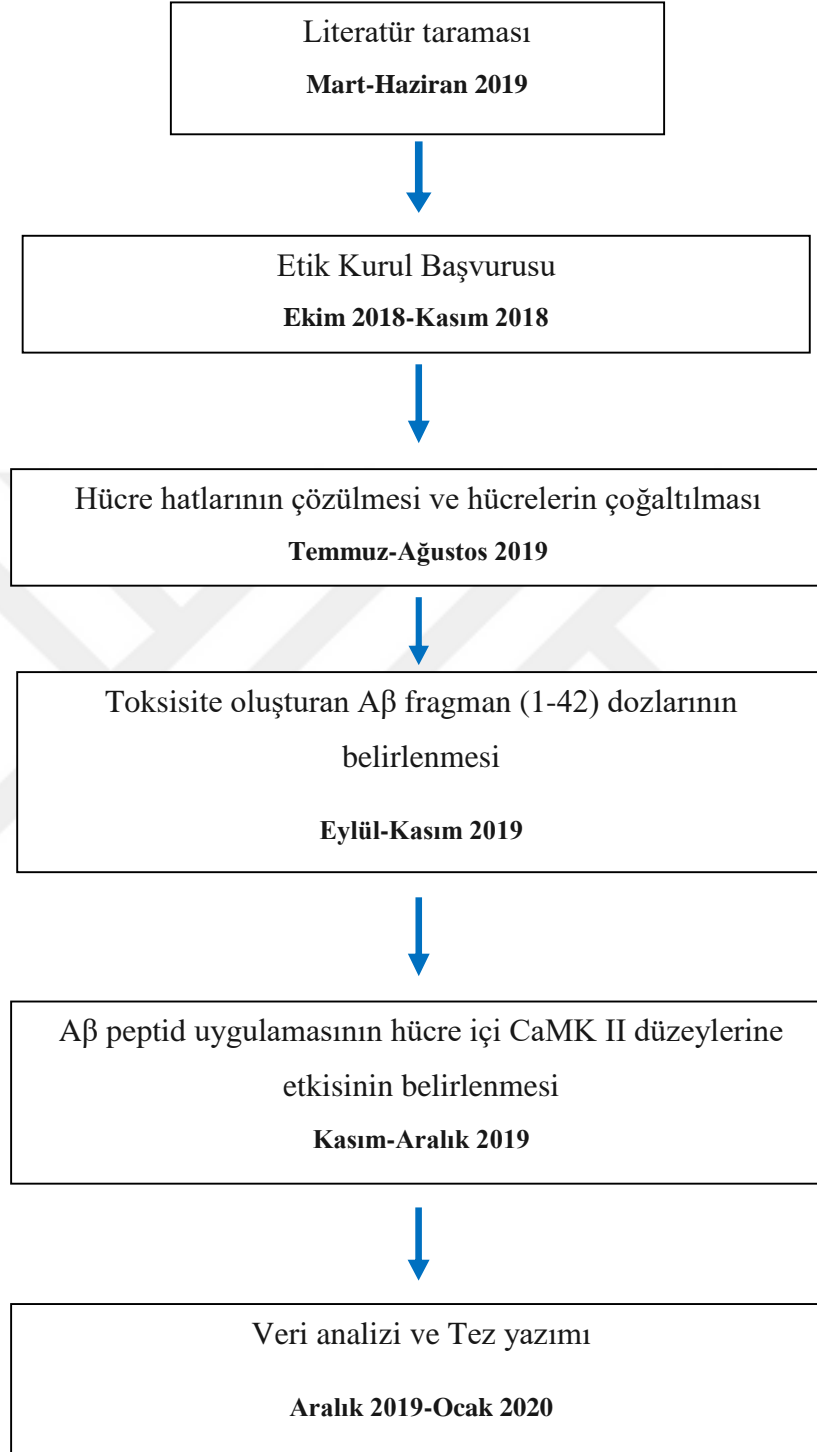


Şekil 4: ELISA Standart Grafiği

3.6.11. Hücre Kültür Ortamı Ca^{+2} Seviyelerinin Ölçümü

Hücrelerden aspire edilen hücre kültür ortamı/uygulama solüsyonları karışımlarında serbest Ca^{+2} seviyeleri incelenmiştir. 200 μ l örnek kullanılarak, DxC 700 AU Clinical Analyzer'da (Beckman Coulter) gerçekleştirilen bu testte OSR60117 ve OSR61117 (Beckman Coulter) kitleri kullanılmıştır. Bu test, Arsenazo III (2,2'-[1,8-dihidroksi-3,6-disülfoaftilen-2,7-bisazo]-bisbenzenarsonik asit) ile yoğun mor renkli kompleks oluşturan Ca^{+2} iyonlarının ölçümünü içermektedir. Oluşan kompleksin absorbanası 660/700 nm'de bikromatik olarak ölçülmektedir. Absorbansta görülen artış, örnek Ca^{+2} konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.7.Araştırmanın Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

SPSS programının 22.0 versiyonu kullanılarak araştırma sonuçlarının istatistik analizi yapılacaktır. Mann Whitney U testi ve Q-square testi gruplar arası karşılaştırmalarda kullanılarak değerlendirme geręekleştirilecektir. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

İnsan kaynaklı nöronal hücre hattı (SH-SY5Y) kullanarak yaptığımız bu in vitro çalışma ile elde edilen veriler in vivo ve klinik çalışmalar ile desteklenmelidir. Bundan sonra planlanacak yeni in vitro çalışmalarda CaMK-II enzim aktivite değişimi belirlenebilir.

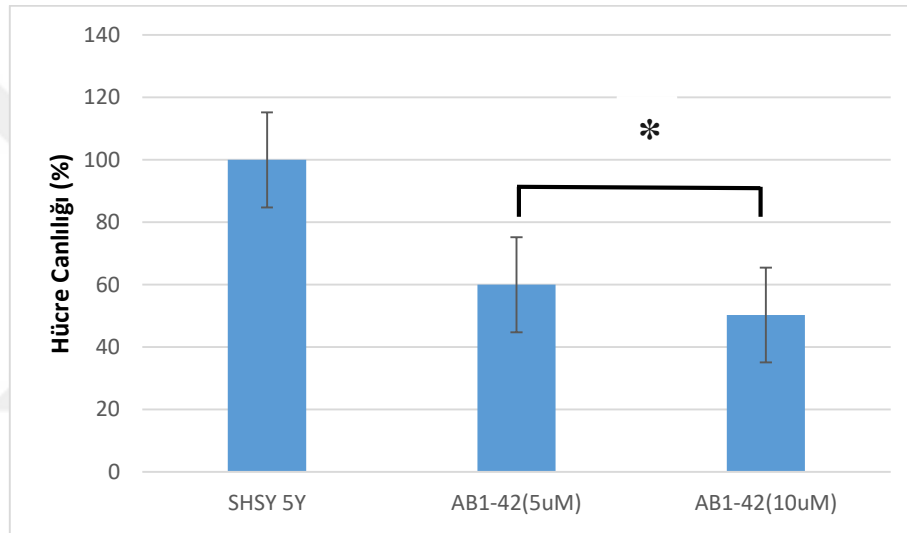
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma 2019 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 4335-GOA protokol numarası ve 2018/27-12 karar numarasıyla 25.10.2018 tarihinde uygun bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.1. A β Peptid Toksikite Modeli

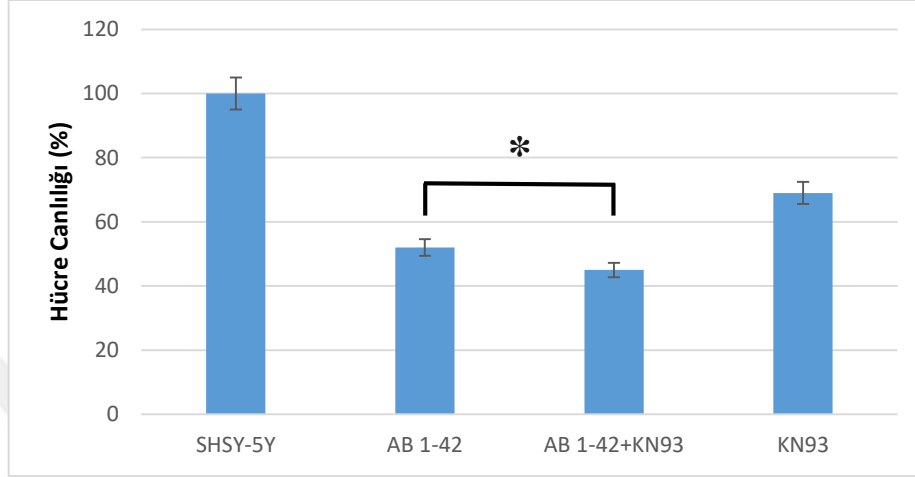
A β fragmanları önceden 37°C de 72 saat inkübe edilerek agregasyonları sağlandıktan sonra SH-SY5Y hücrelerine uygulandı. 5 μ M ve 10 μ M A β 1-42 fragmanları 72 saat boyunca hücrelere muamele edildikten sonra hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu ($p < 0.05$, Şekil 5).



Şekil 5: SH-SY5Y hücrelerinde agreste A β fragmanlarının 72. saatin sonunda hücre canlılığına etkisi. (Sonuçlar dokuz çalışmanın ortalaması \pm SD olarak verilmiştir. * Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark, $n=9$)

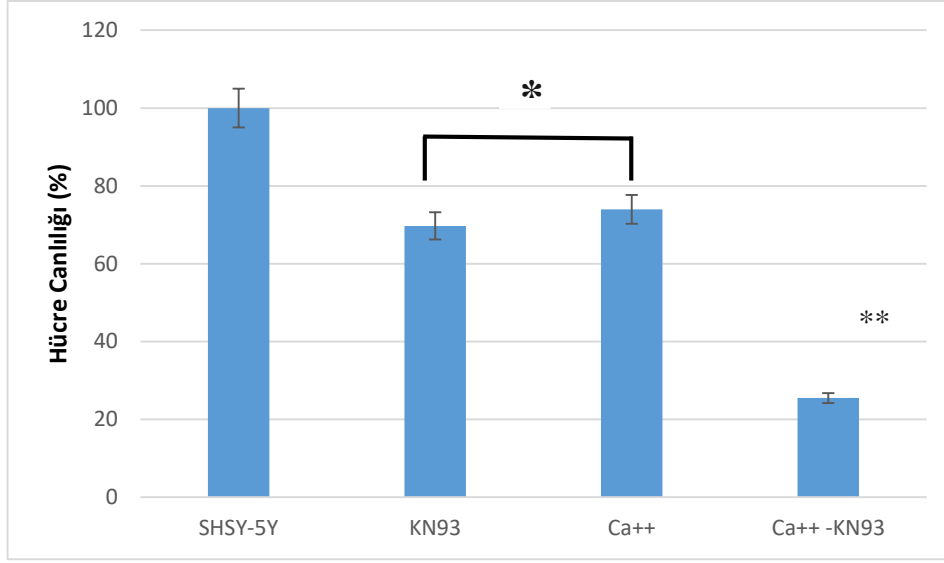
4.2. A β Peptid Toksikite Modelinde KN93 ve Ca⁺² Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

4.2.1. MTT Sonuçları



Şekil 6: SH-SY5Y’lerde 72 saat A β , A β + KN93 ve sadece KN93 uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi (* Kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark, n=3)

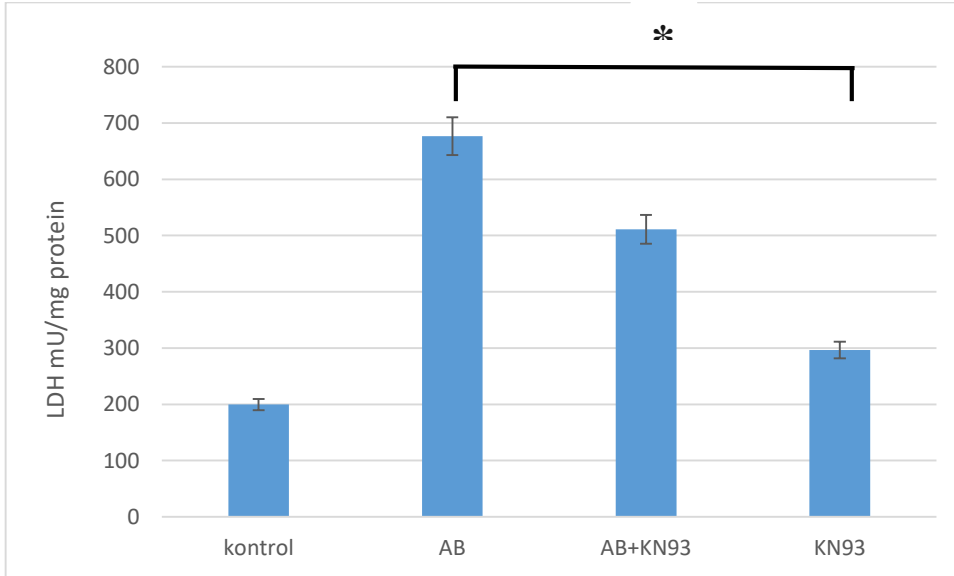
Yapılan MTT ölçümü sonucunda 72 saat A β uygulamasının, hücre canlılığını kontrole göre ~%48 azalttığı görülmüştür. KN93 uygulamasının kontrole göre ~%31, A β + KN93 uygulamasının ise ~%55 hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır.



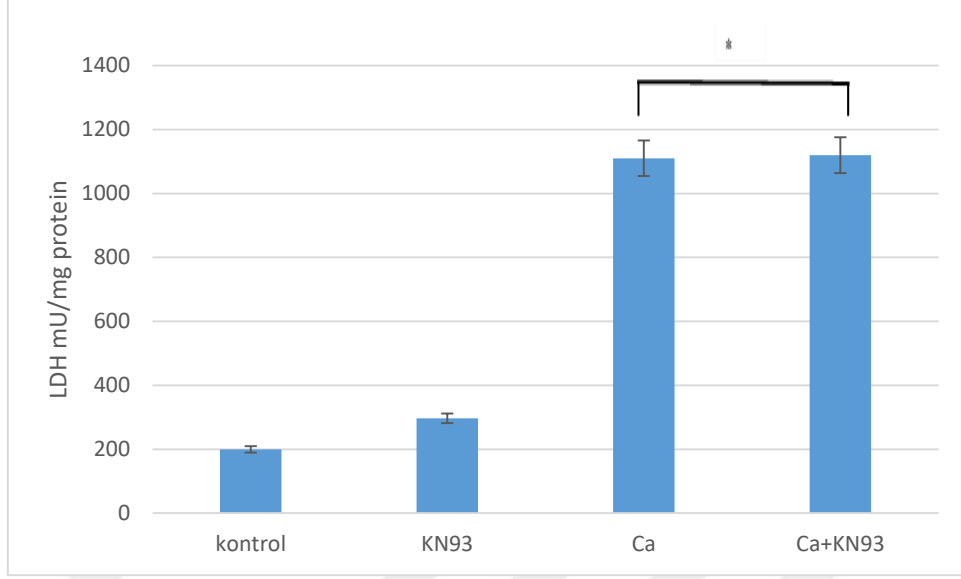
Şekil 7: SH-SY5Y'lerde Ca^{+2} ve KN93 + Ca^{+2} uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi (* Kontrol grubuna göre, ** Ca^{+2} uygulamasına göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark, $n=3$)

Ca^{+2} uygulaması kontrole göre hücre canlılığını ~%26, KN93 + Ca^{+2} uygulamasının ise ~%75 oranında azalttığını göstermiştir.

4.2.2. LDH Düzeyine Göre Sitotoksosite Sonuçları



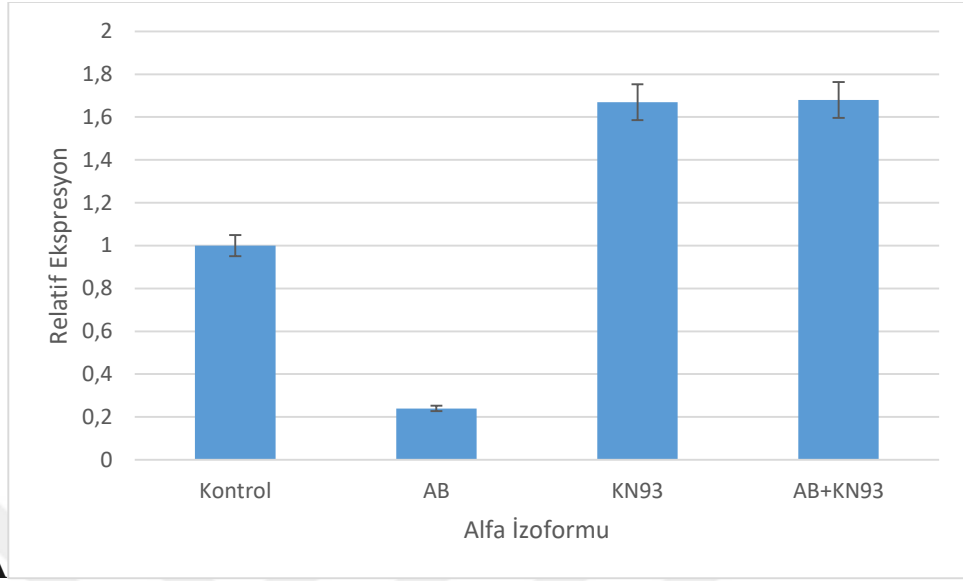
Şekil 8: A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında LDH aktivite sonuçları (* Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark, $n=3$)



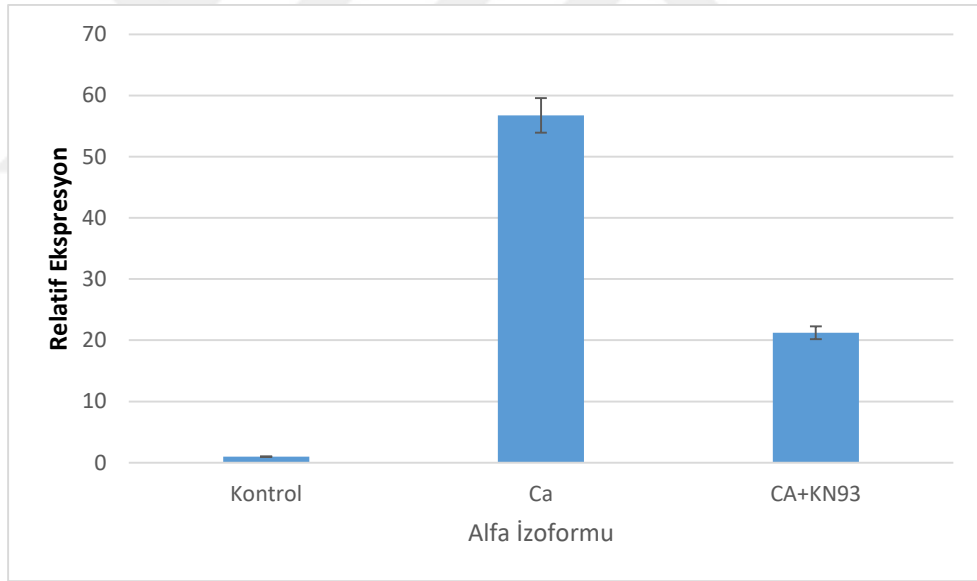
Şekil 9: KN93, Ca²⁺ ve Ca²⁺ + KN93 gruplarına ait LDH aktivite değerleri

LDH aktivitesi kontrol grubuna göre; tüm deney gruplarında yaklaşık olarak 1,4 kat artış göstermiştir. (* Kontrol grubuna göre p<0.05 düzeyinde anlamlı fark, n=3)

4.3. CaMK-II İzoformlarının RT-qPZR İle Değerlendirilmesi

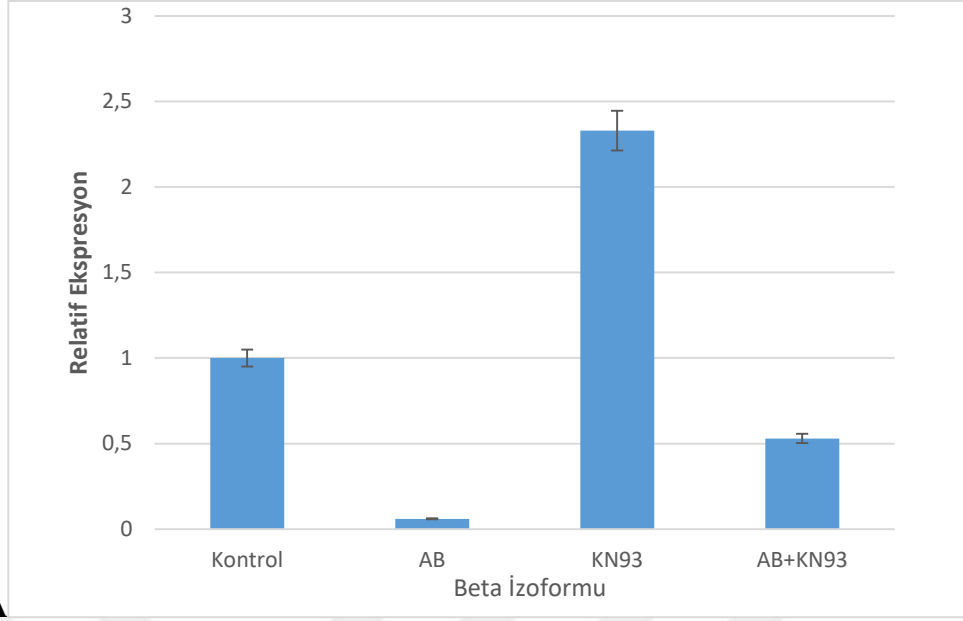


A

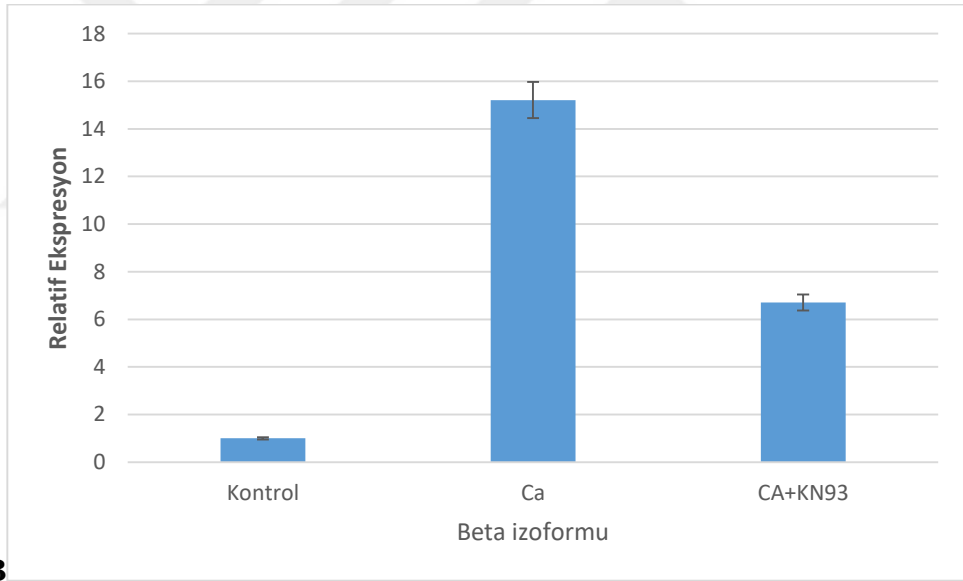


B

Şekil 10 A/B: CaMK-II alfa izoformu gen ekspresyon değişimleri. Yapılan RT-qPZR değerlendirmeleri ile tüm deney gruplarında CaMK-II alfa izoformunun gen ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Sonuçlar, Ca^{+2} + KN93 uygulanan grupta kontrole göre ~21,23 kat, Ca^{+2} uygulaması yapılan grupta ise ~56,75 kat artış görülmüştür. $A\beta$ uygulaması yapılan grupta ise alfa izomer gen ekspresyonu kontrol grubuna göre 5 kat azalma göstermiştir.

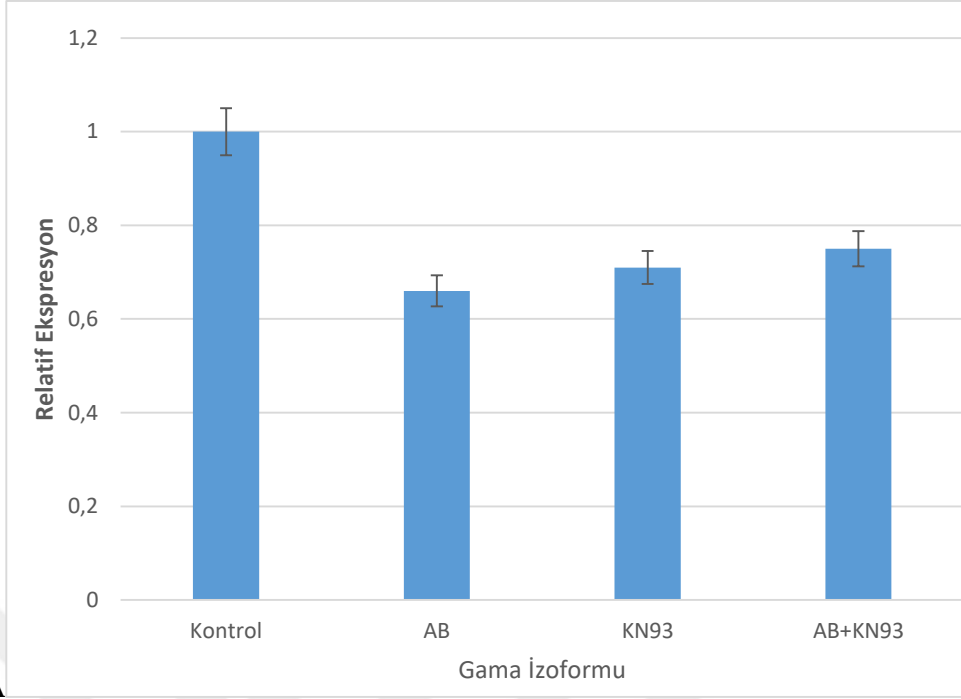


A

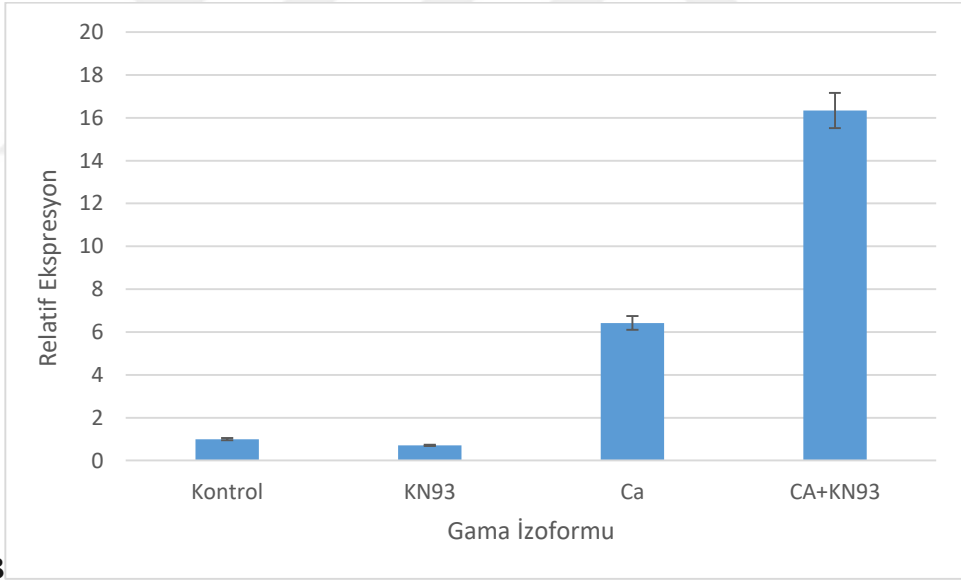


B

Şekil 11 A/B: CaMK-II beta izoformu gen ekspresyon değişimleri. CaMK-II beta izoformunun RT-qPZR ile elde edilen sonuçlarına göre; $A\beta$ ve $A\beta$ +KN93 gruplarında kontrole oranla bir azalma gözlenmiştir. $A\beta$ grubunda beta ekspresyonu yaklaşık 100 kat azalma göstermiştir. KN93, Ca^{+2} ve Ca^{+2} + KN93 gruplarında gen ekspresyonu kontrole oranla artmış olup değişimler sırası ile 2,33, 15 ve 6,7 kattır.



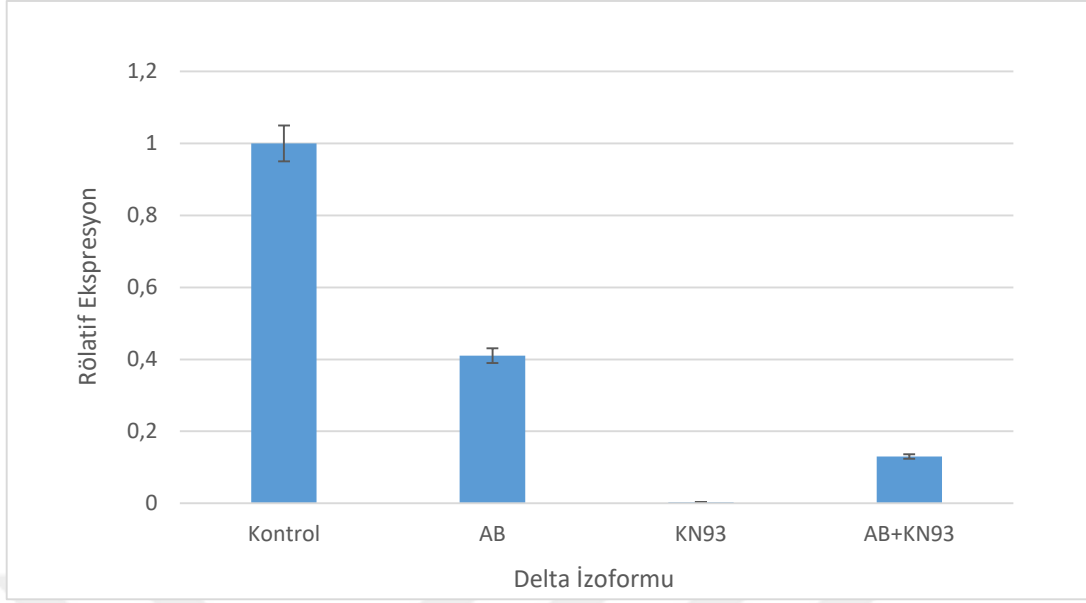
A



B

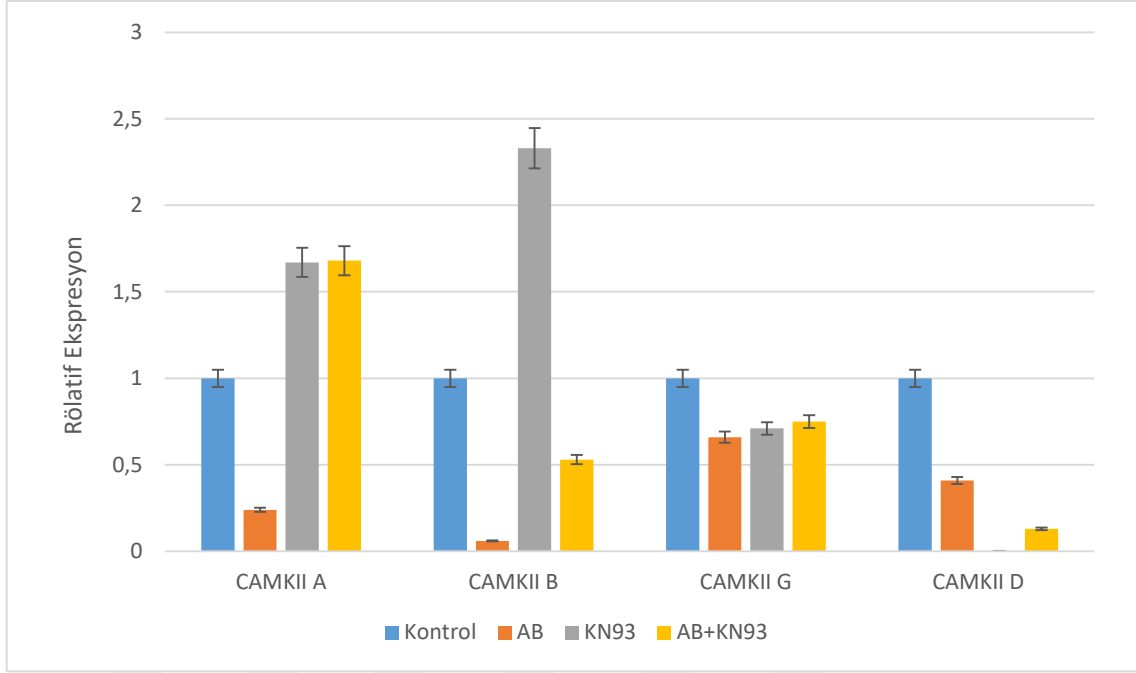
Şekil 12 A/B: CaMK-II gama izoformu gen ekspresyon değişimleri.

CaMK-II gama izoformu değişimlerine bakıldığı zaman ise A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında kontrole göre sırası ile 0,66, 0,7 ve 0,75 kat azalma görülmüştür. Ca⁺² ve Ca⁺² + KN93 gruplarında ise artış gözlemlenmiştir. Ca⁺² grubu kontrole göre 6 kat, Ca⁺² + KN93 grubu ise 16 kat artış göstermiştir.

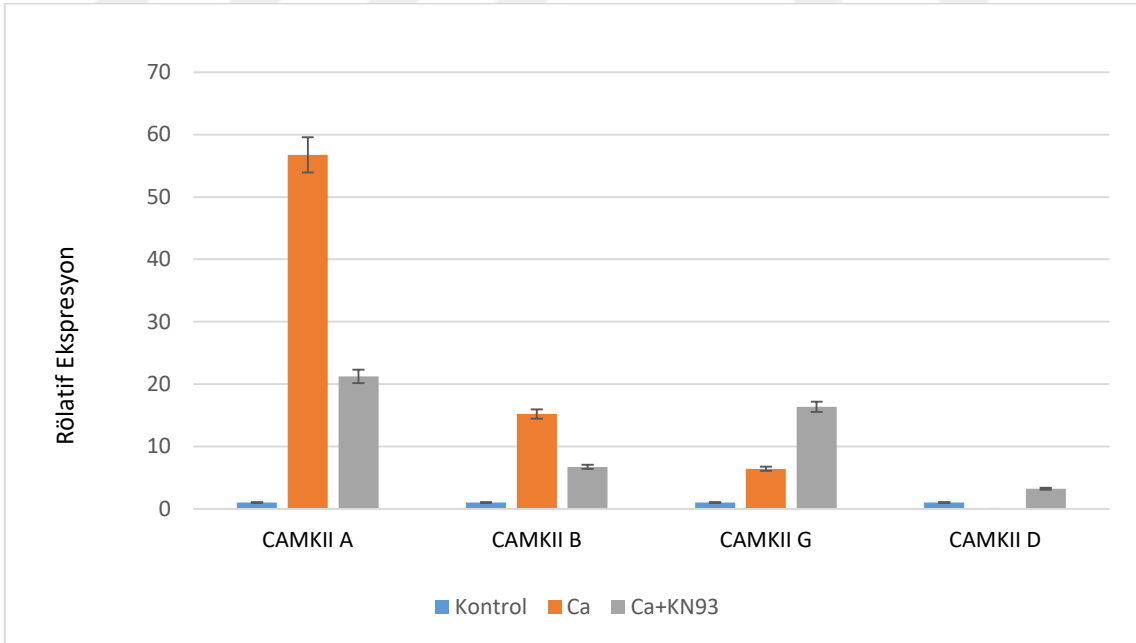


Şekil 13: CaMK-II delta izoformu gen ekspresyon değişimleri.

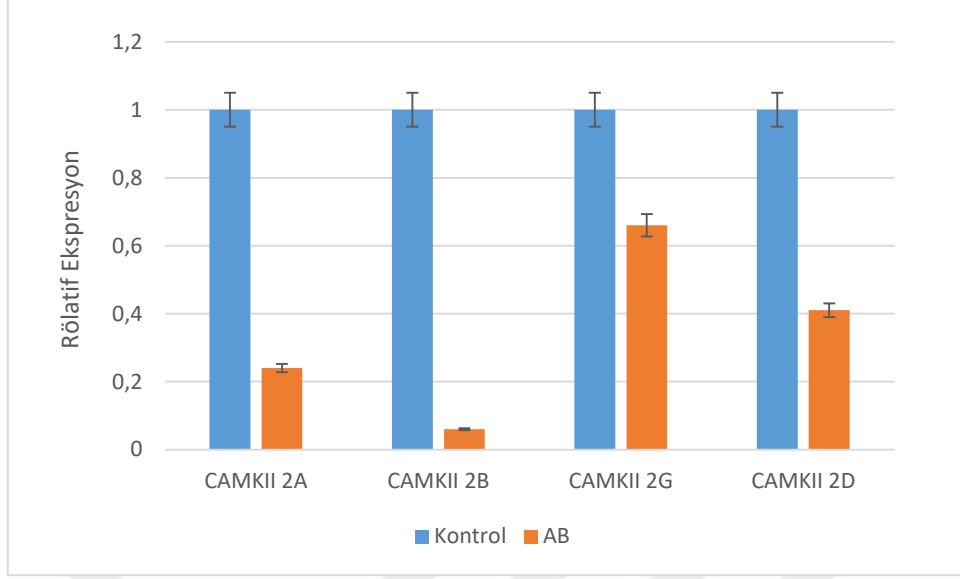
RT-qPZR sonuçları kontrole göre, CaMK-II delta izoformu gen ekspresyonunda A β , ve A β + KN93 grupları için sırası ile 2,5 ve 10 kat azalma göstermiştir. KN93 grubu ise kontrole oranla yaklaşık 1000 kat azalma göstermiştir. %Ca+2 grubunda kontrole kıyasla delta izoform ekspresyonu görülmemiştir. Ca+2 + KN93 grubunda 3,2 kat artış görülmüştür.



Şekil 14: A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında CaMK-II izoformlarına ait gen ekspresyon değişimleri



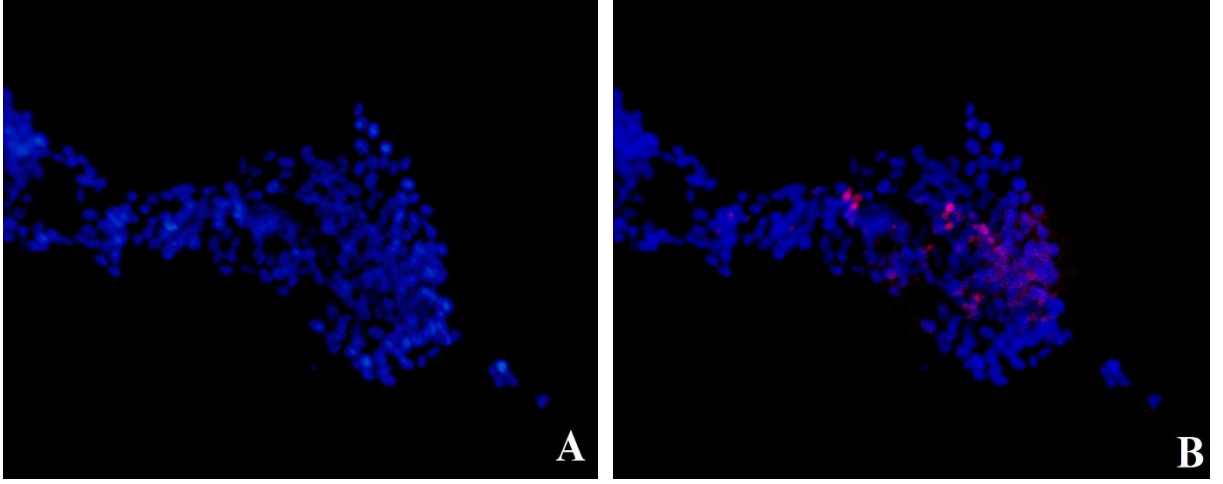
Şekil 15: Ca²⁺ ve Ca²⁺+KN93 gruplarında CaMK-II izoformlarına ait gen ekspresyon değişimleri



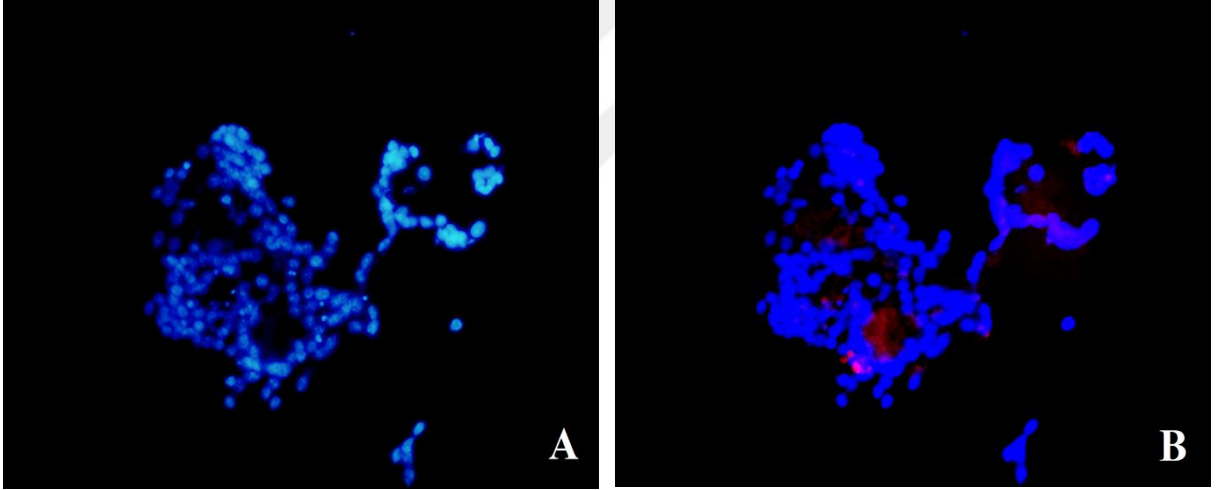
Şekil 16: A β uygulaması sonrası CaMK-II izoformlarına ait gen ekspresyon değişimleri

4.4. İmmünfloresan Boyama İle Hüresel Alfa İzoformu Varlığının Değerlendirilmesi

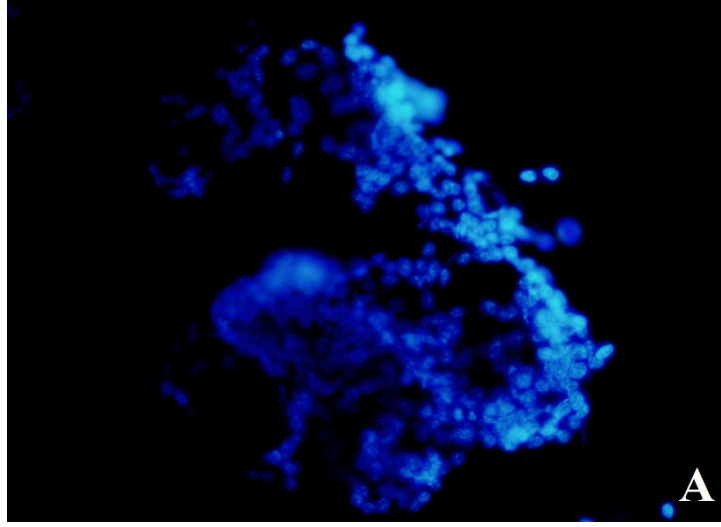
CaMK-II alfa'ya özgü antikor kullanımını yolu ile tüm deney gruplarında bu enzimin varlığı floresan işaretleme aracılığıyla gösterildi. Olympus IX71 ters faz immünfloresan mikroskobu kullanılarak alınan görüntülerde, görüntülerin doğru yorumlanabilmesi adına hücre çekirdekleri DAPI kullanılarak işaretlendi. Sekonder antikor ile konjuge Alexa Fluor 647 boyasının yaptığı ışımaya (kırmızı) görüntüleri ile CaMK-II varlığı gösterilmeye çalışıldı. Görüntülerin hepsi x20 büyütmede alındı. A β + KN93 grubu dışında tüm gruplardan CaMK-II sinyali alınmış ve görüntülenmiştir.



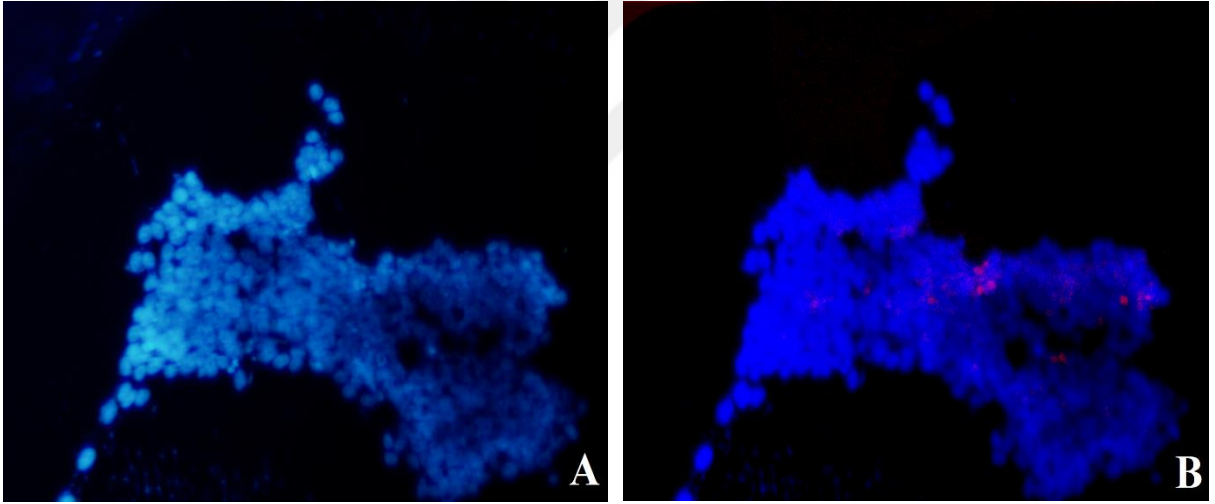
Şekil 17: Kontrol grubuna ait immünfloresan görüntüleri. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.



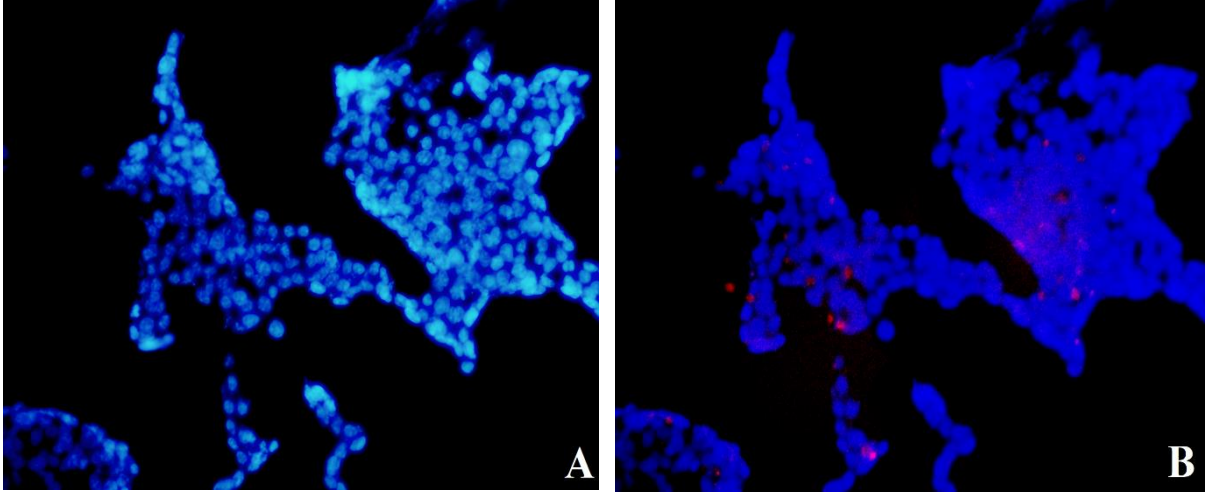
Şekil 18: 24 saat A β uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.



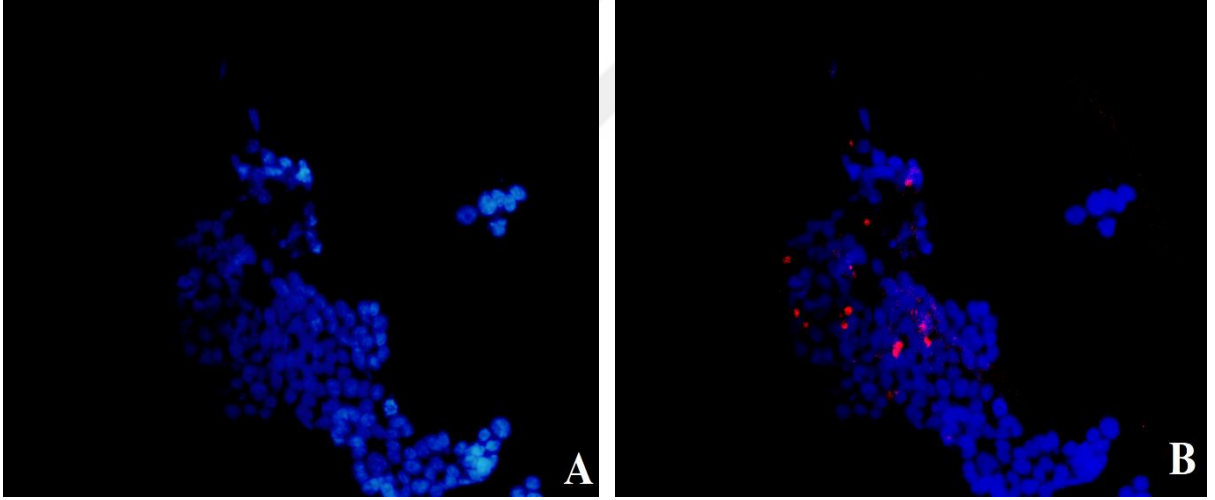
Şekil 19: 24 saat A β + KN93 uygulaması yapılan gruba ait DAPI görüntüsü.



Şekil 20: Sadece Ca²⁺ uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.

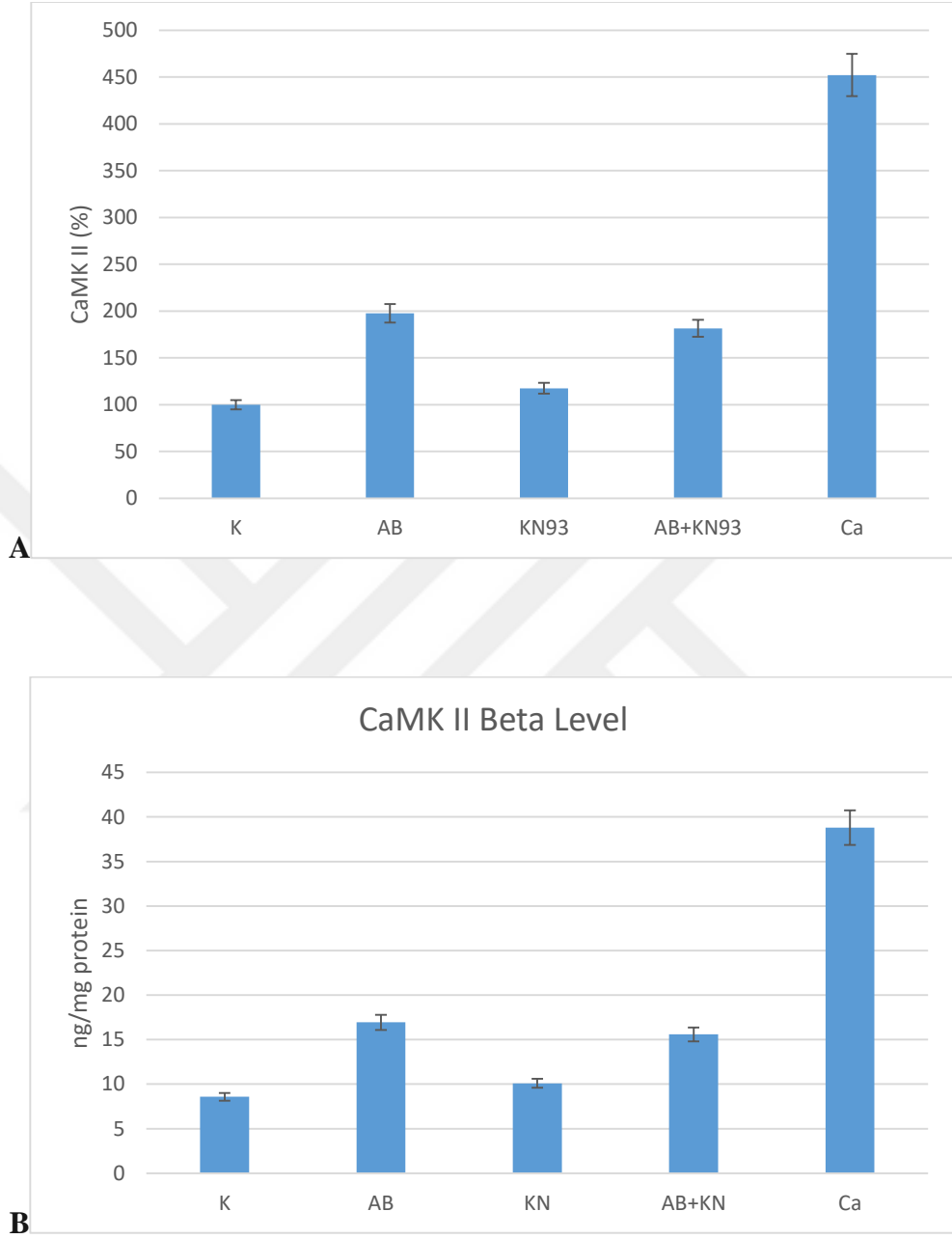


Şekil 21: Ca^{+2} + KN93 uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.



Şekil 22: 24 saat KN93 uygulaması yapılan gruba ait görüntüler. (A) DAPI işaretli hücre çekirdekleri (B) Alexa Fluor 647 işaretli CaMK-II ve DAPI.

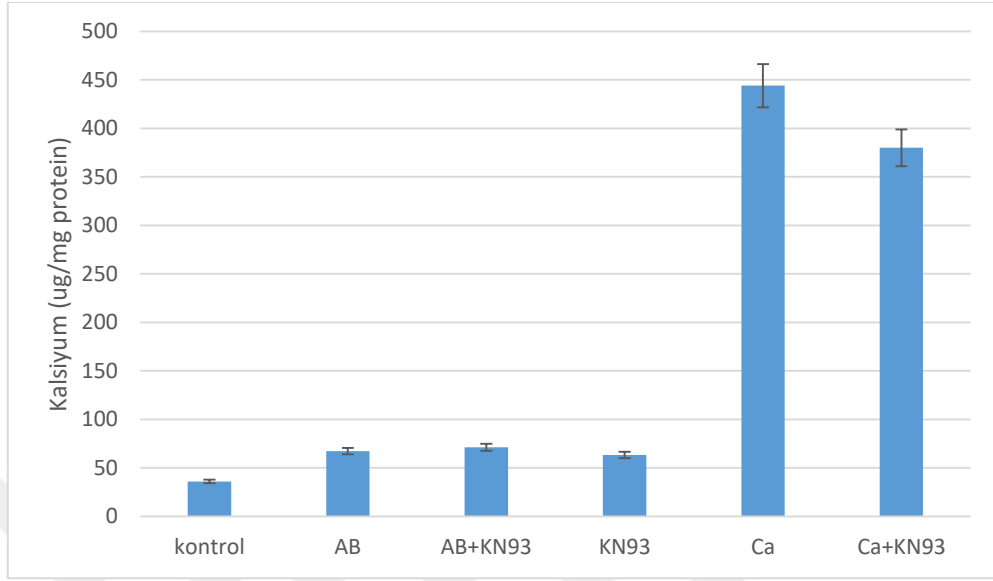
4.5. ELISA İle CaMK-II Beta Miktarlarının Değerlendirilmesi



Şekil 23 A./B: A β , KN93 ve A β + KN93 gruplarında CaMK-II beta izoformu değişimleri / KN93, Ca²⁺ ve Ca²⁺ + KN93 gruplarında CaMK-II beta izoformu değişimleri

Yeterli hücre ve malzeme eksikliğinde ötürü deney tekrar sayıları kısıtlı kalmıştır.

4.6. Hücre Kültür Ortamındaki Ca⁺² Seviyelerinin Değişimi



Şekil 24: Deney gruplarında belirlenen hücre kültür ortamı Ca⁺² miktarları

Yapılan ölçümler sonucunda mg protein başına düşen µg Ca⁺² miktarı, tüm deney gruplarında kontrole göre artış göstermiştir. Aβ grubunda 1,8 kat, Aβ + KN93 grubunda yaklaşık 2 kat, KN93 grubunda 1,75 kat, Ca⁺² grubunda 12,3 kat ve Ca⁺² + KN93 grubunda 10,5 kat artış gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı günümüzde demansın en yaygın şekli olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın dünya üzerindeki yaşlı nüfusun artmasına bağlı olarak görülme sıklığı artmış ve dikkatleri hastalık için etkin bir tedavi geliştirilebilmesi üzerine çekmiştir. Anı depolama mekanizmasının karmaşık yapısı ile beraber AH patogenezinin multifaktöriyel olması ortak bir payda arayışını önemli hale getirmiştir. Bu tez çalışması **literatür taramamıza göre ilk kez** Alzheimer hastalığının temel patolojik bulgularından olan amiloid plakları oluşturan A β peptidlerin, toksik konsantrasyonlarda hafıza oluşumunda kilit fonksiyonu olan kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz-II enzim izoformlarının ifadesini değiştirebildiği ve alfa izoformunun hücrel birikimine neden olduğu gösterilmiştir.

Anı depolama Ca⁺² akışına bağlı protein kinazların kaskad aktivasyonunu barındırmaktadır [20]. Hücrel (Ca⁺²) homeostazının, AH'ın hem sporadik hem de ailesel formlarında bozulduğuna ve A β oluşumunu ile tau hiperfosforilasyonunu teşvik edebileceğine ilişkin önemli kanıtlar bulunması [21][22] dikkatleri Ca⁺² alt akım molekülleri üzerine yoğunlaştırmıştır. **Hem geçmiş hem de şimdiki hücrel aktiviteyi temsil eden "sürekli" bir kalsiyum sinyalleşmesinin dinamik doğasına özgü olarak geçici bilgileri entegre ettiği ve hafıza oluşumunu etkilediği ileri sürülmektedir.** Hafızanın oluşturulmasında bir protein kinaz olan ve hücre içi Ca⁺² artışı ile birlikte indüklenebilen CaMK-II kilit bir enzimdir.

A β kaynaklı hücre ölümü için ana mekanizmalardan biri, kalsiyum aşırı yüklenmesi ve kalsiyum homeostazının bozulmasıdır [23].CaMK-II'nin, Ras GTPaz'ın aktif ve inaktif formları üzerine etkili olduğunu gösteren araştırmaların olması, CaMK-II'nin ERK sinyal yolağı üzerinden hücre proliferasyonu, differansiyasyonu ve apoptozu regülasyonunda etkisini düşündürmüştür. Ancak henüz A β toksisitesi ve CaMK-II enzimin nöronal hücre canlılığı üzerine etkisi net olarak tanımlanmamıştır. Biz çalışmamızda A β 1-42 uygulamasının, CaMK-II mRNA ekspresyonunu, kontrol grubuna göre belirgin olarak azalttığını gösterdik. Bu azalma özellikle alfa ve beta izoformlarında belirgin olarak saptandı. Gama ve delta izoformlarındaki azalma göreceli olarak daha azdı.

Son yıllarda kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II alfa'nın (CaMK-II alfa) Alzheimer hastalığı patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini gösteren kanıtlar ileri sürülmektedir. Fang ve ark., 2019 yılında yaptığı genetik çalışma [24] CaMK-II alfa'nın Han

Çin nüfusunda AH gelişimine duyarlılık sağlayıp sağlamadığını araştırmıştır. Alfa-CaMK-II içindeki toplam yedi tek nükleotid polimorfizmi (SNP), güneybatı Çin'den (333 AH hastası ve 334 kontrol) ve doğu Çin'in (382 Ah hastası ve 426 kontrol) bu gen ve AH arasındaki potansiyel ilişkiyi ayırt etmek için iki bağımsız kohortta taranmış, ek olarak, CaMK-II alfa'nın AH'li bireyler ve kontroller arasında beyinde farklı şekilde ifade edilip edilmediğini araştırmak için platformlar arası normalleştirilmiş bir ifade kaynağı kullanılmıştır. Platformlar arası normalize edilmiş veriler, AH hastaları ve kontrol denekleri arasında hipokampus, entorinal korteks ve temporal kortekste CaMK-II alfa ekspresyonunda önemli farklılıklar göstermiştir. Bu çalışma Han Çin nüfusunda, AH patofizyolojisi için CaMK-II alfa'nın önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda toksik konsantrasyonda Aβ uygulaması CaMK-II alfa ekspresyonunu belirgin olarak azaltırken, immünfloresan sonuçlarımıza göre bu izoformun hücresel birikimini arttırmıştır. Bu durum, daha önce yapılan Aβ peptidin CaMK-II alfa'nın hücresel hareketini etkilediğini gösteren çalışma ile uyumludur. Bu çalışmada, Aβ oligomerlerinin CaMK-II alfa hareketini bloke ettiği ve sinapslarda birikime neden olduğu gösterilmiştir.

Nöronal dokuda alfa ve beta izoformları baskın olarak bulunur. Alfa izoformu özellikle glutamerjik nöronların sinapslarında yer alırken, beta izoformunun inhibitör etkili GABAerjik sinapslarda bulunduğu gösterilmiştir.

Sinir sisteminde eksitator ve inhibitör sinapslar arasındaki denge, nöronal homeostazisinin korunmasında kritiktir. Bizim çalışmamızda ilginç olarak Aβ peptidin, beta izoform ekspresyonunu diğer izoformlara oranla daha fazla baskıladığı görülürken, CaMK-II beta protein düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. Bu durum, Aβ peptidin CaMK-II'nin hücresel hareketini bloke ettiği, birikimine neden olduğu ve böylece Ca²⁺ sinyalizasyonundaki dengeyi bozduğunu düşündürmüştür. Diğer taraftan, alfa ve beta izoformlarının mRNA ekspresyonlarındaki bu azalma, uzun vadede, Aβ varlığına bağlı ilerleyici bir bellek kaybı sorununun nedeni olabilir.

Hem geçmiş hem de şimdiki hücresel aktiviteyi temsil eden "sürekli" bir kalsiyum sinyallemesinin dinamik doğasına özgü geçici bilgileri entegre ettiği ileri sürülmektedir. Ancak dört izoformu olan CaMK-II enzim sinyalinin yokluğunda veya değişiminde hücresel aktivite / fizyolojinin nasıl etkilendiği henüz net olarak tanımlanamamıştır. **CaMK-II enzim inhibisyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi tartışmalıdır.**

KN93, seçici bir Ca^{2+} / kalmodulin bağımlı protein kinaz II inhibitörüdür. KN93'ün nöronal hücre canlılığına etkisi tartışmalı bir konudur. KN93'ün, NMDA tarafından indüklenen eksitotoksiteden nöronları koruduğu gösterilmiş [25] ancak diğer taraftan enzim inhibisyonunun glutamat/kalsiyum sinyalleşmesini etkileyerek hücre canlılığını olumsuz etkilediğini ileri sürülmüştür [26][27]. CaMK-II inaktivasyonunun kapsamı iskemik çekirdekten onu çevreleyen penumbral bölgeye yayılması, iskeminin neden olduğu doku hasarının derecesi ile ilişkili bulunmuştur. İlginç bir şekilde, CaMK-II knock-out fareleri iskemik inmeden sonra doğal tip yavrulardan daha fazla hasar gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca, nöronlar içinde CaMK-II'nin genetik ve farmakolojik inhibisyonu, kalsiyum homeostazının bozulması, hipereksitabilite, glutamat sinyalinin düzensizliği ve nöronal ölüm gibi çeşitli patolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir.

Bu tez projesinde KN93 uygulaması, AB toksisitesine karşı bir koruma sağlamamış, aksine nöronal hücre canlılığını belirgin olarak azaltmıştır. Ayrıca CaMK-II alfa ve beta izoformlarının mRNA ekspresyonunu arttırırken, gama ve delta izoformlarının ekspresyonlarını belirgin olarak baskılamıştır. İlginç olarak immünfloresan mikroskopi değerlendirmelerine göre, hücresel alfa izoform düzeyleri tespit edilememiş, beta izoform protein düzeylerinde ise anlamlı bir farklılık görülmemiştir. KN93'ün bir CaMK-II enzim inhibitörü olarak hücre canlılığına karşı gösterdiği bu olumsuz etki hücresel Ca^{2+} sinyalizasyonunu bozulmasına bağlı olabilir.

CaMK-II, sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda temel bir role sahip olduğu bilinen oldukça karmaşık bir protein kinazdır. Ayrıca CaMK-II'nin bir **tau kinaz** olduğu da ileri sürülmüştür. Bu nedenle CaMK-II düzensizliği, Alzheimer hastalığında bir toksisite modülatörü, anormal kalsiyum sinyali, sinaps ve nöron kaybı ve hafıza bozukluğu ile karakterize bir demans olabilir. Kalsiyum sinyalizasyonundaki bozuklukların Alzheimer hastalığında nörodejenerasyona ve hafıza bozukluğuna önemli katkıda bulunduğu hipotezi ileri sürülmektedir.

(40-42)-amino asitlik amiloid beta peptid, Alzheimer hastalığının (AH) tanısı için histopatolojik bir işaret olarak kullanılan hücre dışı protein agregatları olan senil plakların önemli bir bileşenidir. Amiloid peptid fragmanları olan A β 25-35 ve A β 1-42 'in kortikal nöronlara 10 dakikalık uygulamasının protein kinaz C (PKC) ve Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı kinaz II'nin (CaMK-II) aktivasyonunda hızlı bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bununla

birlikte bu etkinin, hücre içine doğru artan Ca^{+2} akışının hücre içinde indüklenen ardışık bir uyarıma neden olduğu ileri sürülmüştür. [23] Diğer taraftan A β peptidlerin hücre içinde oluşturduğu sinyalin, muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile seçici olarak artmış GABA-erjik inhibisyonu içeren bir mekanizma yoluyla baskılanabildiği gösterilmiştir. Sinaptik plastisiteden hücre sağkalımına kadar çok çeşitli nöronal fonksiyonların düzenlenmesinde PKC ve CaMK-II'nin kilit rolleri göz önüne alındığında, A β tarafından güçlü aktivasyonları bu kritik süreçlere müdahale edebileceğini ve bilişsel eksikliklere katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür. Muskarinik reseptörlerin A β sinyalini bloke etme kabiliyeti, kolinerjik iletimin artırılmasının AH tedavisinde etkili bir terapötik strateji olabileceği fikrini destekleyen bir potansiyel mekanizma olarak görülmektedir [23].

Diğer taraftan sinir hücrelerinde amiloid beta'nın fizyolojik rolü olabileceği ve hücrel trofik aktiviteye katkıda bulunabileceği de ileri sürülmektedir [28]. Amiloid hipotezi yıllarca AH'de gözlenen nörodejenerasyonun bir nedeni olarak geniş çapta kabul görmüştür. Bu hipotez, A β 'yı nöronal fonksiyonu bozan ve hücre ölümüne yol açan toksik bir faktör olarak görür. Ancak son zamanlarda A β 'nin fizyolojik rolleri hakkındaki çalışmalar bu hipotezi zorlamaktadır. A β 'nin fizyolojik rolleri, Alzheimer gibi hastalıklar için seviyelerini düşürmeyi amaçlayan terapilerin geliştirilmesinde dikkate alınmalıdır. A β 'nin aşırı tükenmesinin olumsuz etkileri olabileceğinden, trofik fonksiyonlarını sınırlamak nörodejenerasyon sürecini geciktirmek yerine katkıda bulunabilir.

Kalmodulin bağımlı protein kinaz II inhibitörü KN93'ün, sıçan serebral kortikal nöronlarını N-metil-D-aspartik asite bağlı yaralanmalardan koruduğu gösterilmiştir [25]. Sprague-Dawley neonatal sıçanlarının primer kültürlenmiş serebral kortikal nöronları, 50 μ M N-metil-D-aspartik asite bağlı yaralanmadan sonra 0.25, 0.5 ve 1.0 μ M KN93 ile tedavi edildi. Sonuçlar, N-metil-D-aspartik asite bağlı yaralanma nöronları ile karşılaştırıldığında, hücrelerin aktivitesinin belirgin şekilde arttığını, apoptozun önemli ölçüde azaldığını, laktat dehidrojenaz sızıntısının azaldığını ve KN93 tedavisinden sonra nöronlardaki hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarının azaldığını gösterdi.

Ancak bizim çalışmamızda KN93 uygulaması A β toksisitesine karşı SH-SY5Y hücrelerini korumamış hatta hücre canlılığını olumsuz etkilemiştir. Bu durum A β peptid uygulaması ile tetiklenebilen kalsiyum sinyalizasyonunun hücrenin sağ kalım sürecinde olumlu etkileri olduğunu düşündürülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile literatür taramamıza göre ilk kez, Alzheimer hastalığının temel patolojik bulgularından olan amiloid plakları oluşturan A β peptidlerin toksik konsantrasyonlarda kalsiyum/kalmodulin kinaz-II enziminin izoformlarının ifadesini ve düzeyini değiştirebildiği gösterildi. Nöronal CaMK-II enzim izoform bu değişimlerin hücre sağ kalımında kritik bir basamak olduğu ve hücrenin kendi kendini koruması için tetiklendiği düşünülebilir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları; bu tez çalışması in vitro hücre kültürü çalışması olup in vivo hücresel değişimleri tam olarak yansıtmayabilir. Tez projesi esnasında, malzeme teminindeki sorunlar yüzünden deney tekrar sayıları kısıtlı kalmıştır. CaMK-II enziminin mRNA ekspresyonları her dört izoform için bakılmış ancak protein ekspresyonları sadece alfa ve beta izoformları için bakılabilmektedir. CaMK-II enzim aktivite değişimlerinin belirlenmesi, nöronal hücre ölümünde Ca⁺² sinyalizasyonu ve bu enzimin rolü hakkında daha detaylı bilgi verebilir.

Bu tez çalışması ile gerçekleştirilen protokollerin ve elde edilen sonuçların öğrenme ve hafıza ilişkili hastalıkların tedavisinde gelişme sağlayabilmek adına yararlı olacağı düşünülmektedir. Hafıza ve öğrenmede temel bir molekül olan CaMK-II'nin, toksisite koşulları altındaki yanıt mekanizmasının anlaşılmasının, etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesi adına önemli olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, nöronal CaMK-II enzim izoform değişimlerinin hücre sağ kalımında kritik bir basamak olduğu ve A β toksisitesine karşı hücrenin kendi kendini koruması için tetiklendiği ileri sürülebilir. Gelecekte nörodejenerasyon sürecinde kalsiyum sinyal mekanizması ile ilişkili gerçekleştirilecek in vivo çalışmalar yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol gösterici olabilir.

7. KAYNAKLAR

- [1] A. Ghosh and K. P. Giese, “Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer’s disease,” *Mol. Brain*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 2015.
- [2] L. C. dos Santos Picanco *et al.*, “Alzheimer’s Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment,” *Curr. Med. Chem.*, 2016.
- [3] F. Di Domenico, E. Barone, M. Perluigi, and D. A. Butterfield, “The Triangle of Death in Alzheimer’s Disease Brain: The Aberrant Cross-Talk among Energy Metabolism, Mammalian Target of Rapamycin Signaling, and Protein Homeostasis Revealed by Redox Proteomics,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 26, no. 8, pp. 364–387, 2017.
- [4] H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, “Alzheimer’s disease,” *New England Journal of Medicine*. 2010.
- [5] D. M. Walsh *et al.*, “Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo,” *Nature*, 2002.
- [6] G. M. Shankar *et al.*, “Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer’s brains impair synaptic plasticity and memory,” *Nat. Med.*, 2008.
- [7] S. Li, S. Hong, N. E. Shepardson, D. M. Walsh, G. M. Shankar, and D. Selkoe, “Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake,” *Neuron*, 2009.
- [8] M. Willem *et al.*, “ σ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus,” *Nature*, 2015.
- [9] P. Marambaud, U. Dreses-Werringloer, and V. Vingtdeux, “Calcium signaling in neurodegeneration,” *Molecular Neurodegeneration*. 2009.
- [10] J. Lisman, H. Schulman, and H. Cline, “The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory,” *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002.
- [11] Y. Elgersma, J. D. Sweatt, and K. P. Giese, “Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition,” *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 39, pp. 8410–8415, 2004.
- [12] E. E. Irvine, L. S. J. von Herten, F. Plattner, and K. P. Giese, “ α CaMKII

- autophosphorylation: a fast track to memory,” *Trends Neurosci.*, vol. 29, no. 8, pp. 459–465, 2006.
- [13] G. A. Wayman, Y. S. Lee, H. Tokumitsu, A. Silva, and T. R. Soderling, “Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity,” *Neuron*. 2008.
- [14] W. Lucchesi, K. Mizuno, and K. P. Giese, “Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation,” *Brain Research Bulletin*. 2011.
- [15] S. J. Coultrap and K. U. Bayer, “CaMKII regulation in information processing and storage,” *Trends in Neurosciences*. 2012.
- [16] H. Ma, B. Li, and R. W. Tsien, “Distinct roles of multiple isoforms of CaMKII in signaling to the nucleus,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2014.
- [17] D. Zhao, J. B. Watson, and C. W. Xie, “Amyloid β prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation,” *J. Neurophysiol.*, 2004.
- [18] K. F. Lin, R. C. C. Chang, K. C. Suen, K. F. So, and J. Hugon, “Modulation of calcium/calmodulin kinase-II provides partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity,” *Eur. J. Neurosci.*, 2004.
- [19] Y. Zhao, L. Zhu, S. Yu, J. Zhu, and C. Wang, “CaMKII inhibition promotes neuronal apoptosis by transcriptionally upregulating Bim expression,” *Neuroreport*, 2016.
- [20] T. Rossetti *et al.*, “Memory Erasure Experiments Indicate a Critical Role of CaMKII in Memory Storage,” *Neuron*, 2017.
- [21] F. M. LaFerla, “Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer’s disease,” *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002.
- [22] I. Bezprozvanny and M. P. Mattson, “Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer’s disease,” *Trends in Neurosciences*. 2008.
- [23] Z. Gu, P. Zhong, and Z. Yan, “Activation of muscarinic receptors inhibits β -amyloid peptide-induced signaling in cortical slices,” *J. Biol. Chem.*, 2003.
- [24] X. Fang *et al.*, “A comprehensive analysis of the CAMK2A gene and susceptibility to Alzheimer’s disease in the Han Chinese population,” *Front. Aging Neurosci.*, 2019.

- [25] X. W. Liu *et al.*, “The calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-93 protects rat cerebral cortical neurons from N-methyl-D-aspartic acid-induced injury,” *Neural Regen. Res.*, 2013.
- [26] S. K. Hanson, J. C. Grotta, M. N. Waxham, J. Aronowski, and P. Ostrow, “Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii activity in focal ischemia with reperfusion in rats,” *Stroke*, 1994.
- [27] A. Hudmon *et al.*, “A mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association,” *J. Neurosci.*, 2005.
- [28] M. del C. Crdenas-Aguayo *et al.*, “Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity,” in *Neurochemistry*, 2014.

8. EKLER

8.1. Ek-1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Pınar Akan

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4335-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input checked="" type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	β -Amiloid Peptid Varlığında Nöronal Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMK-II) Değişimlerinin Nörodejenerasyon Sürecine Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Pınar Akan Tıbbi Biyokimya A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/27-12	Tarih:25.10.2018
	Prof.Dr. Pınar Akan 'ın sorumhusu olduğu "β-Amiloid Peptid Varlığında Nöronal Kalsiyum/Kalmodulin- Bağlılı Protein Kinaz 2 (CaMK-II) Değişimlerinin Nörodejenerasyon Sürecine Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
CALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>A.Şişman</i>
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>S.Özkardeşler</i>
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>S.Özkardeşler</i>
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Bilge Kara</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Ayhan Abacı</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>M. Arıcı</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>M. Bektaş</i>
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Y. Soysal</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>M. Erhan</i>

8.2. Ek-2 Özgeçmiş



ELİF İSTIRMAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi	23/01/1991
İletişim Adresi	Kızılay Mahallesi, 477/3. Sokak, No:5, Kat:zemin, Daire:2
Telefon	(554) 477 55 94
E-posta	elif.istirman@gmail.com 2016970002@ogr.deu.edu.tr
Web Adresi	

Öğrenim Bilgileri

31 Ağustos 2016 - Şu Anda (3 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.05 / 4.0

01 Eylül 2010 - 22 Ocak 2016 (5 yıl 5 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA PR.
Diploma Numarası: 2015/04/0121
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.6 / 4.0

TÜBİTAK Burs ve Destekleri



BİDEB Destekleri

ELİF İSTİRMAN, Yarışma Programları Müdürlüğü, 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Destek Sona Erdi, 2014 - 12.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

8.3. Ek-3 Çalışma İzni

 T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 

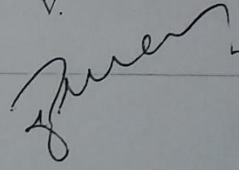
Sayı : 55224567-604.99 ~533 11/10/2018
Konu : Etik Kurul Lab.Kullanma İzni

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA,

Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Pınar AKAN'ın yürütücüsü olduğu "B-Amiloid Peptid Varlığında Nöronal Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMK-II) Değişimlerinin Nörodejenerasyon Sürecine Etkisi" başlıklı proje ile ilgili yapılacak olan çalışmaları Anabilim Dalımız Laboratuvarlarında yürütmeleri uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Pınar AKAN
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı
V.



Dokuz Eylül Üniversitesi
Adres: Mithatpaşa Cd. İçsıraltı yerleşkesi No:1606, 35340
Balçova/İzmir
Tel: 0232 412 22 22 Elektronik Ağ: www.deu.edu.tr
Kep Adresi: dokuzeyuluniversitesi@deu01.kep.tr

Bilgi İçin İrtibat:
Eda Nesrin OLUM
Dahili:
E-Posta: nesrin.olum@deu.edu.tr 