

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİBRASSİNOLİDİN ANTI-NÖRODEJENERATİF ETKİSİNİN TAUPATİ
MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ VE OTOFAJİ YOLAKLARI İLE İLİŞKİLİ OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Osman Orçun OKUMUŞ
1202020026**

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

OCAK 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPIBRASSİNOLİDİN ANTI-NÖRODEJENERATİF ETKİSİNİN TAUPATI
MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ VE OTOFAJİ YOLAKLARI İLE İLİŞKİLİ OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Osman Orçun OKUMUŞ
1202020026**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15 Şubat 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 15 Ocak 2019

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARATUĞ KAÇAR (İ.Ü)

OCAK 2019

ÖNSÖZ

Gerek bu tez çalışması kapsamında, gerekse lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca büyük bir özveri ile bana yol gösteren çok sevgili danışman hocam sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya,

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgileri ve zekalarına hayran olduğum, çok saygı duyduğum ve ilerideki bilimsel hayatım boyunca kendime örnek alacağım hocamlarım sayın Prof.Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Prof. Dr. Elif-Damla ARISAN ve Doç.Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Gerek deneysel çalışmalarımızda, gerekse laboratuvarlı lisans derslerimizde büyük bir özveri ile bize yardımcı olan çok sevdiğim hocalarım Araş.Gör.Özge BERRAK ve Araş. Gör Pelin ÖZFİLİZ'e; ayrıca hem deneysel çalışmalarım hem de özel hayatımda yanımda olan çok sevgili yüksek lisans ve lisans dostlarım; Kadriye KOYUNCU, Şule KAYA, Sena AKSU, Fırat YAŞAROĞLU, Talha YOL, Burak TANER, Tamer GÜMÜŞ, Derya BULUT, Merve KARATAŞ, Börteçine SEVGİN, Mervenur ÇOBAN, Beyzanur CEYLAN, Elif KANSIZ, Berre AKDENİZ, Şebnem MEHERREMLİ, Filiz AYRANGÖL, Merve UYSASOL, Pelin TUĞLU, Şevval ÖZAĞAR, Sedef ÇEVİKLİ, Berk TURNA, Berna ŞİMŞEK ve Rüya GİRAY'a,

Geç tanıdığım ama çok sevdiğim, bana bir abla ve kardeş olan grup arkadaşım Tuğba YENİGÜN'e,

Uzağımda olsalarda hep yakınımnda hissettiğim ve çok sevdiğim annem Melek OKUMUŞ, babam Ömer OKUMUŞ ve canım kız kardeşim Hilal OKUMUŞ'a;

Ayrıca 115Z037 no'lu COST projesi ile bu tez çalışmasını destekleyen TÜBİTAK ve İstanbul Kültür Üniversitesi'ne teşekkürlerimi borç bilirim...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xx
TABLO LİSTESİ.....	xxvii
ÖZET.....	xxviii
ABSTRACT.....	xxx
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARIN EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETİYOLOJİSİ.....	3
2.2 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR	4
2.2.1 Alzheimer Hastalığı	6
2.3 HÜCRE ÖLÜMÜ VE NÖRODEJENERASYON	10
2.3.1 Hücre Ölümünün Sınıflandırılması	10
2.3.2 Nöronal Programlı Hücre Ölümü ve Apoptoz	13
2.4 ALZHEİMER HASTALIĞININ GENETİĞİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMASI	19
2.4.1 Alzheimer'ın Genetik Alt Yapısı.....	19
2.4.2 Alzheimer Hastalığı ile İlgili Teoriler ve Amiloid Beta Peptidi Patolojisi.....	21
2.5 TAU PATOLOJİLERİNİN GENETİK VE MOLEKÜLER ALT YAPISI 27	
2.5.1 MAPT Geni, Tau Proteini ve Taupatilerin Genetik Altyapısı	27

2.5.2	Tau' nun Post-Translasyonel Modifikasyonlarının Taupatiler ile İlişkisi	30
2.6	TAUPATİLER İLE DİĞER PROTEİNOPATİLERİN İLİŞKİSİ	34
2.6.1	Amiloid-Beta İlişkili Hücresel Sinyal Yolakları	35
2.6.2	Nöroflament Patolojisi	36
2.6.3	Alfa-Sinüklein Patojisi	39
2.7	TAU KİNAZLARI İLE İLİŞKİLİ HÜCRESEL SİNYAL YOLAKLARI VE NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ	43
2.7.1	Glikojen Sentaz Kinaz-3	43
2.7.2	Sikline Bağımlı Kinaz-5 ve Nörodejenerasyon	50
2.8	ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ	52
2.8.1	Endoplazmik Retikulum Stresinin Moleküler Mekanizması	53
2.8.2	Nörodejeneratif Hastalıkların Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkisi	56
2.9	HÜCRESEL GERİ DÖNÜŞÜM SİSTEMLERİ VE NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ	58
2.9.1	Otofaji Çeşitleri ve Mekanizması	58
2.9.2	Moleküler Şaperonlar ve Nörodejenerasyon	61
2.9.3	HücreSEL Geri Dönüşüm Sistemlerinin Nörodejenerasyondaki Önemi	62
2.10	FEOKROMASİTOMA-12 HÜCRE HATTI	65
2.11	STEROİD TÜREVLERİ VE BRASSİNOSTEROİDLER	66
2.11.1	Bitkisel ve Hayvansal Steroidlerin Sinyal Mekanizması	67
2.11.2	Epibrassinolid	68
2.11.3	Steroid Türevlerinin Nörokoruyucu Etkisi	70
3	MATERYAL VE YÖNTEM	74
3.1	MATERYALLER	74
3.2	YÖNTEMLER	74

3.2.1	pRK5-EGFP-Tau Plazmidi Eldesi	74
3.2.2	Hücre Doku Kültürü.....	75
3.2.3	Doza Bağlı Hücre Canlılık Testi	76
3.2.4	Hücre Sağkalımının Tripan Mavisi Boyaması Sonrası Gösterilmesi ..	76
3.2.5	Hücre Akış Sitometresi	77
3.2.6	Fluoresan Mikroskopi	78
3.2.7	İmmunoblotlama	80
3.3	İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	82
4	SONUÇLAR	83
4.1	EPİBRASSİNOLİD'İN DOĞAL TİP PC12 HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ.....	83
4.1.1	MTT Testi ile Doğal Tip PC12 Hücrelerinde EBR'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi	83
4.1.2	EBR'nin Doza Bağlı Olarak Alzheimer Hastalığı ve Hücre Sağkalımı İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisinin Doğal Tip PC12 Hücrelerinde Gösterilmesi	84
4.1.3	Doğal Tip PC12 Hücrelerinde EBR'nin Doza Bağlı Olarak Hücre Ölümü, DNA Kırıkları, Mitokondri Membran Potansiyeli ve Reaktif Oksijen Türleri Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	86
4.2	TAUPATİ MODELİ PC12 HÜCRELERİNDE EBR'NİN DOZA BAĞLI OLARAK HÜCRE SAĞKALIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ .	88
4.2.1	<i>In Vitro</i> PC12 Taupati Modelinin Oluşturulması ve EBR Uygulamasının Tau Seviyesi Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi.....	88
4.2.2	Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Doza Bağlı Olarak Hücre Devrine Etkisinin Gösterilmesi	90
4.2.3	pRK5-EGFP-Tau Transfekte Edilmiş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Nörokoruyucu Etkisinin MTT ve Tripan Mavisi Sağkalım Analizleri ile Gösterilmesi	93

4.2.4	<i>İn Vitro</i> Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisinin Hücre Akış Sitometresi ve Fluoresan Mikroskopisi ile Gösterilmesi	95
4.2.5	Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Apoptoz ile İlişkili Proteinlerin Anlatımı Üzerindeki Etkisinin İmmunoblotlama ile Gösterilmesi	98
4.3	EBR'NİN TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE ALZHEİMER HASTALIĞI BİYOBELİRTECİ PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	102
4.3.1	EBR'nin Doza Bağlı Olarak Alzheimer Hastalığı Biyobelirteci Proteinler Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi	102
4.3.2	EBR'nin Terapötik Potansiyeli Yüksek Olduğu Düşünülen Dozunun Taupati Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde Alzheimer İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisininin Gösterilmesi	104
4.4	TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR'NİN FOSFOTİDİL İNOSİTOL 3 KİNAZ/PROTEİN KİNAZ B/RAPAMİSİNİN MEKANİSTİK HEDEFİ SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	108
4.4.1	Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde Doza Bağlı EBR Uygulamasının PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi	108
4.4.2	Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR Uygulamasının PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi	109
4.5	EBR 'NİN ER STRESİ VE MOLEKÜLER ŞAPERON SİSTEMLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.....	113
4.5.1	EBR'nin Doza Bağlı Olarak ER Stresi İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisinin İmmunoblotlama ile Gösterilmesi	113
4.5.2	EBR Uygulamasının ER Stresi ve Moleküler Şaperonlar Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi.....	114
4.6	EBR'NİN TAUPATİ MODELİ PC12 HÜCRELERİNDE OTOFAJİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.....	119

4.6.1	EBR'nin Taupati Modeli PC12 Hücrelerinde Otofaji ile İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisinin İmmünoyotlama ile Gösterilmesi.....	119
4.6.2	EBR'nin Taupati Modeli PC12 Hücrelerinde Otofajiye Olan Etkisinin Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi.....	122
5	TARTIŞMA	123
6	KAYNAKÇA.....	155
7	EKLER.....	175
7.1	KULLANILAN CİHAZLAR.....	175
7.2	HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI.....	176
7.3	KULLANILAN KİMYASALLAR.....	176
7.4	KULLANILAN ANTİKORLAR.....	178
7.5	KULLANILAN KİTLER.....	179

KISALTMALAR

- A1:**Bcl-2 ilişkili protein A1
ABCA1: ATP-bağlanma kaseti taşıyıcısı A1
Ach: Asetil kolin
AChE: Asetilkolin esterasez
ADDLs: Amiloid-türevli difüze olabilen ligandlar
AGN:Arjirofilik tanecik hastalığı
AH (AD): Alzheimer Hastalığı
Aha1: Cdc37 ile ATPaz homolog 1
AICD: APP intrasellüler domain
AIF:Apoptozu teşvik edici faktör
AKT (PKB): Protein kinaz B
Ala (A): Alanin
ALS:Amiyotropik lateral sklerozis
Ambra1: Otofaji ve Beklin 1 düzenleyici 1
AMP:Adenozin monofosfat
AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4 izooksazol-propiyonik
AMPA: AMPA reseptörü
AMPK: AMP ile aktive edilen protein kinaz
AP-1: Aktivatör protein-1
APAF1: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1
APC: Adenomatous poliposis koli
APE-1: Apürinik/apirimidinik endonükleaz-1
APOE: Apolipoprotein E
APP: Amiloid öncül proteini
APP α : Salgılanan APP-alfa
APP β :Salgılanan APP-beta
AR: Androjen reseptörü
AR-: AR taşımayan hücre hattı

AR+: AR taşıyan hücre hattı
AR-A014418: N-(4-Metoksibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) üre
ARC: Kaspazla apoptozun baskılayıcısı
Asetil-CoA: Asetil koenzim A
ASK: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz
ATCC: American Type Culture Collection
ATF: Aktive Tf
ATF6f: Sitosolik ATF6 fragment
Atg: Makrotofaji-ilişkili proteinler
ATG16L1: ATG16 benzeri 1
ATG3: E2 benzeri Ub-benzeri konjuge edici enzim
ATG7: E1 benzeri Ub-benzeri düzenleyici aktive edici enzim
ATM: Ataksi-telenjektazi kinaz
ATP: Adenozin trifosfat
A β : Amiloid beta
Bad: Bcl-2 ilişkili ölüm düzenleyicisi
Bag1: Bcl 2-ilişkili athanojen 1
Bak: BCL-2 antagonist/öldürücü-1
BAK1: BRI1 ilişkili reseptör kinaz 1
Bax: Bcl-2-ilişkili X protein
BBB: Kan-beyin bariyeri
Bcl-2: B-hücresi lenfoma-2
Bcl-w/ Bcl2-L-2: Bcl-2 benzeri 2
Bcl-xL: Bcl-ekstra büyük
BCR: B-hücre reseptörü
BDNF: Beyin-türevli nörotrofik faktör
Beklin1: Sargılı bobin Miyozin-benzeri Bcl2-ilişkili protein
BER: Baz-kesip çıkarma onarımı
BES1: BR duyarlı EMS baskılayıcı 1 Tf
BIN2: BR duyarlı 2 kinaz (GSK3 benzeri kinaz)
Bid: Bax benzeri BH3 protein
Bik: Bcl-2 etkileşimli katil
Bim: Bcl-2 ile etkileşime giren hücre ölümü aracısı
BİP: İmmunoglobulin ağır zincir bağlanma proteini

BKI1: BRI1-kinaz inhibitör 1
BMF: Bcl-2 değiştiştirici faktör
BMK1: Büyük MAPK-1
BMP: Kemik morfojenik protein
bNIP3: Bcl-2 etkileşimli protein-3
BOS: Beyin-omurilik sıvısı
BR: Brassinolid
BRI1: Brassinolid duyarlı 1 reseptörü
BSA: Sığır serum albumini
BSK1: BR sinyalizasyon kinaz 1
BSU1: BRI1-baskılayıcı 1
BZR1: Brassinazol-direnç 1 Tf
C.elegans: Caenorhabditis elegans
C: Kaspaz
Ca: Kalsiyum
c-Abl: Hücresel Abelson tirozin kinaz
CAD: Kaspasla aktive edilen endonukleaz
CALNX: Kalnexin
CALR: Kalretikulin
C-alt ünite: Katalitik alt ünite
CaMK: Kalsiyum-kalmodülin bağımlı protein kinaz
CaMKK: CaMK kinaz
CARD: Kaspaz aktivasyon güçlendirme domaini,
CAT: Katalaz
CBD: Kortikobazal dejenerasyon
CD95/Fas: Farklılaşmanın kümesi-95
cdc: Hücre bölünme devri kinazı
CDG1: Temel diferansiyel büyüme 1 kinazı
CDK: Sikline bağımlı kinaz
CDKR1 (p35): CDK5 düzenleyici alt ünite 1
CDKR2 (p39): CDK5 düzenleyici alt ünite 2
CFLAR: FADD benzeri apoptoz düzenleyicisi
CG: Sitozin-Guanin
CHAT: Kolin O-Asetiltransferaz

CHIP: HSP70'in C-ucu-etkileşimli düzenleyici proteini
CHOP:CCAAT/yükseltici-bağlanma-proteini-homolog protein
cIAP:Hücrel apoptoz inhibitörü proteinler
CK:Kasein kinaz
CKI:Cdk-bağımlı inhibitörler
CMA: Şaperon aracılı otofaji
CO₂: Karbondioksit
COST: European Cooperation in Science & Technology
CSF: Serebrospinal sıvı
Cu: Bakır
C-ucu: Karboksi ucu
Cyt-c: Sitokrom-c
DAPI: 4,6-Diamidino-2-fenilindol
DAPK:Ölüm ilişkili protein kinaz
DCFH-DA: Dikoloro-Dihidro-Fluoreskein Diasetat
DDR:DNA hasarı cevabı
DED: Ölüm efektör domaini
DISC: Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi
Diablo:Direkt cIAP 1/2' ye bağlanan protein
DiOC6: 3,3'-Diheksilokarbosiyanin İyodür
DLB: Demans ile birlikte görülen LCH
DMF: Dimetil formamid
DMSO: Dimetil sülfoksit
Dsh: Dishevelled
DUB: Deubikitinaz
Dyrk: İkili-spesifik protein kinaz
E segment: Glu açısından zengin segment
E.coli:*Escherichia coli* (Koli basili)
E: Ub ligaz
EBR: Epibrassinolid
eIF2: Ökaryotik translasyon başlama faktörü-2
EMS: Etil metansülfonat
Endo-G: Endonükleaz-G
EphA4:Efrin tipi-A reseptör 4 öncülü

EphB2:Efrin tipi-B reseptör 2 öncülü
ER: Endoplazmik Retikulum
ERAD: ER-ilişkili protein degradasyonu
ERK: Ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinaz (p44/42)
Ero1 α :ER oksidoredüktaz 1 α
ERp57: ER-yerleşik proteini 57
ERSE: ER stres cevap elementi
ERSRG: ER stresi cevap genleri
ETOH: Etanol
ETS: Elektron taşıma sistemi
FADD: Fas ilişkili ölüm domaini
FAK: Fokal adezyon kinaz
Fas-L: Fas ligandı
fATF6: Kesilmemiş ATF6
FBS: Fetal Sığır Serumu
FGF:Fibroblast büyüme faktörü
Fgr: Felin Gardner-Rasheed sarkoma viral onkogen homoloğu
FIP200: FAK- ilişkili protein (200kDa)
f-Kaspaz: İnaktif öncül Kaspaz-3
FLICE:FADD-benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzim
FLIP: FLICE inhibitör protein
FLIP_L: Uzun FLIP
FLIP_S: Kısa FLIP
FOXO:Çatal kafa kutusu O Tf'leri
fPARP: Aktif kesilmemiş PARP
FTD :Frototemporal demans
FTDP-17: Parkinsonizm ile birlikte gelişen FTD-17
FUS: Sarkomda erimiş RNA bağlanma proteini
GABA: Gama-aminobutirik asit
GADD34:DNA hasarı ile tetiklenen protein 34
Glu (E): Glutamik asit
Gly (G): Glisin
GPx:Glutatyon peroksidaz
GRK: G-protein bağlantılı reseptör kinaz

GRP:Glukoz-düzenlenmiş protein
GSK3: Glikojen sentaz kinaz-3
GST: Glutasyon-S-transferaz
GTPaz: Guanozin trifosfatı hidrolize eden enzim
GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
H₃:Histamin reseptörü tipi
HCL: Hidroklorik asit
HDAC: Histon deasetilaz
HEK293: İnsan embriyonik böbrek hücresi-293
HIV: İnsan immün yetmezliği virüsü
HMG-CoA:5-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
HMW: Yüksek moleküler ağırlıklı
HOP: TRP-domaini içeren: Hsp70/Hsp90 organize edici protein
HRD1: HMG-CoA redüktaz degregasyon 1 homolog
Hrk: Apoptoz aktivatörü Harakiri
HRP:*Armoracia rusticana* bitkisinden izole edilen peroksidaz
HSFs: Isı şok faktörleri
HSPs: Isı şok proteinleri
IDE:İnsülin degrede edici enzim
IF: Ara filamentler
IGFs: İnsülin-benzeri büyüme faktörleri
IkB:Kappa B'nin inhibitörü
IKK: IkB kinaz
IL:İnterlökin
IP3R: İnositol trifosfat reseptör
IR:İnsülin reseptörü
IRE: Demir (Fe⁺) cevap elementi
IRE1 α :İnositol gerektiren enzim 1 α
IRS-1: İnsülin reseptör subsratı-1
ISF: İnterstisyel sıvısı
İCAD: CAD inhibitörü
JNK:c-Jun N-ucu kinazı
Kalpain:Kalsiyum ile aktive olan lizozomal olmayan sistein proteaz
Kaprosinol: (22R,25R)-20 α -spirost-5-en-3 β -yl heksanoat

Kaspaz: Sistein–aspartik proteaz
kATF6: Kesilmiş ATF6
kb: Kilobaz
kDa: Kilodalton
KFERQ: Lizin/Fenilalanin/Glutamik asit/Arjinin/Glutamin motifi
kKaspaz3: Aktif kesilmiş Kaspaz 3
KSP: Lizin-Serin-Prolin domaini
KTKEGV: Lizin-Treonin-Lizin-Glutamik asit-Glisin-Valin tekrarları
KXGS: Lizin-X-Glisin-Sistein
L: Lösin
LAMP-2A: Lizozom-ilişkili membran proteini-2
LB: Luria Bertani besiyeri
LBVAD: AH'nin Lewy cisimciği türevidir
LC3A/B: MAP 1-hafif zincir 3 α/β
LCH:Lewy cisimciği hastalığı
Lck: Lenfosit hücresi -spesifik-TyrK
LDL:Düşük yoğunluklu lipoprotein
LiCl: Lityum Klorür
LPS: Lipopolisakkaritler
LRP1: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein 1
LXR: Karaciğer-X-reseptör
Lyn: Yes-ilişkili yeni protein TyrK
Lys (K): Lizin
MAM: Mitokondri ilişkili ER membranı
MAP: Mikrotübül ilişkili proteinler,
MAPK: Mitojenle aktive edilen kinaz
MAPT:Tau geni
MARK:Mikrotübül afinite düzenleyici kinaz
Mcl-1:Myeloid hücreli lösemi-1
Mdm2: Fare çift dakika 2 enzimi
MEF: Fare embriyonik fibroblast hücresi
MEF2D: Miyosit-spesifik yükseltici faktör-2D
mg: Miligram
mGluR5:Metabotropik glutamat reseptörü-5

ml: Mililitre
mm: Milimetre
mM: Milimolar
MMP: Mitokondriyal membran geçirgenligi
MPP⁺: 11-metil-4-fenilpiridinyum
MSA: Çoklu sistem atrofisi
MSS: Merkezi sinir sistemi
MTB: Mikrotübül bağlanma bölgesi
mtDNA: Mitokondriyal DNA
mTOR: Rapamisinin mekanistik hedefi
mTORC: mTOR kompleksleri
MTT: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
Myc: Miyelositomatosis viral onkogen homologu
Myt1: Membran-ilişkili Tyr ve Thr-spesifik Cdc2 inhibitör kinaz
N: Arparjin
NAC: A β olmayan komponent
NACP: Amiloid içerikli olmayan plaklar
NCDD: Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi
NF: Nörofilament
NF-AT: T hücrelerinin nuklear faktörü
NF-H: Ağır-NF
NF-L: Hafif -NF
NF-M: Orta -NF
NFT: Nörofibriller yumakların
NF κ B: B hücresi nuklear faktör kappa-hafif zincir-aktivatörü
NGF: Sinir büyüme faktörü
NGFR: NGF reseptörü
NH (NDs): Nörodejeneratif Hastalıklar
nm: Nanometre
NMDA: N-metil-D-aspartik asit
NMDR: NMDA reseptörü
NO.: Nitrik oksit
NOS: Reaktif nitrojen türevleri
Noxa: Porbol-12-Miristat-13-Asetat-uyarılmış protein 1

NPC: Nöral öncül hücre
Nt:Nörotrofin
NT2N: Ntera/D1 teratokarsinoma
N-ucu: Amino ucu
OD: Optik yoğunluk
OHC: Hidroksikolesterol
ÖR +: ÖR taşıyan hücre hattı
ÖR: Östrojen reseptörü
P: Prolin
p3: 3kDa peptid
p44/42:Mitojenle aktive edilen protein kinaz-44/42
p53: Apoptozun-tümör-ilişkili proteini -53
p62: Ub-bağlanma proteini Sekuestozom 1
p70S6K:Ribozomal protein S6 kinaz beta-1
p90RSK1: Ribozomal protein p90 S6 kinaz-1
PARP: Poli ADP-riboz polimeraz
PAS: Fagofor oluşturulma bölgesi
PBS: Fosfat- tamponlu tuz çözeltisi
PC12: Feokromasitoma hücresi-12
PCD: Programlı hücre ölümü
PDI: Protein disülfüt izomeraz
PDK-1:Fosfoinositide bağımlı kinaz-1
PERK:Protein kinaz RNA-benzeri ER kinaz
pH: Hidrojenin gücü
PH:Parkinson hastalığı
PHD:Demans ile birlikte görülen PH
PHF: Eşleşmiş helikal filament
pI:İzoelektrik nokta
PI:Propidyum İyodür
PI3K:Fosfotidil-inositol-3-kinaz
PIK3C3 (Vps34): PI3K-katalitik alt ünite tip-3
PKA:Protein kinaz A
PKC: Protein kinaz C
PLC: Fosfolipaz-C

PLK: Polo-benzeri kinaz
PP: Protein fostataz
PRD: Prolince zengin bölge
Proteinopati: Protein birikimi kaynaklı hastalıklar
PrPc: Hücrel prion proteini
Prx2: Peroksiredoksin-2
PSA: Puromisine duyarlı aminopeptidaz
PSEN1/2: Prenesenilin-1/2
PSP:İlerleyen supranuklear palsi
PSS: Periferik sinir sistemi
p-tau: Fosfo tau
PUC: Çoklu-ubikuitin zinciri
PUMA: p53 yükseltici-düzenleyicisi
PVDF: Poliviniliden diflorür
R: MTB tekrar sayısı
Rab7: Ras-ilişkili GTP-bağlanma proteini 7
RAGE: İleri glikozilizasyon son ürün reseptörleri
Raptor:mTOR'un rapamisine duyarlı refakatçısı
Ras: Rat sarkoma viral onkogen homolog
REL: Retikulo endoteliosiz
RGC: Retinal gangliyon hücreleri
RIDD:IRE1 α -bağımlı mRNA yıkılımı
RIPK: Reseptör ilişkili serin / trenonin protein kinazlar
Rictor:mTOR' un rapamisine duyarlı olmayan refakatçısı
ROS: Reaktif oksijen türleri
ROSC: Roskivitin
rpm: Santrifüjün dakikadaki devir sayısı
rRNA: Ribozomal RNA
RTK: Reseptör TyrK
RXR: Retinoik X-reseptörü
S:Sedimenastasyon katsayısı
SAPK: Stres ile aktive olan kinaz
SCNA: Alfa-syn geni
SDS: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Ser (S): Serin
Shh: Sonic-hedgehog
SH-SY5Y: İnsan kemik iliği nöroblastoma hücresi
SILAC: Hücre kültüründe amino asitlerin stabil izotoplar ile işaretlenmesi yöntemi
Sinükleopatolojiler: α -syn'in lewy cisimciği olarak birikim gösterdiği hastalıklar
siRNA: Kısa susturucu RNA
SK-N-AS: İnsan beyin nöroblastoma hücre hattı
SMA: Spinal muskular atrofi
Smac: İkincil mitokondri türevli Kaspaz aktivatörü
SMST:Sporadik çoklu sistem taupatisi
SNARE: Çözünür N-etilmaleimid -duyarlı faktör bağlanma protein reseptör
SNP: Tek nükleotid değişimleri
SOD1: Süperoksit dismutaz
SP/TP:Sistein-Prolin/ Treonin-Prolin motifi
SP1/2: Bölge 1/2 proteazlar
SR: Steroid hormon reseptörleri
Src: Rous sarkoma
STAT: Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü
Syk: Spleen TyrK
TAR:Transaktivatör Tat bağımlı RNA düzenleyici element
Tat: HIV Transaktivatör proteini
Tau: Tübülin-ilişkili ünite
Taupati:Tau proteini ile ilişkili hastalıklar
t-Bid: Kesilmiş Bid
TBS: Tris-tamponlu tuz çözeltisi
TCA: Trikarboksilik asit devri
TCR:T-hücresi reseptörü
TDP43: TAR-DNA bağlanma proteini 43
Tf: Transkripsiyon faktörü
TFEB: Transkripsiyon faktör E kutusu
TGN: Trans golgi ağı
Thr(T): Treonin
Tip60: Tat-etkileşimli-60kDa protein

TLR: Toll benzeri reseptör
TM:Transmembran domain
TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptörü
TOR: Mitokondri dışı membran translokazı
TP53: p53 geni
TPK:Tau protein kinaz
TRAF:TNF reseptörü ilişkili faktör
TRAIL:TNF-ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TRAILR: TRAIL reseptörü
TrkA: Tropomiyozin reseptör kinaz A
TRP: Geçici reseptör potansiyel domaini
TTL6: Tubulin tirozin ligaz-benzeri enzim 6
Tyr K: Tirozin kinaz
Tyr: Tirozin
U: Ünite
Ub: Ubikuitin
UCHL1: Ub-C-ucu-hidrolaz L1
ULK1: Unc51 (*C.elegans*)-benzeri otofaji aktive edici Ser/Thr kinaz
UPR: Katlanmamış protein cevabı
UPS:Ubikuitin-proteozomal sistem
UV:Ultraviyole radyasyon
UVRAG: UV-dirençli-ilişkili protein
V: Valin
VAPB: Vesikül-ilişkili membran protein- ilişkili protein B
V-ATPaz: Vakuolar tip-ATPaz
VDAC:Voltaj-bağımlı anyon kanalı
Vps: Vakuolar protein sınıflandırma kompleksi
WHO:Dünya Sağlık Örgütü
Wnt:Wingless-tipi protein
XPB1:X-kutusu bağlanma proteini-1
XPB1s: Kesilmiş XPB1 izoformu
Yes: Yamaguchi sarkoma virüs onkogeni
Zn: Çinko
z-VAD: Karboksibenzoksi-valil-alanil-aspartil-O-metil

α -CTF: Alfa-C-ucu fragmenti

α -sekretaz: Alfa bölgesinden APP'yi kesen enzim

α -syn: Alfa-sinüklein

β sekretaz /BACE: Beta bölgesinden APP'yi kesen enzim

β -katenin: Beta-katenin

γ sekretaz: Gama bölgesinden APP'yi kesen enzim

μ l: Mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrat cinsinden sıcaklık

μ g: Mikrogram

μ M: mikromolar

14-3-3: PKC inhibitör protein-1

5-HT₆: Serotonin reseptörü tipi

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2. 1.** Demans ile ilişkili hastalıkların ölüm nedenleri içerisindeki yeri (World Health Organization - Global Health Observatory, 2016). İskemik kalp hastalıkları dünyadaki ölüm nedenlerinin başında gelirken onu inme, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar, solunum güçlüğüne neden olan enfeksiyonlar ve demans ile ilişkili hastalıklar izlemektedir. 3
- Şekil 2 2** Başlıca nörodejeneratif hastalıkların etiyojisi ve merkezi sinir sisteminde etkiledikleri bölgeler (Bertram ve Tanzi, 2005). 4
- Şekil 2.3** Dünyadaki AH prevalansının uzun yıllar içerisindeki istatistiki tahmini (Brookmeyer ve ark., 2007). Çalışmaya göre 2020 yılında toplam 41, 27 milyon olması beklenen erken ve geç aşamalı AH vakalarının 2050 yılında ortalama yaşam süresinin artmasıyla yaklaşık 106,23 milyona ulaşması beklenmektedir. Erken aşamalı AH vakaları mavi tonları ile, geç aşamalı AH vakaları ise kırmızının tonları ile gösterilmiştir. Mavi ve kırmızı tonları koyulaştıkça hastalığın evreleri ilerlemektedir. İleri evre hastaların çoğu hemşireli bakıma muhtaç olmaktadır. 7
- Şekil 2.4** Düzenlenen hücre ölümü çeşitlerinin morfolojik ve biyokimyasal olarak şematize edilmesi. 12
- Şekil 2.5** Kaspazların yapısının sematik olarak gösterilmesi ve çeşitleri (Fink ve Cookson 2005). Kaspaz ailesi 3 büyük gruptan oluşmaktadır. Grup-1: inflamatuvar kaspazlar, Grup-2: apoptozu başlatan kaspazlar, Grup-3: apoptotik efektör kaspazlar. CARD: Kaspaz aktivasyon güçlendirme domaini, DED: Ölüm efektör domaini. Efektör domainleri de iki kısımdan oluşmaktadır: büyük katalitik alt birim (p20) ve küçük katalitik alt birim (p10). 13
- Şekil 2 6** Bcl-2 ailesi proteinlerinin çeşitleri ve genel yapısal formu (Anvekar ve ark., 2011). 15
- Şekil 2.7** Apoptozun biyokimyasal mekanizması ve diğer bazı hücre ölümü çeşitleri ile etkileşimi (Indran ve ark, 2011). 18
- Şekil 2.8** Kaspaza bağımlı apoptotik yolda DNA fragmentasyonunun şematize edilmesi (Deka ve Singh, 2017). 19

Şekil 2. 9 Amiloid öncül proteinin, Amiloid beta üreten ve üretmeyen proteolitik işlenim yolları (O'Brien ve Wong, 2016).	23
Şekil 2. 10 İntraselüler Amiloid beta'nın mitokondri üzerindeki etkileri (Majd ve ark, 2015).	24
Şekil 2. 11 Alzheimer ve nöroinflamasyon arasındaki olası ilişkilerin şematize edilmesi. (W.Wang ve ark, 2015).	25
Şekil 2. 12 MAPT geni ve tau mRNA'sının alternatif kesilim ürünleri (Maina ve ark., 2016). MAPT, 16 eksondan oluşmaktadır. Ekson- 14 Tau mRNA'sının 3' transkripsiyon edilmeyen kısmını içermektedir. Ekson-2/3/10' ün alternatif kesilimi tau proteinin MSS'de yaygın şekilde bulunan 6 izoformunun çeşitliliğini sağlamaktadır. Tau proteini yapısal olarak dört bölgeden oluşmaktadır: Amino (N) ucu asidik bölgesi, proline zengin bölge (PRD), mikrotübül bağlanma tekrar domaini (MTB) ve karboksil (C) ucu bölgesi.	28
Şekil 2. 13 Nükleer Tau' nun potansiyel görevleri (Maina ve ark., 2016).....	29
Şekil 2. 14 Tau proteininin sağlıklı nöronlardaki olası görevlerinin şematize edilmesi (Wang ve Mandelkow 2016).....	30
Şekil 2. 15 Taupatilerin nöronlardaki muhtemel etkilerinin şematize edilmesi (Wang ve Mandelkow 2016).....	31
Şekil 2. 16 Tau agregasyonunun aşamaları (Lim ve ark, 2014).	32
Şekil 2. 17 2N4R Tau proteini üzerindeki farklı fosfo-epitop bölgelerini hedefleyen farklı tau kinazları (Tenreiro ve ark, 2014). Mavi renkle belirtilenler Sistein-Prolin/Treonin-Prolin (SP/TP) motiflerini, sarı ile belirtilenler Lizin-X-Glisin-Sistein (KXGS) motiflerini, gri ile belirtilenler prolin yönelimli kinazların (örneğin Fyn, LRRK2) fosforile ettiği epitopları ve yeşil ile belirtilenler ise prolin yönelimli olmayan serin/ treonin kinazların hedeflediği epitopları göstermektedir. Kırmızı ile belirtilen kısımlar ise FTDP-17 ile ilişkili bazı mutasyonları göstermektedir.....	33
Şekil 2. 18 Hücre dışı Amiloid beta oligomerleri ile tau birikimi ve nöronal ölüm arasındaki ilişkiler (Wray ve Noble, 2009).	36
Şekil 2. 19 NF'lerin birincil yapıları ve modifikasyonları (Khalil ve ark, 2018).....	37
Şekil 2. 20 Nörofilament hiperfosforilasyonu ve nöronal ölüm arasındaki ilişki (Lee ve ark, 2012)	38
Şekil 2. 21 Alfa-sinükleinin birincil yapısı, hedefleyen protein kinazlar ve fosforilasyon bölgeleri (Tenreiro ve ark, 2014).	40

Şekil 2. 22 Amiloid beta, alfa-sinüklein ve tau' nun potansiyel etkileşimleri (Marsh ve Blurton-Jones 2012)	41
Şekil 2. 23 Alfa-sinüklein ve tau'nun spesifik DNA bölgelerine bağlanarak nöronal ölümü tetiklemesine dayanan hipotezler (Rao ve ark, 2012).	43
Şekil 2. 24. Memelilerde GSK3 proteininin farklı paraloglarının şematize edilmesi (Cai ve ark, 2012).....	45
Şekil 2. 25 GSK3 ile ilişkili sinyal yollarına genel bir bakış (Maurer ve ark, 2014).	46
Şekil 2.26 Nörotoksik sinyaller altında CDK5 aracılı nöronal ölümün şematize edilmesi (Zhu ve ark, 2011).	52
Şekil 2.27 Memelilerde ER stresi ve UPR ilişkili sinyal yolları (Cabral-Miranda ve Hetz 2017).....	54
Şekil 2.28 Nörodejeneratif hastalıklarda biriken proteinlerin ER ve UPR üzerindeki etkileri (Hetz ve Saxena 2017).....	57
Şekil 2.29 Makrootofajinin moleküler mekanizması ve ER stres ile ilişkisi (Sano ve Reed 2013).	61
Şekil 2. 30 Moleküler şaperonların, otofaji ve UPS ile ilişkili olarak AH'deki rolü (Maiti ve ark, 2014).....	64
Şekil 2.31 PC12 hücrelerinin az yoğun ve çok yoğun olduğu durumlardaki morfolojileri (ATCC, 2016).	66
Şekil 2.32. Hayvansal steroidler ve BR'lerin moleküler yapısı (Becraft, 2001).....	67
Şekil 2. 33 Steroid hormonların hayvan ve bitki hücrelerindeki farklı moleküler etkileşimleri (Vukašinovic ve Russinova, 2018).	68
Şekil 2. 34 24-Epibrassinolid'in moleküler yapısı (Kim ve ark, 2016).....	69
Şekil 3. 1. SH-SY5Y hücre hattına transfeksiyonu yapılan doğal tip (wt) tau plazmiti. (Addgene #46904.).....	75
Şekil 4. 1 EBR'nindoğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi. 24 saat boyunca EBR'nin 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 15, 20 ve 30µM dozları uygulanması sonucunda bağıl hücre canlılığı ölçülmüştür. 83	
Şekil 4. 2 EBR'nin doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak AH ve hücre sağkalımı ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi. EBR 'nin doza bağlı etkisi, WT PC12 hücrelerinden total ve nüklear-sitoplazmik protein izolasyonu sonucu elde edilen eksraktların SDS-PAGE ile ayrılması ve ardından uygun antikorlar ile işaretlenmesi ile gösterilmiştir. Sonuçlar en az 2	

bağımsız deneyde gösterilmiş olup total ve sitoplazmik eksraktlar için β -Aktin, nüklear ekstraktlar için ise Histon 3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır..... 85

Şekil 4. 3 Doza bağlı EBR uygulamasının doğal tip PC12 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli, ROS seviyesi, DNA kırıkları ve hücre ölümüne etkilerinin fluoresan mikroskobu boyamaları ile gösterilmesi. 1, 10 ve 20 μ M EBR'nin bu etkilerinin gösterilmesi için sırasıyla DiOC6, DCFH-DA, DAPI ve PI boyamaları yapılmıştır. Verilen sonuçlar yapılan 3 bağımsız deneyden birini temsil etmektedir.87

Şekil 4. 4 PC12 hücrelerine pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfeksiyon ve taupati oluşturma başarısının immüno blotlama yöntemi ile gösterilmesi. AH ilişkili farklı antikoların kullanımı ile kontrol grubu PC12 hücreleri ve pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilmiş hücreler immüno blotlama yöntemi ile kıyaslanmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir . Yükleme kontrolü olarak β -tubulin kullanılmıştır. 88

Şekil 4. 5 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilmiş PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağlı olarak (1,10 ve 20 μ M) tau anlatımı ve kesilimi üzerindeki etkisinin immüno blotlama ile gösterilmesi. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 deney tekrarını temsil etmektedir. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır. 89

Şekil 4. 6 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen veya edilmeyen hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak hücre devrine etkisi. 1,10 ve 20 μ M EBR uygulanan hücreler doğal tip PC12 veya pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücreleri, fiksasyon işleminin ardından hücre akış sitometresinde analiz edilmişlerdir. Hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür. 92

Şekil 4. 7 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen veya edilmeyen hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin, LiCl ile karşılaştırmalı olarak MTT yöntemi ile gösterilmesi.EBR (1ve 10 μ M) ile LiCl' (1 ve 10 μ M) nin çözücüsü olan DMSO'nun hücre canlılığına etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen verilerin grafiği grafiği Graph Pad .. kullanılarak çizilmiş ve veriler analiz edilmiştir. Uygulanan kondüsyonlar farklı desenler ile gösterilmiş, kondüsyonların desenleri grafiğin yanındaki rehberde belirlenmiştir. Bu grafik en az 3 bağımsız deneyin ortamasını temsil etmektedir..... 94

Şekil 4. 8 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen veya edilmeyen PC12 hücrelerinde EBR 'nin hücre sağkalımına etkisinin LiCl karşılaştırmalı olarak tripan mavisi sağkalım analizi ile gösterilmesi. Bu deneyde 10 μ M EBR ve 10 μ M LiCl

kullanılmıştır. Bu grafik 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir. Tripan mavisi ile boyanan hücreler, ölü hücre sayısı hesaba katılmaksızın sağ kalan hücrelerin sayısı belirlenmiştir. 95

Şekil 4. 9 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin hücre ölümüne etkisinin Aneksin V/PI yöntemi ile gösterilmesi. Deneyde 10 μ M EBR kullanılmıştır. Hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür. 96

Şekil 4. 10 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin hücre ölümü ile ilgili bileşenler üzerindeki etkisinin fluoresan mikroskopisi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR'nin etkileri DiOC6, Mitotracker, DCFH-DA ve PI boyamaları ile gösterilmiştir. Görüntüler en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir. 97

Şekil 4. 11 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR uygulamasının ROS üretimi üzerindeki etkisinin hücre akış sitometresi ile gösterilmesi. Deneyde 10 μ M EBR kullanılmıştır. Farklı renklerle ifade edilen kondüsyonlardaki PC12 hücreleri kaldırılmış, DCFH-DA ile boyanıp karanlıkta bekletilmiş ve ardından hücre akış sitometresinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür. 98

Şekil 4. 12 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak apoptoz ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immünoblotlama tekniği ile gösterilmesi. EBR'nin 1 ve 10 μ M'lık dozları kullanılmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. Bu sonuç birbirinden bağımsız en az 2 deneyi temsil etmektedir. 99

Şekil 4. 13 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin pro-apoptotik proteinler ve apoptoz düzenleyicileri üzerindeki etkisinin immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir. 101

Şekil 4. 14 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağlı olarak AH ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 1 ve 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 deneyi temsil etmektedir. 103

Şekil 4. 15 EBR'nin AH biyobelirteci proteinlerin anlatımı üzerindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi. Deneşlerde 10 µM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmış olup bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.....	105
Şekil 4. 16 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin AH ilişkili kinazlar, ve proteazlar üzerindeki etkisinin immünoiblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneşlerde 10µM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 deneyi temsil etmektedir.....	106
Şekil 4. 17 EBR 'nin taupati modeli oluşturulmuş PC2 hücrelerinde β -kateni'in nuklear göçüne ve nukleusta konumlanan p-tau seviyesi üzerindeki etkisinin nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu ve immünoiblotlama ile gösterilmesi. Deneşlerde 10µM EBR kullanılmıştır. Yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ekstrakta β-aktin, nuklear ekstrakta H3 kullanılmıştır. Bu sonuç birbirinden bağımsız en az 3 deneyi temsil etmektedir.....	107
Şekil 4. 18 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde doza bağı EBR uygulamasının GSK3 ilişkili PI3K/Akt/mTOR sağkalım yolağı üzerindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi. Deneşlerde 1ve 10 µM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır.	109
Şekil 4. 19 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi. Deneşlerde 10 µM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.....	112
Şekil 4. 20 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağı olarak ER stresi ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi. Deneşlerde 1 ve 10µM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.	114
Şekil 4. 21 Taupati modeli PC12 hücrelerinde EBR'nin ER stresi ve moleküler şaperon sistemleri üzerindeki etkisinin immünoiblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneşlerde 10µM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β- aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.....	117
Şekil 4. 22 Taupati modeli PC12 hücrelerinde EBR'nin ER stres ile ilişkili olarak NFκB p65'in nuklear göçüne olan etkisinin nuklear -sitoplazmik protein izolasyonu ve immünoiblotlama yöntemi ile gösterilmesi.Deneşlerde 10µM EBR kullanılmıştır.	

Yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ekstrakta β -aktin, nuklear ekstrakta H3 kullanılmıştır. 118

Şekil 4. 23 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin otofaji ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoablota yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yüklem kontrolü olarak β - aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir..... 121

Şekil 4. 24 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin otofaji ile ilişkili üzerindeki etkisinin floresan boyamaları ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. 122

Şekil 5. 1 EBR'nin taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerindeki etkinliğinin olası moleküler mekanizması..... 154



TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Alzheimer Hastalığı risk faktörleri	10
Tablo 2. 2. Alzheimer Hastalığı patogeneğinde direkt veya risk faktörü olarak etkili olan 20 önemli gen(Khanahmadi ve ark, 2015).	20
Tablo 7. 1 Kullanılan Cihazlar	175
Tablo 7. 2 Hücre kültürü donanımları	176
Tablo 7. 3 Kullanılan kimyasalların listesi.....	177
Tablo 7. 4 Kullanılan antikorların listesi.....	178
Tablo 7. 5 Kullanılan kitlerin listesi	180

ÖZET

Alzheimer Hastalığı (AH), demansın en fazla gözlenen biçimi olup yaşlı nüfusun artması ile gelecek yıllarda görülme sıklığının da artması beklenmektedir. AH nadiren ailesel, sıklıkla ise sporadik nedenlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. AH patolojisinde temel olarak senil plaklar ve nörofibriller yumakların(NFT) varlığı söz konusudur. NFT oluşumlarına ayrıca farklı taupatiler, bazı sinükleopatiler ve prion kökenli hastalıklarda da rastlanmaktadır. Tau'nun anormal fosforilasyonu onun NFT oluşturmasını tetiklediğinden, tau kinaz inhibitörlerinin kullanımı AH ve diğer taupatilerde temel, NFT oluşumunun gözlemlendiği diğer proteinopatilerde ise yardımcı terapötik strateji olarak önem taşımaktadır. AH ve diğer nörodejeneratif hastalık (NH)'ların patolojisinde endoplazmik retikulum (ER) stresi ve otofaji temel hücresel olaylardır ancak nörodejeneratif veya nörokoruyucu rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Epibrassinolid (EBR); brassinosteroid (BR)'ler sınıfından steroid türevli bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Yapılan çeşitli çalışmalarda EBR'nin anti-kanser etkinliği gösterilmiş olup, daha yakın tarihteki çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ise tau kinazlarından olan GSK3β'nin potansiyel bir inhibitörü olabileceği gösterilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında ön verilerden yola çıkılarak EBR'nin *in vitro* taupati modeli oluşturulmuş Feokromasitoma-12 (PC12) hücrelerinde nörokoruyucu etkisi ER stres ve otofaji yolları ile ilişkili olarak gösterilmek istenmiştir. İlk olarak EBR'nin doğal tip PC12 hücrelerinde uygun dozu belirlenmiş, daha sonra PC12 hücrelerinde taupati modeli oluşturma başarısı gösterilmiştir. EBR'nin taupati modeli PC12 hücrelerinde, klinik çalışmaları devam eden GSK3 inhibitörü Lityum Klorür (LiCl)'e kıyasla hücre sağkalımını daha anlamlı şekilde tetiklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte nörodejenerasyon belirteci proteinlerin anlatımlarını veya fosforilasyon seviyelerini düzenlendiği gösterilmiştir. Tau kinazlarından;Glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3β)'nın Ser9 inhibe edici fosforilasyonunun tetiklendiği,Sikline bağımlı kinaz 5 (CDK5) anlatımının ve Ribozomal protein S6

Kinaz beta-1 (p70S6K)'nın aktive edici Ser 371 fosforilasyonu seviyesinin geri çekildiği gösterilmiştir. Taupati modeli PC12 hücrelerinde tetiklendikleri ancak sonuca ulaşmadıkları gösterilen ER stres ve otofajinin EBR uygulanması ile hücre sağkalımını tetikleyecek şekilde düzenlendiği gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak; sağlıklı hücreler üzerinde toksisitesi düşük olduğu gösterilen EBR'nin potansiyel bir GSK3 β inhibitörü olduğu, bunu yanında otofaji ve ER stres üzerinde düzenleyici etkisi olması nedeni ile AH veya taupatilerde *in vivo* terapötik deneme çalışmalarında kullanımının mümkün olduğu belirlenmiştir.



ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD), is the most common form of dementia, with a dramatic increase in the elderly population worldwide. AD rarely occurs due to familial and often sporadic reasons. The pathology of AD is mainly based on the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles (NFT). NFT formations are also seen in different tauopathies, some synucleopathies and prion-derived diseases. Since the abnormal phosphorylation of tau triggers the NFT formation, the use of tau kinase inhibitors is important therapeutic strategy against AD, other tauopathies and other proteinopathies in which NFT formation is observed. In the pathology of AD and other neurodegenerative diseases (NDs), endoplasmic reticulum (ER) stress and autophagy are essential cellular events, but their neurodegenerative or neuroprotective roles have not been fully elucidated. EBR is a plant growth regulator of the BRs class. Several studies have shown the anti-cancer activity of EBR in both *in vitro* and *in vivo* studies recently. Finally, it has been suggested that EBR might be a potential inhibitor of GSK3 β , which is one of the tau kinases.

In this thesis, we aimed to demonstrate the neuroprotective effect of EBR in *in vitro* tauopathy model of pheochromocytoma-12 (PC12) cells in relation to ER stress and autophagy pathways. First, the appropriate dose of EBR in wild-type PC12 cells was determined, then the success of tauopathy model in PC12 cells was demonstrated. EBR has been shown to induce cell survival in the tauopathy model PC12 cells in a more meaningful way than clinical trials of ongoing GSK3 inhibitor lithium chloride (LiCl). In addition, it has been shown that neurodegeneration marker proteins expressions were downregulated following EBR exposure. Furthermore, the tau kinases; such as cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and GSK3 β were downregulated and the GSK3 β Ser9 inhibitory phosphorylation occurred. The tauopathy model has been shown to trigger cell survival by triggering ER stress and autophagy. Based on the results obtained; EBR, which has been shown to have low toxicity on healthy cells, is a potent inhibitor of GSK3 β , and must be considered for further *in vivo*

therapeutic trial studies of AD and other tauopathies due to its regulatory effect on autophagy and ER stress.



1 GİRİŞ VE AMAÇ

NH'ler, merkezi ve çevresel sinir sistemindeki nöronların geri dönüşsüz kaybı ile birlikte sinir sistemi işlevlerinin bozulmasına yol açan bir dizi hastalıklar grubudur. Artan sağlık imkanları ve uygulanan nüfus planması politikaları sonucunda ülkemizde dahil gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde yaşlı nüfus artmıştır. Bu durumla birlikte başta AH olmak üzere NH'lerin görülme sıklığında önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. İlerleyen yıllarda ise bu artışın çok daha dramatik boyutta olacağı öngörülmektedir (Brookmeyer ve ark. 2007). NH'lerin etiolojisine bakıldığında genellikle sporadik bir öykü gözlenmekle birlikte patofizyolojilerinde yanlış veya hatalı katlanmış proteinlerin hücre içinde ve/veya AH'da olduğu gibi hücre dışında olan birikimleri söz konusudur (Bertram ve Tanzi 2005). Hücre dışında gerçekleşen protein birikimleri immun sistem hücreleri tarafından, hücre içerisindeki birikimler ise tetiklenen ER stresi ile aktive olan otofaji ya da ubiquitin-proteozomal sistem (UPS) tarafından temizlenmeye çalışılmaktadır (Fulda ve ark.. 2010).

AH'de protein birikimleri; hücre dışında gerçekleşen amiloid beta (A β) peptitlerinin oluşturduğu amiloid plaklar ve hücre içinde mikrotübül bağlanma proteinlerinden olan tübülün ilişkili ünite (tau)'nin anormal fosforilasyonu ile tetiklenen nörofibriller yumaklarıdır. Tau proteininin fosforilasyonunu düzenleyen başlıca enzimler olan CDK-5 ve GSK3'ün aktivitesindeki bozukluklar NFT oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca hücre dışında gerçekleşen A β birikimleri ve hücre içerisindeki tau hiperfosforilasyonu birbirleri ve/veya hücredeki diğer protein birikimleri tarafından tetiklenebilmekte veya tetikleyebilmektedir. Hücre içerisindeki protein temizleme mekanizmalarının yetersiz kalması veya bu sistemlerdeki bozukluklar; apoptoz, otofaji ya da nekroptoz gibi yollar aracılığıyla nöronal hücre ölümünü tetikleyebilmektedir. Bu nedenle tau hiperfosforilasyonunu tetikleyen enzimlerin anormal aktivitelerinin inhibisyonu gündemde olan tedavisel yaklaşımlardandır (Mendiola-Precoma ve ark, 2016). Ancak faz çalışmaları devam eden bu ilaçların (örneğin GSK3 inhibitörü LiCl'ün) sağlıklı hücrelerde toksisiteye sebep olabildikleri

gösterilmiştir (Hu ve ark, 2009). Bu nedenle kan beyin bariyerini (BBB) geçebilecek ve toksisitesi düşük yeni tau kinaz inhibitörlerinin bulunması önem kazanmaktadır.

Sinir hücrelerinin bölünme yeteneklerini kısıtlı olması nedeniyle *in vitro* tau kinaz inhibitörü çalışmalarında sıklıkla nöral krest kökenli olan ve bu nedenle nörona özgü endokrin özellikler gösteren PC12, insan embriyonik böbrek hücresi-293 (HEK293), insan kemik iliği nöroblastoma hücresi (SH-SY5Y) veya insan beyin nöroblastoma hücre hattı (SK-N-AS) gibi modeller kullanılmaktadır. *In vitro* olarak tau kinaz inhibitörlerinin çalışılmasındaki temel sorun bu hücrelerde temel tau anlatım düzeylerinin ve bununla ilişkili olarak tau fosforilasyon düzeylerinin düşük olmasıdır. Bu nedenle bu hücrelerde tau anlatımlarının artırılması veya sıcaklığın düşürülmesi gibi tau hiperfosforilasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak tetikleyebilecek uygulamaların *in vitro* AH modeli oluşturulmasında kullanılabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Bretteville ve ark, 2012). EBR, BR'ler sınıfına ait bir bitki büyüme düzenleyicisidir. EBR yapısal olarak steroid türevli hormonlarımız olan östrojen ve testesterona benzemektedir (Becraft, 2001). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda EBR'nin gerek yapısal benzerliği nedeniyle steroid hormona bağımlı kanserlerde, gerekse ER stresine bağlı olarak diğer bazı steroid hormon bağımsız kanserlerde hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte sağlıklı dokuları temsil eden hücre hatları üzerinde EBR'nin toksisitesinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle EBR'nin klinik denemelerde kullanılabileceği düşünülmektedir. Laboratuvarlarımızda yapılan *in vitro* ve *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) çalışmalarında EBR'nin tau kinazlarından olan GSK3 aktivitesini inhibe ettiği, ayrıca diğer tau kinazları olan CDK5 ve mitojenle aktive edilen protein kinaz-44/42 (p44/42) anlatımları üzerinde de inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen ön bulgular ışığında yapılan bu projede EBR'nin anti-nörodejeneratif etkisinin; *in vitro* taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde ER stres ve otofaji sinyal yolları ile ilişkili olarak gösterilmesi hedeflenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARIN EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETİYOLOJİSİ

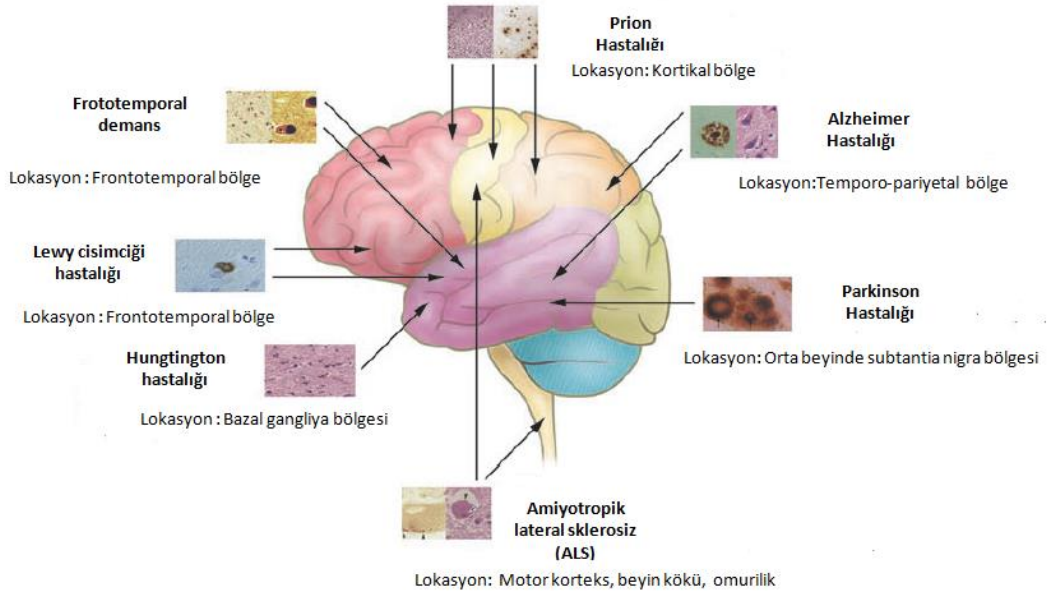
Demans: beyin hastalıklarının neden olduğu hafıza, düşünme, davranış ve günlük aktiviteleri etkileyen kronik veya ilerleyici bir sendromdur. AH tüm demans vakalarının üçte ikisini içermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2016 yılı verilerine göre başta AH olmak üzere demans ile ilişkili hastalıklar ölüm nedenlerinde beşincidir. Bu oran az gelişmiş ülkelerde sıralamanın gerisinde kalmakla birlikte, orta gelişmiş ülkelerde dünya sıralamasına eşdeğerdir. Gelişmiş ülkelerde ise yaşlı nüfusun fazlalığı ve artan sağlık hizmetleri nedeniyle demans ilişkili hastalıklar ölüm nedenleri içerisinde üçüncüdür (WHO-Global Health Observatory 2016) (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. Demans ile ilişkili hastalıkların ölüm nedenleri içerisindeki yeri (World Health Organization - Global Health Observatory, 2016). İskemik kalp hastalıkları dünyadaki ölüm nedenlerinin başında gelirken onu inme, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar, solunum güçlüğüne neden olan enfeksiyonlar ve demans ile ilişkili hastalıklar izlemektedir.

2.2 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Nöronların rejenerasyon yeteneklerinin son derece düşük olması, onlarda meydana gelecek zararlanmaların genellikle geri dönüşsüz bir şekilde sonuçlanmasına neden olmaktadır. Nöronların ilerleyen bir şekilde genellikle sporadik nadiren ise ailesel mutasyonlar ile gelişen zararlanmaları NH denilen bir dizi hastalık grubuna sebep olmaktadır. Demansın eşlik ettiği NH'nin en bilinen çeşitleri (Şekil 2.2): AH, frontotemporal demans (FTD), parkinson hastalığı (PH), lewy cisimciği hastalığı (LCH), amiyotropik lateral sklerozis (ALS), hungtington hastalığı ve prion hastalığıdır (Bertram ve Tanzi 2005; Erkinen ve ark, 2018).



Şekil 2 2 Başlıca nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi ve merkezi sinir sisteminde etkiledikleri bölgeler (Bertram ve Tanzi, 2005).

NH'nin genellikle protein birikimi kaynaklı hastalıklar (proteinopati) oldukları ve bu protein birikimlerinin MSS'nin farklı bölgelerini etkiledikleri bilinmektedir. Örneğin; AH beyinin temporo-pariyetal bölgesinde genellikle hücre dışında A β plaklarının veya hücre içinde NFT oluşumu ile karakterize edilen bir demans çeşididir. Sonuç olarak serebral bölgede hacimce azalmaya neden olmaktadır (Bertram and Tanzi 2005; Erkinen et al. 2018).

FTD, tau proteini içeren pick cisimciklerinin veya ubikuitin içeren protein agregatlarının frontotemporal alanda birikerek hacimce azalmaya sebep olması ile karakterize edilmektedir. FTD'da insanda 17. kromozomda bulunan tau geni (MAPT) de dahil çoklu gen mutasyonlarının önemli olduğu ve bu mutasyonların % 40'ının ailesel geçişli olduğu bilinmektedir. FTD'nın 17. kromozomdaki mutasyonlar ile gelişen formu; parkinsonizm ile birlikte gelişen FTD-17 (FTDP-17) olarak adlandırılmaktadır (Bertram ve Tanzi, 2005; Wang ve Mandelkow, 2016)

PH, AH'dan sonra en sık gözlenen demans tipidir ve orta beyinde substantia nigra bölgesinde lewy cisimciklerinin birikimiyle dopaminerjik nöronların kaybı ile kendini göstermektedir. Hastalığın genetik temelleri olduğu gibi çevresel risk faktörlerinin önemi büyüktür. Örneğin mitokondriyal elektron taşıma sistemi (ETS)'ne ve hücrel temizlik sistemlerinden UPS'ye ket vurduğu belirlenen paraquat veya rotenon gibi pestisitlere maruz kalınan çiftçilikte PH görülme sıklığının diğer meslek gruplarına göre fazla olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2017). LCH, mikro düzeyde lewy cisimciği oluşumu PH ile korelasyon gösterse de beyinde daha çok frontotemporal alanın etkilemesiyle ve serebral bölgede hacimce azalmaya neden olması bakımından PH'den ayrılmaktadır (Bertram ve Tanzi 2005; Erkinenve ark., 2018).

Motor nöron hastalığı ya da Lou Gehrig hastalığı olarak da adlandırılan ALS, nörofilament (NF)'lerin anormal organizasyonu sonucu oluşan protein birikimleri veya diğer başka içeriklere sahip Bunina cisimciği ya da yapısal olarak lewy cisimciğine benzeyen hücre içi protein birikimleri sonucunda beyin veya omurilikteki motor nöronların ve bununla ilişkili olarak kasların hızlı bir şekilde kaybı sonucunda felç veya premature ölüm ile karakterize edilmektedir. Hastalığın nedenleri arasında bakır (Cu)/çinko (Zn) süperoksit dismutaz (SOD1) genindeki otozomal dominant mutasyonlar ve NF'lerin birikimleri söz konusudur (Bertram ve Tanzi, 2005; Yuan ve ark., 2012)

Huntington hastalığı, otozomal dominant bir mutasyon sonucu 4. kromozomda bulunan huntingtin geninde yüksek sayıda sitozin-adenin-guanin kod tekrarlarının özellikle beyin bazal gangliya bölgesinde çözünmeyen protein agregatları oluşturması ve buna bağlı olarak astrosit miktarının anormal artışına eşlik eden

nöronların kaybı ile karakterize edilmektedir. (Bertram ve Tanzi, 2005; Erkinen ve ark. 2018).

Prion hastalığı, normal şartlarda hücre membranında lokalize olan prion proteininin insan 20. kromozomda bulunan geninin polimorfizmi veya otozomal dominant mutasyonu sonucunda ya da sporadik olarak oluşan hatalı katlanmış izoformu olan proteinaz-K'ya dirençli patojenik izoformunun merkezi sinir sistemi (MSS)'nde özellikle kortikal bölgede yaygın olarak birikmesi ile karakterize edilmektedir. Hastalığın patofizyolojisinde serebral bölgede küçülmeye neden olan beyin dokusunun süngerimsi karakter kazanması önemlidir (Geschwind, 2015).

2.2.1 Alzheimer Hastalığı

1906 yılında Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından ilk defa teşhisi konulan ve adını ondan alan AH dünyadaki tüm demans vakalarının yaklaşık %70'ini teşkil etmektedir (Erkinen ve ark., 2018).

2.2.1.1 Alzheimer Hastalığı Tanısı

Hastalığın tanısında klinik olarak; bazı öğrenme, hafıza ve işlevsel alanda farklı testler belirli tıbbi kriterlere göre uygulanmaktadır. Bunun yanında bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme tekniği, pozitron emisyon tomografi gibi çeşitli görüntüleme yöntemleri de kullanılmaktadır. Ayrıca nöropsikolojik testler, hastalığın prognozunda önemli olan genlerdeki mutasyonları moleküler biyoloji yöntemleri ve hastalığa ait biyobelirteçlerin serebrospinal sıvı (CSF), kan veya plazmada ölçülmesini sağlayan biyokimyasal tekniklerde hastalığın tanısında kullanılabilirler (Duthey 2013; Erkinen ve ark., 2018; Masters ve ark., 2016).

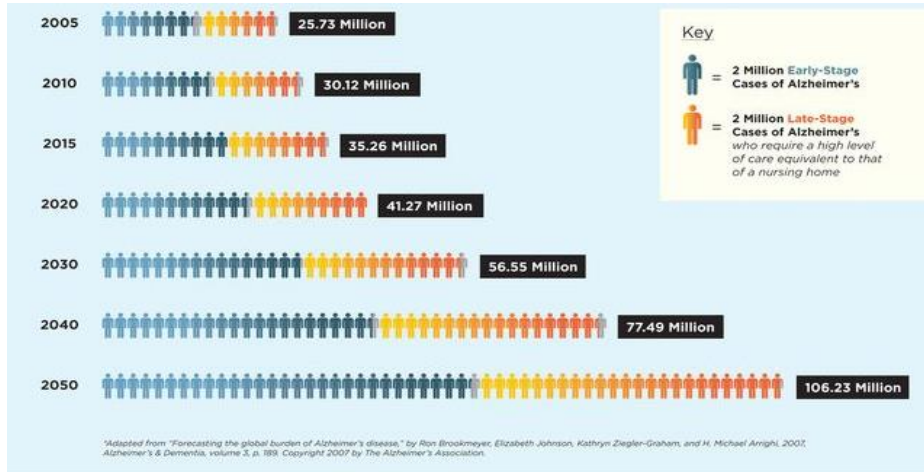
2.2.1.2 Alzheimer Hastalığı Evreleri

Hastalık çeşitleri evrelerden oluşmaktadır. Hafif bilişsel bozukluk denilen ilk evre hastalığın hayatı güçleştiren belirtilerinden çok önce ortaya çıkmaktadır. Bu evre ancak detaylı testler ile belirlenebilmektedir ve AH'ye evrilmesi kesin değildir. Hafif dereceli demans evresinde ise hastalar günlük hayatlarını kolaylıkla sürdürebilmektedirler ancak mesleki ve sosyal açıdan karmaşık görevleri yerine getirmekte bazı zorluklar yaşamaktadırlar. Ayrıca yeni bilgilerin öğrenilmesinde

zorluklar ve depresif ruh hali gibi etkiler ortaya çıkmaktadır. Orta dereceli demans evresinde özellikle kısa süreli hafızada önemli ölçüde bozulma, konuşma işlevinde aksaklıklar ve tuvalet ihtiyaçlarını giderme de yardıma muhtaç olma gibi durumlar söz konusudur. Bu evrenin ilerlemesi ile uzun süreli hafızada da önemli kayıplar söz konusu olmaktadır. Geç dönem demans evresinde hasta tüm günlük işlevlerini yerine getirmek için başkalarına muhtaç kalmaktadırlar. AH kendi başına ölüme neden olmamakla birlikte hareketsizlikle beraber çeşitli kalp-damar hastalıklarına ya da enfeksiyonlara yatkınlığın artması, çiğneme ve yutmayı unutma gibi durumlar ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Duthey, 2013; Reitz ve Mayeux, 2014).

2.2.1.3 Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri

Genellikle sporadik, nadiren ise ailesel mutasyonlar nedeni ile gelişen hastalığın etiyojisi birbirini tetikleyebilen pek çok moleküler mekanizmaya dayanmaktadır. İleri yaş AH tipi demans için önemli bir risk faktörüdür. 65 yaşın üzerinde hastalığın görülme sıklığı her 5 yılda iki kat artmaktadır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi ilerleyen yıllarda yaşlı nüfusun artması ile birlikte AH vakalarının 2050 yılında dünya genelinde 100 milyonun üzerine çıkması beklenmektedir (Brookmeyer ve ark, 2007; Gorelick, 2004).



Şekil 2.3 Dünyadaki AH prevalansının uzun yıllar içerisindeki istatistiksel tahmini (Brookmeyer ve ark., 2007). Çalışmaya göre 2020 yılında toplam 41, 27 milyon olması beklenen erken ve geç aşamalı AH vakalarının 2050 yılında ortalama yaşam süresinin artmasıyla yaklaşık 106,23 milyona ulaşması beklenmektedir. Erken aşamalı AH vakaları mavi tonları ile, geç aşamalı AH vakaları ise kırmızının tonları ile gösterilmiştir. Mavi ve kırmızı tonları koyulaştıkça hastalığın evreleri ilerlemektedir. İleri evre hastaların çoğu hemşireli bakıma muhtaç olmaktadır.

65 yaş altında da AH tipi demansa rastlanabilmektedir. Erken başlangıçlı AH'de genellikle prenesenilin-1/2 (PSEN1/2) ve amiloid prekürsör protein (APP) genlerindeki mutasyonların ailesel geçişi söz konusudur. Ailesel geçişli AH tüm vakaların % 2-5'ini oluşturmaktadır. Bununla birlikte belirtilen genlerdeki mutasyonları taşıyan bireylerde hastalığa yakalanma oranı % 50'dir. AH'da anormal biçimde kesilime uğrayan APP'yi kodlayan genin de lokalize olduğu 21. kromozomun trizomisi ile kendini gösteren Down sendromuna sahip bireylerin çoğunluğu yaklaşık 40 yaşına geldiklerinde AH'nın tüm belirtilerini taşımaktadırlar (Bertram ve Tanzi 2005; Gorelick, 2004; Reitz ve Mayeux 2014).

Kadınların erkeklere oranla AH' ye yakalanma oranlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir, ancak bu durumun nedeni açık değildir. İleri sürülen nedenlerden birisi kadınların erkeklere kıyasla ortalama yaşam sürelerinin daha fazla olmasıdır. Bir başka olası neden ise erkeklerin antropoz girmesinden daha önce kadınlarda başlayan menapozla birlikte sonra azalan östrojen seviyesidir. Vasküler demansta ise erkeklerdeki risk kadınlardan daha fazla olmakla birlikte diğer demans tiplerinde kadın ve erkeklerdeki risk oranı aynıdır (Gorelick, 2004; Masters, 2016; Reitz ve Mayeux 2014).

AH'nın olası ve diğer risk faktörlerinden diyabet, otoimmünite, beyindeki pro-inflamatuvar sitokin seviyesi ve bağırsak mikrobiyotası etkilerine hastalığın moleküler mekanizmalarından bahsedilirken yer verilecek olmakla birlikte diğer olası risk faktörlerinde sözü edilen bu olası risk faktörleri ve birbirleriyle ilişkili olduğu gözlenmektedir (Tablo 2.1). Örneğin; diyabet, obezite, yüksek kolesterol, kötü beslenme, düşük fiziksel aktivite ve alkol kullanımı arasındaki ilişki yadsınamaz şekildedir. Aynı şekilde otoimmünite ile proinflamatuvar sitokin seviyesiyisi doğrudan, inflamasyonla ilişkili olduğu bilinen diyabet, kolesterol seviyesi ve kronik inflamasyona yol açtığı bilinen patojenlerin varlığıyla indirekt ilişki söz konusudur (Mendiola-Precoma ve ark, 2016).

AH'da otoimmüitenin önemli olduğu ve diğer otoimmün hastalıkların AH'nın tetikleyebildiği son yıllarda göze çarpan başlıklardandır. Örneğin; İngiltere de 1998-2012 yılları arasında yürütölen istatistiksel bir çalışmada hastanelere başvuran 1,8 milyon otoimmün hastalık taşııcısında diğer nedenlerle hastanelere başvuran 7 milyon kişiye kıyasla demans insidansının % 20 artmış olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde araştırmalarda 25 otoimmün hastalıktan 18'inin demans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Alzheimer's Research UK).

Depresyon ve sosyal izolasyon gibi etmenlerinde birbirleriyle bağlantılı olduğu açıktır. PH, alkol kullanımı, bazı gelişimsel bozukluklar, kafa travması, işitme kaybı ve düşük eğitim seviyesi gibi faktörlerin beyindeki nöronların gelişimi ve sağkalımı üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Sigara kullanımının diyabet, kardiyovaskular hastalıklar gibi pek çok hastalık ile ilişkili olduğu bilinmekte ve yapılan çalışmalar AH riskini kullanmayanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttırdığını göstermektedir (Cataldo ve ark, 2010; Reitz ve Mayeux, 2014). Bu bölümde belirtilen tüm kaynakçalardan yararlanılarak AH'nin risk faktörleri tablo-1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1 Alzheimer Hastalığı risk faktörleri (Bertram ve Tanzi 2005; Brookmeyer ve ark., 2007; Cataldo ve ark., 2010; Gorelick, 2004; Masters, 2016; Mendiola-Precoma ve ark., 2016; Reitz ve Mayeux, 2014).

Kesinleşmiş Risk Faktörleri	Olası Risk Faktörleri	Diğer Risk Faktörleri
-İleri yaş -Genetik -Down sendromu	-Hipertansiyon -Diyabet -Cinsiyet -Etnik köken -Yüksek kolesterol -Menapozda düşen östrojen seviyesi -Erkeklerde genel anlamda düşük androjen miktarı -Sigara -Obezite ve düşük fiziksel aktivite -Bağırsak mikrobiyatası -Kötü beslenme -Alkol -Otoimmünite ve Otoimmün hastalıklar -Bazal homosistein seviyesi -Serum antioksidan seviyesi -C-reaktif proteini -Beyindeki pro-inflamatuvar sitokin seviyesi -Aluminyum gibi toksik metaller -Sublinik hipertiroidizm -Depresyon -Düşük eğitim seviyesi -Kafa travması -İşitme kaybı -Radyasyon ve elektromanyetik saha -Sosyal izolasyon -İşlek yolların yakınında yaşanması -İleri annelik ya da babalık yaşı, çocuk sayısı ve doğulan mevsim	*AH tipi demans gelişimini tetikleyebilecek diğer bazı tıbbi durumlar; -PH -Multiple sklerozis(MS) -Kronik böbrek hastalıkları -İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) -Klamidya pinömani -Herpes simpleks tip-1 virüs (HSV-1) -Bazı gelişimsel bozukluklar

2.3 HÜCRE ÖLÜMÜ VE NÖRODEJENERASYON

2.3.1 Hücre Ölümünün Sınıflandırılması

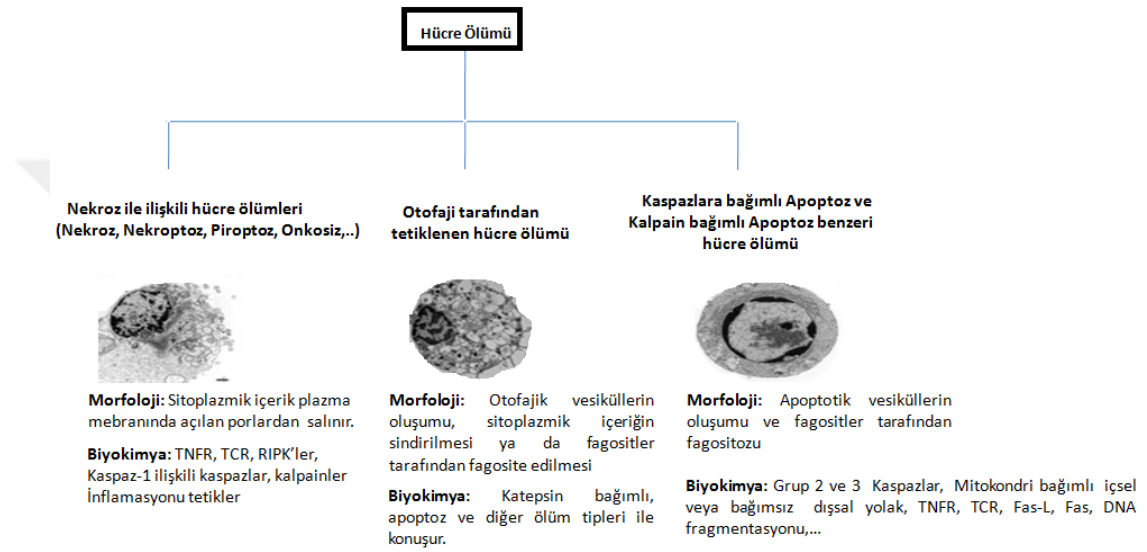
Geçmişte hücre ölümünün farklı çeşitleri genellikle biyokimyasal mekanizmaları açık olmadan morfolojik kriterlere göre tanımlanmıştır. Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (NCDD), hücre ölümünün tanımlanması ve farklı hücre ölüm tiplerinin

belirlenmesi için ortak kriterler oluşturmak üzere araştırmalarını sürdürmektedir. 2005 yılından sonra NCDD tarafından araştırmalar genişletilmiş ve olası hücre ölüm çeşitlerinin varlığı öne sürülmüştür (Kroemer ve ark.,2009)

Günümüzde hücre ölümü farklı morfolojik karakterlere bağlı olarak (apoptotik, nekrotik, otofajik ve mitoz ile ilişkili), enzimolojik kriterlere bağlı olarak (nukleazlar veya sistein-aspartik proteazlar (kaspazlar), kalsiyum ile aktive olan lizozomal olmayan sistein proteazlar (kalpainler), lizozomal proteazlar olan katepsinler ve transglutaminazlar gibi proteazların işlevselliğine bağlı olarak), fonksiyonel olarak (programlanmış veya rastlantısal olarak gerçekleşmiş, fizyolojik veya patolojik) veya immünolojik karakterlerine göre (immünojenik veya immünojenik olmayan) olarak sınıflandırılmaktadır (Duprez ve ark, 2009). Şekil 2.4'te düzenlenen hücre ölüm çeşitleri morfolojik ve biyokimyasal olarak şematize edilmiştir. DNA hasarı gibi içsel veya apoptoz, nekroz veya nekroptozda olduğu gibi dıştan gelen ölüm sinyallerinin ardından çeşitli hücre ölümü sistemleri tetiklenebilmektedir. İlk defa 1972 yılında özgün morfolojik özellikleriyle tanımlanan apoptoz ilgili çalışmalar zamanla artmıştır ve biyokimyasal mekanizmaları aydınlatılmaya başlanmıştır. Morfolojik olarak apoptoz; hücre küçülmesi, membran tomurcuklanması ve kromatinlerin kısalıp kalınlaşması ile karakterize edilmektedir. Sonrasında hücre zarla çevrili tomurcuklanmış ve apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan yapılar ile etrafa dağılmakta ve bu hücre artıkları fagositler tarafından endosite edilmektedir (Fink ve Cookson, 2005; Kroemerve ark., 2009)

Hücre içi geri dönüşüm mekanizmalarından otofajinin bir çeşidi olan makrotofaji zarlı organellerden gelişen vakuoller ve lizozom ile kaynaşmasıyla karakterize edilmekte olup belirli koşullarda hücre ölümünün tetikleyebilmektedir. Ayrıca uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucu temel olarak kaspaz bağımlı apoptozdan farklı olarak, kaspazdan bağımsız mekanizmalar ile kaspaza bağımlı mekanizmaların birlikte çalışabileceği hücre ölüm mekanizmalarına dair veriler elde edilmiştir. Morfolojik olarak hücre membranında açılan porlardan sitoplazmik içeriğın hücre dışı alana geçmesi nedeniyle inflamasyonun tetiklendiği bir grup hücre ölümü çeşidi başlangıçta yalnızca nekroz olarak açıklansa da zamanla biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılmasıyla farklı sinyalizasyonlara sahip hücre ölümü çeşitleri önerilmiştir. Örneğın iyonize radyasyon veya kemoterapi sonucunda hasarlanan

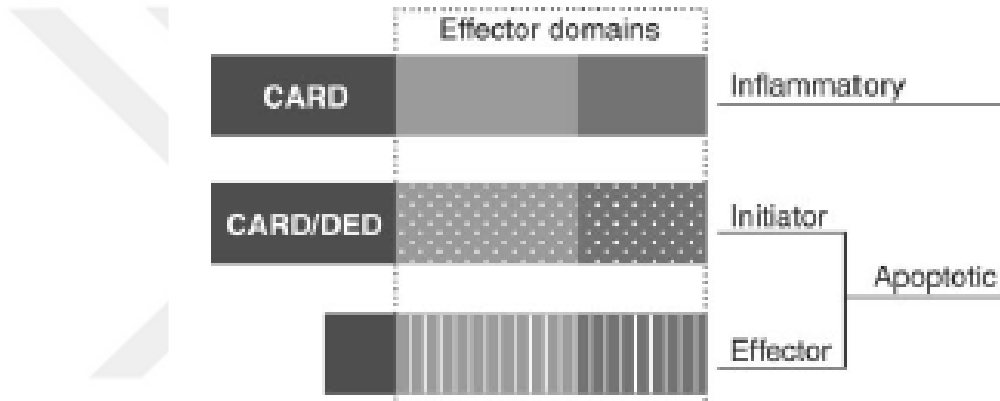
DNA, onkozis denilen morfolojik olarak nekrozla ilişkili olarak organellerin büyümesi ve membran bütünlüğünün bozulması ile karakterize edilen bir hücre ölümünü tetikleyebilmektedir. Tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR), Toll benzeri reseptörler (TLR) ve T-hücresi reseptör (TCR)'lerine bağlanan ligandlar, reseptör ilişkili serin / trenonin protein kinazlar (RIPK1 ve RIPK3) ile bağlantılı sinyal yolları ile nekroz ve nekroptosizi tetiklemektedir (Duprez ve ark., 2009; Fink ve Cookson 2005; Kroemer ve ark, 2009).



Şekil 2.4 Düzenlenen hücre ölümü çeşitlerinin morfolojik ve biyokimyasal olarak şematize edilmesi.

Apoptoz ve nekroz ile ilişkili bazı hücre ölüm tiplerinde önemli olan kaspazlar öncül formda düşük aktivite gösteren ve birbirlerinin öncül formlarını keserek aktivasyonlarını sağlayan enzimlerdir. Şekil 2.5' de gösterildiği gibi apoptotik kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (-2, -8,-9, -10) ve efektör kaspazlar (-3, -4, -7) olarak ikiye ayrılmaktadır. Morfolojik olarak nekroz ile ilişkili olan ancak sinyalizasyonu RIPK' lerden bağımsız olan piroptoz, pro-inflamatuar sitokinler olan interlökin 1 β /18 (IL 1 β /IL 18) ve Şekil 2.5' de gösterildiği gibi kaspaz-1 ile ilişkili olan kaspazların (-1, -4, -5, -11,-12, -13,-14) birlikte çalışmasıyla tetiklenmektedir. Ayrıca hücrede bozulan fenton kimyası ile ilişkili olarak reaktif oksijen türleri (ROS)' da hücrede ferroptoz denilen tipik hücre ölümü çeşidini tetikleyebilmektedir (Fink ve Cookson, 2005; Gaove ark, 2016 ; Tait ve ark, 2014).

Apoptoz, otofaji, nekroz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz gibi düzenlenmiş hücre ölümü çeşitlerinin birlikte tetiklenmesi söz konusu olabildiği gibi ayrıca düzenlenmemiş hücre ölümü çeşitleri de mevcuttur. Kromozom yapısı, sayı ve DNA replikasyonu bozuklukları ile ilişkili olarak gelişen mitotik felaket, hücre dışı matriks veya çevredeki diğer hücreler ile bağlantının kesilmesine bağlı olarak gelişen anoikis, nöronlarda uyarıcı nörotransmitterlerin sinaptik alanda fazla bulunması ile oluşan eksisotoksiste, ayrıca nöronların akson ve dentritlerinde kısmi olarak kayıplara yol açan ancak tam olarak hücre ölümü kapsamına alınamayan Wallerian dejenerasyon bunlardan bazılarıdır (Gorman, 2008; Kroemer ve ark.,2009).



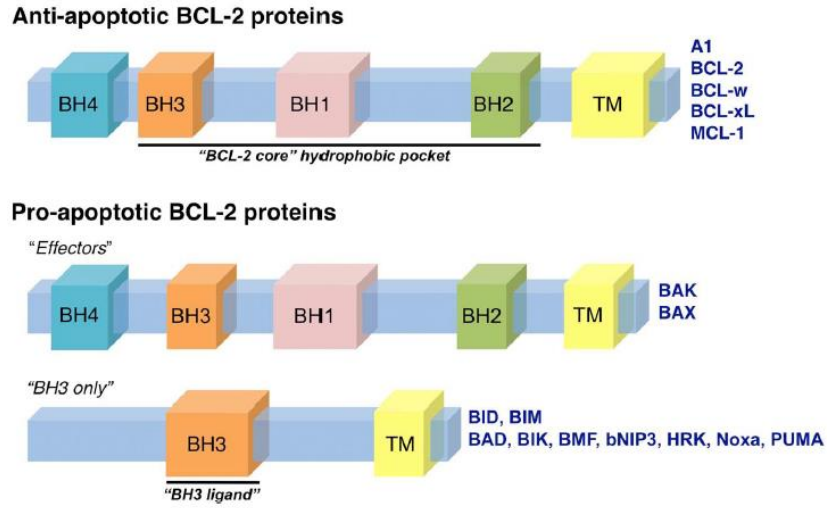
Şekil 2.5 Kaspazların yapısının sematik olarak gösterilmesi ve çeşitleri (Fink ve Cookson 2005). Kaspaz ailesi 3 büyük gruptan oluşmaktadır. Grup-1: inflammatuar kaspazlar, Grup-2: apoptozu başlatan kaspazlar, Grup-3: apoptotik efektör kaspazlar. CARD: Kaspaz aktivasyon güçlendirme domaini, DED:Ölüm efektör domaini. Etkinlik alanları de iki kısımdan oluşmaktadır: büyük katalitik alt birim (p20) ve küçük katalitik alt birim (p10).

2.3.2 Nöronal Programlı Hücre Ölümü ve Apoptoz

MSS'de hücre ölümü; gelişim, nöronlar arasında yeni bağlantıların kurulması veya patolojik süreçlerle ilişkili olarak programlı hücre ölümü (PCD) önemli bir süreçtir. Nöronlarda temel rolü efektör kaspaz-3'ün oynadığı PCD; nöral öncül hücre (NPC)'lerde gözlenen nöral gelişim ile farklılaşmada önemli olan kemik morfojenik protein (BMP)'ler, Wingless-tipi protein (Wnt)'ler, fibroblast büyüme faktör (FGF)'leri ve sonic-hedgehog (Shh) gibi morfojenlerin eksikliğine bağlı olarak veya apoptotik sinyal varlığına bağlı olarak gelişen hücre çoğalmasıyla ilişkili programlı hücre ölümü ya da post-mitotik nöronlarda gözlenen sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotrofin-3/4/5 (Nt-3/4/5) gibi

nörotrofinlerin eksikliği veya apoptotik sinyal varlığına bağlı olarak gelişen nörotrofin-ilişkili ölüm olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (D'Amelio ve ark, 2012).

Memelilerde apoptoz başlıca iki yolak üzerinden gerçekleşmektedir: Dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik). Dışsal yolak hücre membranı üzerinde bulunan ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar aracılığı ile, içsel yolak ise hücre içi stres sinyali varlığında belli durumlarda mitokondri membran bütünlüğünü koruyan veya bozulmasını tetikleyen B-hücresi lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinlerin aktivitesi arasındaki dengenin değişmesi aracılığıyla tetiklenen kaspaz etkinliğinin başlatılmasını ifade etmektedir. Şekil 2.6' da gösterildiği gibi Bcl-2 ailesi proteinleri: anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, yalnızca Bcl-2 homoloji domain-3 (BH3) domaini içeren pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri ve efektör pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. BH3 ve transmembran domain (TM) her üç sınıfta da ortak olarak bulunmaktadır. Bu domainin varlığı sayesinde anti-apoptotik proteinler ve pro-apoptotik proteinler etkileşime geçebilmektedirler. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri: Bcl-2 ilişkili protein A1 (A1), Bcl-2, Bcl-2 benzeri 2 (Bcl-w ya da Bcl2-L-2), Bcl-ekstra büyük (Bcl-xL) ve miyeloid hücreli lösemi-1 (Mcl-1)'dir. Efektör pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri: Bcl-2 antagonist/öldürücü-1 (Bak) ve Bcl-2-ilişkili X protein (Bax)'dir. Yalnızca BH3 ve TM domaini içeren pro-apoptotik proteinler: Bax benzeri BH3 protein (Bid), Bcl-2 ile etkileşime giren hücre ölümü aracısı (Bim), Bcl-2 ilişkili ölüm düzenleyicisi (Bad), Bcl-2 etkileşimli katil (Bik), Bcl-2 değiştirici faktör (BMF), Bcl-2 etkileşimli protein-3 (bNIP3), apoptoz aktivatörü Harakiri (Hrk), porbol-12-miristat-13-asetat-uyarılmış protein 1 (Noxa) ve apoptozun-tümör-ilişkili protein -53 (p53)-yükseltici-düzenleyicisi (PUMA)'dır Bu proteinlerin gen anlatımlarının yanında fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları da onların aktivitesini düzenlediğinden hücresel sinyal yolları tarafından düzenlenmektedir (Anvekar ve ark, 2011; GeneCards, 2017).



Şekil 2 6 Bcl-2 ailesi proteinlerinin çeşitleri ve genel yapısal formu (Anvekar ve ark., 2011).

Dışsal apoptotik yolak TNFR ailesi üyeleri (örneğin TNFR-1), farklılaşmanın kümesi-95 (CD95 veya Fas) ve TNF-ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörü (TRAILR) gibi ölüm reseptörlerine, TNF, Fas ligandı (Fas-L) veya TRAIL gibi ligandlarının bağlanması ile aktive edilmektedir. Bu ölüm ligandları MSS'de genel olarak astrosit, mikroglia, infiltrat T hücreleri ve endotelial hücreler tarafından sentezlenmektedir. Nöroinflamasyon durumunda bu ligandların anlatımları artmaktadır. TNFR ailesi reseptörlerinin ligandlar ile etkileşimi sonucunda Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) içeren adaptör proteinler TNFR ailesinin sitoplazmik yüzeyine bağlanırlar. Ardından adaptör proteinler, ölüm efektör domainleri (DED) vasıtasıyla başlatıcı kaspazlar ile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan bu yapı ölümü tetikleyen sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılmaktadır. DISC yapısı oluşumuyla aktifleşen başlatıcı kaspazlar efektör kaspazların öncül kısımlarının kesilimi ile aktive olmasını sağlamaktadır. Ayrıca BİD in kesilerek (t-BİD) BH3 içeren domaininin açığa çıkarılmasıyla dışsal yolak, içsel yolağın aktivasyonuna yol açmaktadır (Indran ve ark, 2011; Song, 2006).

Kaspazla apoptozun baskılayıcısı (ARC), FADD-benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzim (FLICE) inhibitör protein (FLIP) ve hücrel apoptoz inhibitörü proteinler 1/2 (cIAP 1/2) gibi düzenleyiciler tarafından FADD domainlerinin kaspas-8 (C8)'i aktive etmesini veya direkt olarak başlatıcı kaspazların aktivitesini engelleyebilmektedir. Sonuçta dışsal yolak aktivasyonu veya cIAP 1/2 ile içsel yolağın aktivasyonu engellenmektedir (Şekil 2.7). Önemli bir anti apoptotik gen olan kaspaz-8 ve FADD

benzeri apoptoz düzenleyicisi (CFLAR)' nin alternatif kesilim ürünlerinden biri olan uzun FLIP (FLIP_L), RIPK1 aracılı nekroptozu ve hücrel stres altında otofajiyi inhibe ederken hücre sağkalımını tetiklemektedir. Kısa FLIP (FLIP_S) ise nekroptozu tetiklemektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda karboksibenzoksi-valil-alanil-aspartil-O-metil (z-VAD) bileşiği gibi kaspaz inhibitörlerinin de kaspaza bağlı apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir.. Bu nedenle kaspaz inhibitörlerinin dışsal apoptotik sinyal varlığında nekroptozisi tetikleyebildiği belirlenmiştir (GeneCards 2017; Indran ve ark, 2011; Sevrioukova, 2011).

Nörodejeneratif hastalıklardan olan AH ve PH' de gözlenen A β peptidi ile alfa-sinüklein (α -syn) birikimi mitokondri membran bütünlüğünün direkt zarar görmesine neden olabildikleri gibi ER stresi veya nörotoksisite kaynaklı yüksek hücre içi kalsiyum (Ca⁺²) konsantrasyonu, büyüme faktörü eksikliği, iyonize radyasyon, ultraviyole radyasyon (UV), viral enfeksiyonlar, hipoksi ve kemoterapötik ajanların varlığı sonucunda artan ROS ile ilişkili olarak ya doğrudan DNA ya da diğer biyopolimerlerde gözlenen zararlanmalar hücrede tümör protein 53 geni (TP53) tarafından kodlanan p53 proteinine bağımlı olan veya p53'den bağımsız sinyal yolları aracılığıyla içsel yoldan apoptozu tetikleyebilmektedir (Indran ve ark, 2011; Liu ve Xu, 2011).

Hücrelerde DNA hasarı söz konusu olduğunda DNA hasarı cevabı (DDR) proteinleri tarafından p53 proteini aktive edilmektedir. DNA hasarı gerçekleştiğinde senesente olmayan hücrelerde hücre devrinin durdurulması ve DNA hasarının onarımı söz konusu olmaktadır. Ardından hücre devri devam etmektedir. Ancak DNA hasarı onarılmadığı takdirde hücrelerde düzenlenmiş hücre ölümünün gerçekleşmesi gerçekleşmektedir. Sonuçta bir Tf'de olan p53 tarafından yalnızca BH3 ve TM domainleri içeren Bcl-2 pro-apoptotik ailesi proteinlerinin anlatımı tetiklenebilmektedir. Bazı nörodejenerasyon modellerinde DNA hasarının hücre ölümünü tetiklemesi hastalığa neden olurken, bölünen hücrelerde bu fonksiyonun kaybı sonucunda ise karsinogenez gerçekleşmektedir (Anvekar ve ark, 2011; Liu ve Xu, 2011).

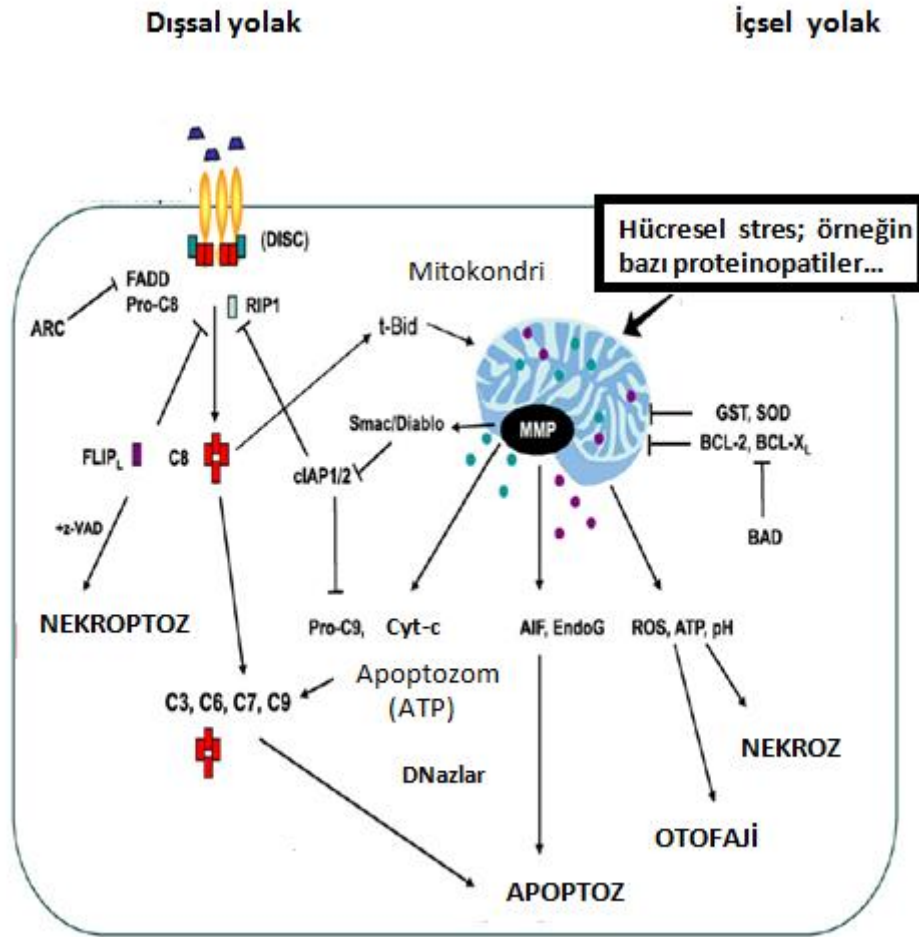
Hücre içi stres veya dışsal apoptotik sinyal yokluğunda, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri BH3 domainleri vasıtasıyla proapoptotik efektör Bcl-2 ailesi proteinlerini

tutmaktadır. Ancak belirtilen stres koşullarında veya dışsal yolda apoptotik sinyal molekülü varlığında yalnızca BH3 ile TM domaini içeren BAD gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktivitesi artmakta ve bu proteinler aracılığıyla antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri tutulmaktadır. Bu nedenle serbest kalan proapoptotik efektör Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından mitokondri membranında porlar açarak mitokondriyal membran geçirgenliği (MMP) artmaktadır. Sonuçta mitokondri içerisinde endonükleaz aktivitesi gösteren endonükleaz-G (Endo-G) ile iç membranda ETS' de görevli olan apoptozu teşvik edici faktör (AIF) ve sitokrom-c (Cyt-c)' nin sitoplazmaya geçmesi söz konusudur. Bunların yanında ikincil mitokondri-türevli kaspaz aktivatörü (Smac) ve düşük İzoelektrik nokta (pI)' da direkt cIAP 1/2' ye bağlanan protein (Diablo) proteinleri ile onların homologları sitozole geçmektedir. Ayrıca MMP ile mitokondriden salınan ATP, sitoplazmada artan ROS ve değişen hidrojenin gücü (pH) diğer düzenlenmiş hücre ölümü çeşitleri olan otofaji veya nekrozun tetiklenmesine neden olabilmektedir (Bateman ve ark, 2017; Fulda ve ark, 2010; Indran ve ark., 2011).

Sülfidril grubu taşıyan tiyol bileşiklerinin transferi ile düzenlenmesinden sorumlu örneğin glutatyon-S-transferaz (GST) gibi enzimler ve SOD gibi enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan sistemler ROS seviyesini azaltarak veya strese bağlı olarak tetiklenen hücre proteinlerinin aktivitesini glutatyonilazyonu aracılığıyla düzenleyerek mitokondri aracılı hücre ölümünün engellenmesine yardımcı olmaktadır (Şekil 2.7). Sonuçta AH ve kanser gibi oksidatif stres ile tetiklenebilen patolojilere karşı korunmayı sağlamaktadırlar (Pajaud ve ark, 2012).

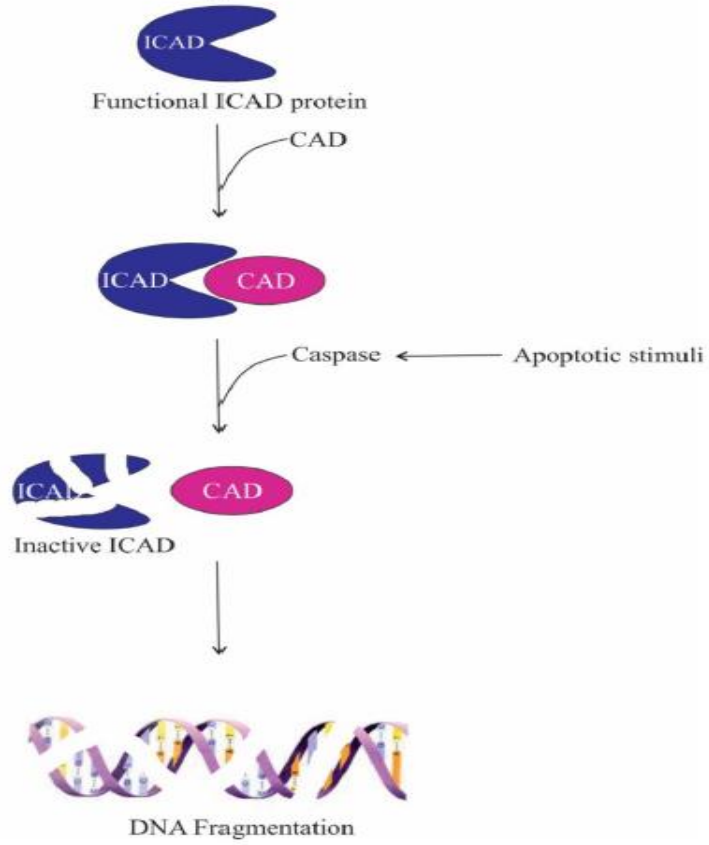
AH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda Endo-G ve AIF salınımının fazla olduğu gösterilmiştir. Şekil 2.7'de gösterildiği gibi Endo-G ortama salındığında nukleusa geçerek kaspazdan bağımsız olarak DNA'nın fragmentasyonuna yol açmaktadır. Benzer şekilde AIF'de nukleusa geçerek kromozom kondenzasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle Endo-G ve AIF, kaspaz bağımsız apoptotik yolda da önemlidir. Sitozole salınan Cyt-c, apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1 (APAF1) ve öncül C-9 ile birlikte ATP varlığında apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. MMP ile sitozolesalınan Smac/Diablo süperalesi de apoptozom kompleksindeki kaspazların aktivasyonunda ve cIAP 1/2'nin inhibe edilmesinde rol oynamaktadır. Öncül C-9'un kesilimiyle diğer efektör kaspazların kesilerek aktive olması

sağlanmaktadır. Bu noktada içsel ve dışsal apoptotik yollar sonuçsal olarak bir araya gelmekte, aktive olan efektör kaspazlar pek çok substratı hedef almaktadır (Fulda ve ark, 2010; Indran ve ark, . 2011; Li ve ark, 2015).



Şekil 2.7 Apoptozun biyokimyasal mekanizması ve diğer bazı hücre ölümü çeşitleri ile etkileşimi (Indran ve ark, 2011).

Efektör kaspazların hedeflediği substratlardan birisi kaspasla aktive edilen endonukleaz (CAD)'ın inhibitörü (İCAD)'dür (Şekil 2.8). Apoptotik sinyal varlığında efektörkaspazların hedefi konumundaki İCAD kesilmekte ve CAD aktive olmaktadır. CAD aktivasyonu sonrasında nukleozomlar arasındaki bağlayıcı DNA bölgeleri kesilerek DNA fragmentasyonu gerçekleşmektedir. Efektör kaspazların substratlardan biri olan poli ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi, tek zincirdeki DNA kırığı onarımında önemlidir. PARP enziminin kesilimi bu nedenle Endo-G salınımı veya CAD aktivasyonu ile gerçekleşen DNA kesiliminin onarımını engelleyerek apoptotik sürecin ilerlemesinde önemli bir aşamadır (Deka ve Singh 2017).



Şekil 2.8 Kaspaza bağımlı apoptotik yolda DNA fragmentasyonunun şematize edilmesi (Deka ve Singh, 2017).

2.4 ALZHEİMER HASTALIĞININ GENETİĞİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMASI

2.4.1 Alzheimer'ın Genetik Alt Yapısı

AH patogenezinde direkt etkili veya risk faktörü olan genler tablo-2.2'de belirtilmiştir. Bu genlerdeki mutasyonlar, tek nükleotid değişimleri (SNP), epigenetik mekanizmalar, bu genleri taşıyan kromozomlardaki sayısal (örneğin Down sendromu) veya yapısal değişiklikler, RNA işlenmesi ve post-translasyonel modifikasyon aşamalarında meydana gelebilecek değişikliklerin AH patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir. APP, PSEN1 ve PSEN2 mutasyonları otozomal dominant kalıtım yolu ile aktarılmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonların aktarımı erken başlangıçlı ailesel AH tipi demans olgularının en önemli nedenidir. Ayrıca tau mRNA'sının işlenmesi ve/veya tau proteininde meydana gelen değişikliklerinde erken başlangıçlı AH'nın patogenezinde önemli olduğu gösterilmiştir. Apolipoprotein E (APOE) genindeki allel farklılıkları ve mutasyonların geç

başlangıçlı AH tipi demanslarda oldukça önemli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hücre ölümü, hücre sağkalımı, ekstrasellular matriks bileşenleri ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli proteinleri kodlayan farklı genlerde (Tablo 2.2) veya onların protein ürünlerinde işlevsel olarak meydana gelebilecek farklılıkların da AH gelişiminde birer risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile Tablo 2.2'de olmayan pek çok gendeki polimorfizmlerin AH ile ilişkisi olduğunu göstermiştir (Bertram ve Tanzi 2005; Khanahmadive ark, 2015; Mendiola-Precoma ve ark, 2016).

Tablo 2.2 Alzheimer Hastalığı patogenezinde direkt veya risk faktörü olarak etkili olan 20 önemli gen (Khanahmadi ve ark, 2015).

Genin Sembolü	Kodladığı Protein	Gen Numarası(ID)
APP	Amiloid-Beta (A4) Öncül Proteini	GC21M027252
PSEN1	Presenilin 1	GC14P073603
PSEN2	Presenilin 2	GC01P227058
MAPT	Mikrotübül İlişkili Protein Tau	GC17P043971
APOE	Apolipoprotein E	GC19P045408
GSK3 α	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Alfa	GC19M042734
GSK3 β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta	GC03M119540
CDK5R1	Sikline Bağımlı Kinaz 5, Düzenleyici Alt Ünite 1(p35)	GC17P030813
CASP2	Kaspaz 2, Apoptoz İlişkili Sistein Peptidaz	GC07P142985
CASP3	Kaspaz 3, Apoptoz İlişkili Sistein Peptidaz	GC04M185548
PSENEN	Presenilin Yükseltici Gama Sekretaz Alt Ünitesi	GC19P036236
APBA1	Amiloid Beta Öncül Protein-Bağlanma Proteini ,aile A,üye 1	GC09M072042
APBA2	Amiloid Beta Öncül Protein-Bağlanma Proteini ,aile A,üye 2	GC15P029213
APBB1	Amiloid Beta Öncül Protein-Bağlanma Proteini ,aile B,üye 1	GC11M006414
LRP1	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein 1	GC12P057497
NCSTN	Nikastrin	GC01P160313
CHAT	Kolin O-Asetiltransferaz	GC10P050817

CLSTN1	Kalsintenin 1	GC01M009789
BPTF	Bromodomain Bitki Homeodomain(PHD) Parmak Transkripsiyon Faktörü	GC17P065821
COL25A1	Kollajen,tip25, α 1	GC04M109731

2.4.2 Alzheimer Hastalığı ile İlgili Teoriler ve Amiloid Beta Peptidi Patolojisi

AH gelişiminin hücrenel ve sistemik mekanizmalarıyla ilgili olarak günümüzde ileri sürülen bir kaç hipotez söz konusudur. Bunlar;kolinerjik hipotez, amiloid teorisi, tau teorisi, mitokondriyal hipotez, oksidatif stres hipotezi, glutamat nörotoksitesi hipotezi, metal dengesizliği hipotezi, inflamatuvar hipotez, mikroorganizma infeksiyon hipotezi, vaskular hipotez ve metabolik hipotezlerdir. Ancak tüm bu hipotezler A β ve tau protein birikimleri ile ilişkilidir (An ve ark, 2008; Barage ve Sonawane 2015; Mendiola-Precoma ve ark, 2016).

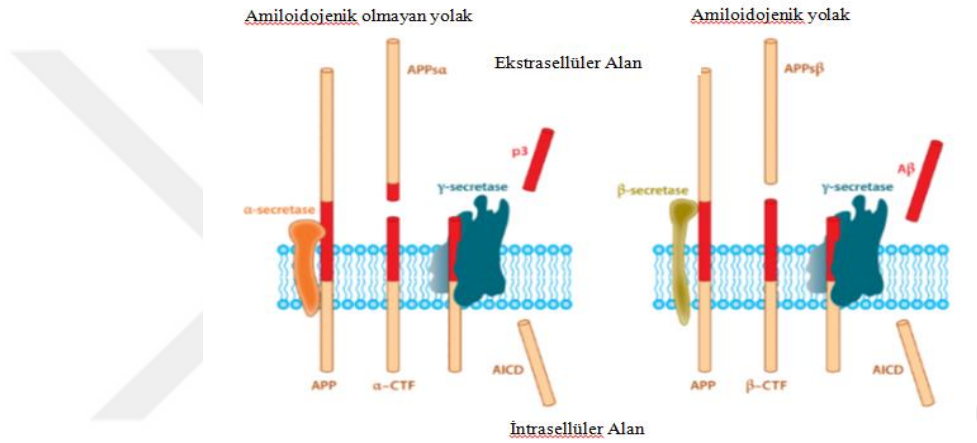
Asetil kolin (Ach), alkaloid türevi olan genellikle uyarıcı rol oynayan bir nörotransmitterdir. Öğrenme, hafıza, stres cevabı ve uyku gibi önemli fizyolojik olaylarda görev alan Ach sitozolde kolin ve asetil koenzim A (Asetil-CoA)'dan sentez edilir. Kolin-O-asetiltransferaz (CHAT) enzimi ile sinaptik vesiküllere transfer edilen Ach'nin aksiyon potansiyelinin pre-sinaptik alana ulaşması ile açılan voltaja bağımlı Ca⁺² kanallarından hücre içine giren Ca⁺² tarafından sinaptik alana ekzositozu uyarılmaktadır. Sonuçta Ach post-sinaptik hücre membranındaki muskarinik reseptörlere veya nikotinik reseptörlere bağlanarak uyarıcı veya inhibe edici etkilerini göstermektedir. Ayrıca sinaptik alandaki fazla Ach'de asetilkolin esteraz (AChE) enzimi tarafından kolin ve asetata yıkılmaktadır. Kolinerjik hipoteze göre CHAT ve Ach seviyelerinin serebral korteks gibi alanlarda azalması AH gelişimi için önemlidir. Tablo 2.2'de gösterildiği gibi CHAT genindeki mutasyonlar AH 'de risk faktörüdür. Yapılan çalışmalarda AH'de hipokampustaki kolinerjik nöronlarda azalma gözlenmiştir. Ayrıca AH'de serotonin, nöroadrenalin ve dopamin gibi diğer nörotransmitterlerin metabolizması ile ilgilide aksaklıklarında önemli olduğuna dair veriler söz konusudur (H. Ferreira-Vieira ve ark, 2016; Mendiola-Precoma ve ark, 2016).

APP, tüm memelilerden *Drosophila melanogaster*'e kadar uzanan yaygın bir tek geçişli transmembran protein ailesinin üyesidir. APP'nin işlevi tam olarak bilinmese de, hücrelere geçişi APP geni içeren vektör aktarımı deneyleri ile hücre canlılığı ve bölünmesinde proteinin işlenmesi ile ilişkili olarak hücre sağkalımı, akson ve dentrit gelişimi ile hücre büyümesi üzerinde teşvik edici etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca APP 'nin RNA aracılı susturulmasının embriyonik sıçanlarda nöronal göç üzerinde olumsuz etki yaptığı gösterilmiştir (O'Brien, R. J. ve Wong, 2016).

Şekil 2.9'da görüldüğü gibi APP'nin membranın sitosolik tarafındaki karboksi ucu (C ucu) kuyruğu daha kısa iken, membranın ekstrasellüler kısmındaki amino ucu (N ucu) kuyruğu daha uzundur. APP' nin proteolitik olarak işleniminin, tıpkı embriyonik gelişimde önemli olan Notch sinyal proteinin aktivasyonunda olduğu gibi onun olası görevlerini yerine getirebilmesi için önemli olduğu belirtilmiştir. Normal şartlarda yine hücre mebranında lokalize olan sırasıyla alfa bölgesinden APP'yi kesen enzim (α -sekretaz) ve gama bölgesinden APP'yi kesen enzim (γ -sekretaz) tarafından ard arda proteolitik kesilimin yapıldığı amiloidojenik olmayan yolak sonucunda APP'nin suda çözülebilen ürünleri olan ekstrasellüler salgılanan APP-alfa (APP_{α}), 3 kilodalton (kDa) peptid (p3), APP intrasellüler domain (AICD) ve alfa-C-ucu fragmenti (α -CTF) peptidlerini oluşmaktadır. Bununla birlikte beta bölgesinden APP'yi kesen enzim (β -sekretaz veya BACE) aktivitesinin, γ -sekretaz aktivitesi tarafından takip edildiği amiloidojenik proteolitik işlemde suda çözülebilen ürünler olan salgılanan APP-beta (APP_{β}) ve AICD dışında, suda çözülemeyen 39-43 amino asit uzunluğunda $A\beta$ peptidleri oluşmaktadır. $A\beta$ peptidleri hücre dışarısında birikerek ilk olarak amiloid fibrilleri, daha sonraki aşamada ise amiloid plakları oluşturmaktadır. Beyindeki hücre dışı amiloid plakların ve hücre içi tau birikiminin kolinerjik nöron kaybı ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca moleküler modelleme çalışmaları ve kinetik analizler AChE'nin $A\beta$ peptidleri ile hidrofobik bir etkileşim gerçekleştirerek amiloid fibril oluşumunu ve sonuçta amiloid plakların birikimini tetikleyebileceğini göstermiştir. Bu durumda kolinerjik hipotez ile amiloid hipotezi arasındaki ilişkiyi gözler önüne sermektedir (Barage ve Sonawane, 2015; H. Ferreira-Vieirave ark, 2016; O'Brien ve Wong 2016).

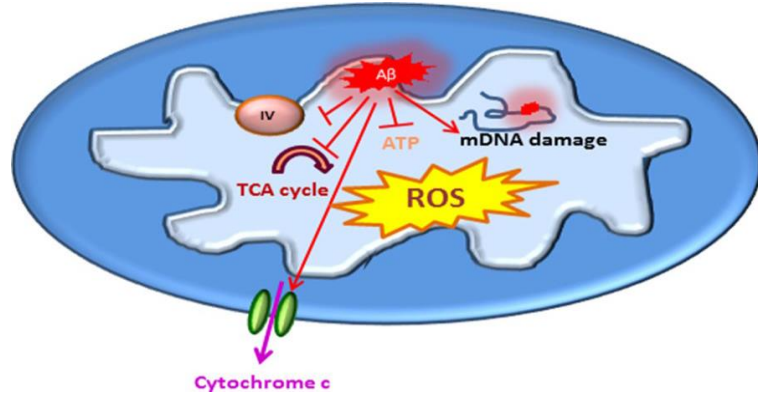
$A\beta$ peptidleri hücrede normal şartlarda da üretilmekteyken özellikle yüksek çökelim ve agregasyon gösteren $A\beta_{42}$ 'ye AH'li bireylerden alınan örneklerde; intersellüler

alandaki senil plakların içeriğinde ve hastaların beyin-omurilik sıvısı (BOS), serebral arteriyolları ve menenjiyal kan damarlarında rastlanmıştır. AH' de özellikle patojenik olan $A\beta_{42}$ 'nin üretiminin daha fazla üretilmesi lehine bazı değişikliklerin olması söz konusudur. Amiloid teorisine göre Tablo 2.2'de belirtilen. APP'nin proteolitik işlenimiyle doğrudan ilişkili olan BACE, γ -sekretazın PSEN-1/2, PSENEN ve nikastrin alt üniteleri ile APP'nin kendisi ile proteolitik işleme doğrudan ilişkili olmayan sitoplazmik adaptör protein alt üniteleri olan APBA1/2 ve APBB1'deki mutasyonlar veya alel farklılıkları önemlidir (Barage ve Sonawane, 2015; O'Brien ve Wong 2016).



Şekil 2. 9 Amiloid öncül proteinin, Amiloid beta üreten ve üretmeyen proteolitik işlenim yolları (O'Brien ve Wong, 2016).

Şekil 2.10.'da görüldüğü gibi hücre içi $A\beta$ 'nın mitokondri membranında lokalize olması sonucunda mitokondri membran kanalları bloke olmaktadır. $A\beta$; ETS'de kompleks IV, trikarboksilik asit devri (TCA)'nde ise α -ketoglutarat ve pürivat dehidrogenaz'ın işlevinin bozulmasını teşvik etmektedir. ETS ve TCA proteinlerinin inhibe olmasıyla mitokondride ROS üretimi artmakta ve ATP sentezi azalmaktadır. Sonuçta mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı oluşmakta ve MMP ile cyt-c sitoplazmaya geçerek apoptotik yolağı tetiklemektedir (Majd ve ark, 2015; Rodolfo ve ark., 2010).

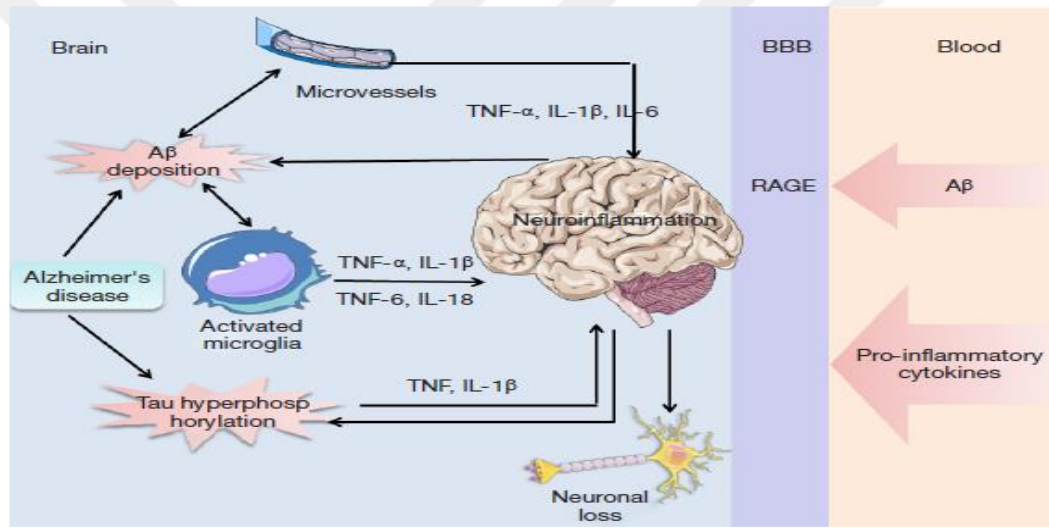


Şekil 2. 10 İntraselüler Amiloid beta'nın mitokondri üzerindeki etkileri (Majd ve ark, 2015).

Şekil 2.11'de gösterildiği gibi AH' de interselüler alandaki Aβ varlığı direkt olarak mikroglia ve astrosit hücreleri tarafından algılanmaktadır. Bu hücreler tarafından salgılanan ROS veya IL1β, IL6, IL18, TNFα ya da TNF6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler tau hiperfosforilasyonu kaynaklı intraselüler tau birikimini ve lokal nöroinflamasyonu tetikleyebilmektedir. Ayrıca intraselüler tau birikimi ya da Aβ içeren nöronlardan interselüler alana geçen ROS' da mikroglia ile astrosit hücreleri tarafından algılanmakta ve bunların aktive olmasına neden olmaktadır. Bunun dışında Aβ peptidleri beyin kılcal damarlarına geçerek sürekli bir pro-inflamatuvar sitokin sentezi döngüsüne neden olabilmektedir. Vaskular hipotez'e göre; interselüler alandan temizlenemeyen Aβ peptidleri BBB' den geçerek serebral amiloid anjiyopatiye sebep olmaktadır ve serebral kan akışı azalmaktadır. Şekil 2.11'de gösterildiği gibi pek çok AH risk faktörü ile ilişkili olarak gelişen sistemik değişiklikler sonucu üretilen pro-inflamatuvar sitokinler ya da perifere kaçan Aβ parçacıkları BBB'den beyine geçerek veya ileri glikozilizasyon son ürün reseptörleri (RAGE) aracılığıyla beyindeki sinyal yollarını ve ROS seviyesini değiştirerek nöroinflamasyonun tetiklenmesine ve sonuçta nöronal kayba neden olabilmektedirler (Sardi ve ark, 2011; W.Wangve ark, 2015).

APOE, önemli bir kolesterol taşıyıcısıdır ve lipidasyonu MSS'nin önemli immün sistem hücreleri olan astrositler tarafından sağlanmaktadır. APOE ayrıca hidrofobik Aβ peptidlerine bağlanarak onların glial hücrelerin yüzeyindeki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ilişkili reseptörler ve koreseptörler tarafından tanınarak endosite edilmesine ve bu şekilde interselüler alanın Aβ₄₂'den temizlenmesine yardımcı

olmaktadır. APOE'nin üç farklı allel tarafından kodlanan izoformu (ApoE4, ApoE3 ve ApoE2) ile lipidadasyon seviyesi onun A β 'ye olan ilgisini ve dolayısıyla A β ₄₂'nin temizlenme sistemini etkilemektedir. Özellikle ApoE4 aleli içeren bireyler AH için riskli bir populasyon içindedirler. Ayrıca glial hücre yüzeyindeki düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein 1 (LRP1)'in mutasyonu veya allel farklılıkları da AH için gelişimi için önemlidir. Ayrıca yeni bulgular APOE'nin A β 'den bağımsız olarak lipid metabolizması, tau patolojisi, nöroenerjistik, nörogelişim, sinaptik plastisite, nörovaskülerite ve nöroinflamasyon ile ilişkili olarak AH gelişiminde önemli bir rol oynayabildiğini göstermektedir (Liu ve Xu 2011; Mendiola-Precoma ve ark.,2016; Sardive ark, 2011; Wolfve ark.,2013).



Şekil 2. 11 Alzheimer ve nöroinflamasyon arasındaki olası ilişkilerin şematize edilmesi. (W.Wang ve ark, 2015).

AH'da metabolik ve genetik olmayan risk faktörleri olan hiperkolesteroli, hiperhomosisteinomi, hipertansiyon, obezite, tip 2 diyabet ve gastrointestinal mikrobiyotadaki değişiklikler oldukça önemlidir. Örneğin hiperkolesteroliye bağlı olarak gelişen plazma membranındaki kolesterol seviyesindeki artışların kolesterol açısından zengin lipid suları aracılığı ile artan γ -sekretaz aktivitesi ile A β üretimini tetiklediği gösterilmiştir. Metabolik hipotez-1'e göre beyinde kolesterolün metabolizmasıyla oluşan oksistereol ara ürünlerinden 24-hidroksikolesterol (24-OHC) ve 27-hidroksikolesterol (27-OHC)'ün hastalık durumunda değişen metabolizmaya bağlı olarak AH 'de plazma sıvısında bir biyobelirteç olarak tespiti söz konusudur (Mendiola-Precoma ve ark. 2016; Zarrouk ve ark, 2017).

Obezite; kardiyovaskular hastalıklar, hiperkolestiro mi, metabolik sendrom ve tip-2 diyabet ile ilişkilidir. Obezite ile artan adipoz doku tarafından otokrin, parakrin ve ekzokrin olarak sentezlenen düzenleyici moleküllere adipokinler denilmektedir Metabolik hipotez-2'ye göre; obezite ile bozulan adipokin dengesi TNF α , IL6 ve leptin gibi proinflamatuvar sitokinlerin anlatımlarını arttırırken antinflamatuvar sitokin adiponektin ve BDNF anlatımını azaltmaktadır. BBB'den geçen adipokinler beyinde hipokampus gibi spesifik bölgelerde reseptörlerine bağlanarak onları aktive etmektedirler. Sonuçta TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler B hücresi nükleer faktör kappa-hafif zincir-aktivatörü (NF κ B) inflamatuvar sinyal yolağını aktive ederek downstream hedeflerden olan BACE-1'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle yüksek yağ içeren diyetlerin APP' nin β -sekretaz kesilimini ve insülin direnciyle ilişkili mitokondriyal hasarı arttırdığı gösterilmiştir. AH'de önemli olan bir başka mekanizma ise bir glutamat agonisti olan N-metil-D-aspartik asit (NMDA)'in reseptörünün (NMDR) anormal aktivasyonuna bağlı olarak hücre içerisine yüksek oranda alınan Ca⁺² iyonları ile gelişen eksisotoksitedir. NMDA reseptörünün anormal aktivasyonunun da A β peptidleri tarafından teşvik edildiği bilinmektedir. AH'da bir risk faktörü olan hiperhomosisteinominin, NMDA reseptörü aktivasyonu ve nöroinflamasyonu tetiklediği belirlenmiştir (Mendiola-Precoma ve ark, 2016; W.Wang ve ark, 2015).

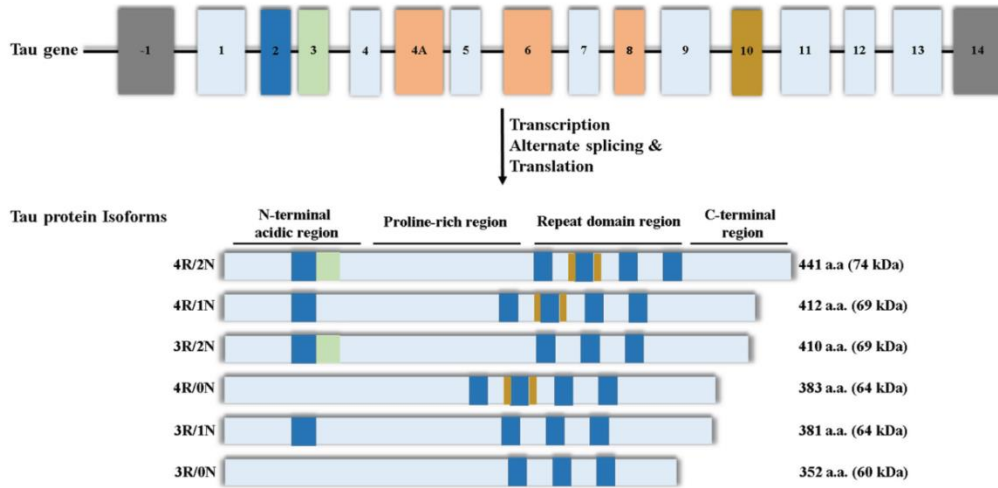
Son yıllarda yapılan çalışmalara göre bağırsak mikrobiyatasındaki değişiklikler nedeniyle vücutta; değişen lipid ve glikoz metabolizası sonucu gelişen metabolik hastalıklar, otoantikör oluşumu sonucu otoimmün hastalıkların gelişimi veya değişen bağırsak geçirgenliği sonucunda oluşan sistemik enfeksiyonlar görülebilmektedir. Sonuç olarak değişen nörolojik faktörler, endokrin sistem veya immünite nedeniyle AH' de dahil pek çok NH'nın tetiklenebildiği veya etkilerinin bu yolla arttığı ifade edilmektedir (Hu, Wang ve Jin 2016; Vogt ve ark, 2017).

2.5 TAU PATOLOJİLERİNİN GENETİK VE MOLEKÜLER ALT YAPISI

Mikrotübül ilişkili proteinler (MAP), hücre iskeletinin elemanlarından olan mikrotübüllerin yapısal ve işlevsel olarak düzenlenmesinde önemli rol oynayan protein gruplarıdır. MAP' ların en bilindik çeşitleri MAP-2 ve tau yapısal olarak farklılıklar göstermektedir. MAP-2 geniş yapısı nedeniyle, içi boş silindirik yapılar olan mikrotübülleri yaygın bir şekilde yan yana dizinlemektedir. Bu nedenle sinir hücrelerinde somatodentritik alanlarda bulunmaktadır. Tau proteini ise N-ucu domainlerinin daha kısa olması nedeniyle olması nedeniyle mikrotübüllerin akson boyunca sıkı bir şekilde demetlenmesinde rol oynamaktadır (Dehmelt ve Halpain 2004; Wang ve Mandelkow 2016).

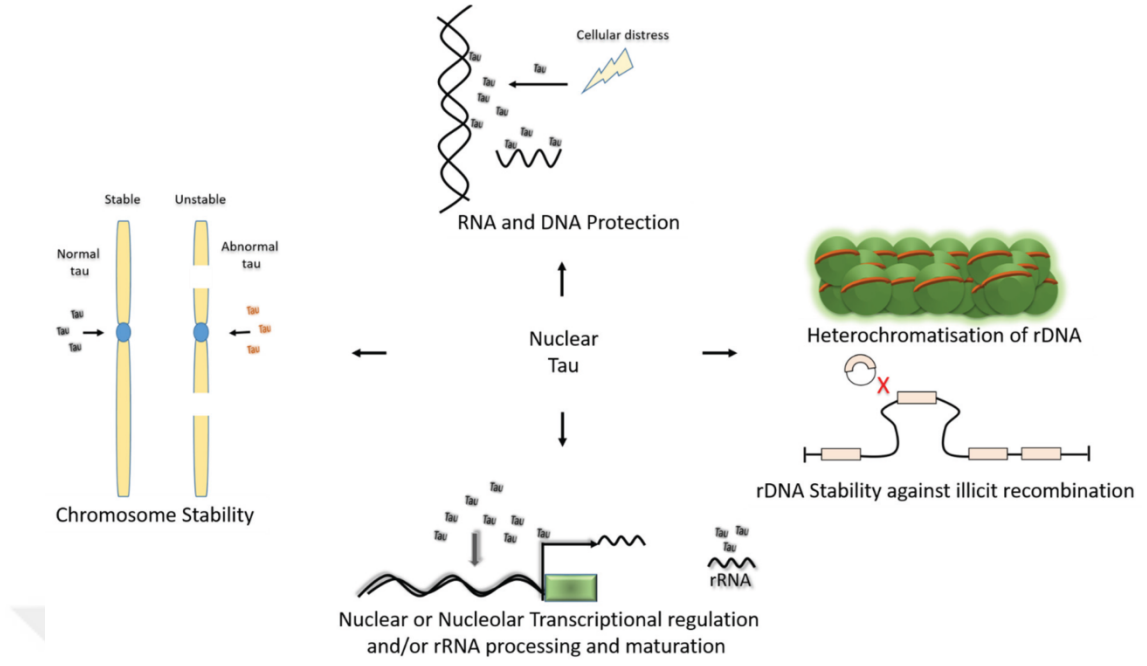
2.5.1 MAPT Geni, Tau Proteini ve Taupatilerin Genetik Altyapısı

Tau proteinini kodlayan MAPT geni insan 17. kromozomunun uzun kolunda (17q21) lokalize olmuştur. Ökaryotik organizmalarda gen ifadesinde çeşitliliği arttıran bir post transkripsiyonel modifikasyon olan alternatif RNA ekson kesilimi (alternatif kesilim) sayesinde 16 eksondan oluşan MAPT geninden sentez edilen tau proteinin 30' dan fazla farklı izoformu mevcuttur. Ekson4A'yı içeren 8-9 kilobaz (kb) mRNA transkriptleri retina ile periferik sinir sistemi (PSS)' nde yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) tau proteininin translasyonunda kullanılmaktadır. Şekil 2.11'de gösterildiği gibi ekson-2/3/10' un alternatif kesilimleri ile oluşan 6 kb'lık altı tau izoformu beyinde yüksek oranda sentezlenmektedir. Yapısal olarak dört bölgeden oluşan tau proteininin N-terminal asidik bölge (0N, 1N veya 2N) ve mikrotübül bağlanma bölgesi (MTB)'nin bulunma veya tekrar sayıları (3R veya 4R), farklı izoformlarda değişmektedir. MTB artı yüklü lizin amino asidi açısından zengindir, bu nedenle eksi yüklü mikrotübüller ile ilişki kurmaktadır. 4R izoformu 3R izoformuna kıyasla mikrotüüllere daha yüksek afinite göstermektedir. N -terminal domainlerin işlevleri tam olarak bilinmemekle birlikte tau'nun hücrenel lokalizasyonunda önemli oldukları düşünülmektedir(Maina ve ark, 2016; Wang ve Mandelkow, 2016).



Şekil 2. 12 MAPT geni ve tau mRNA'sının alternatif kesilim ürünleri (Maina ve ark., 2016). MAPT, 16 eksondan oluşmaktadır. Ekson- 14 Tau mRNA'sının 3' transkripsiyon edilmeyen kısmını içermektedir. Ekson-2/3/10' ün alternatif kesilimi tau proteininin MSS'de yaygın şekilde bulunan 6 izoformunun çeşitliliğini sağlamaktadır. Tau proteini yapısal olarak dört bölgeden oluşmaktadır: Amino (N) ucu asidik bölgesi, proline zengin bölge (PRD), mikrotübül bağlanma tekrar domaini (MTB) ve karboksil (C) ucu bölgesi.

Tau'nun 6kb'luk mRNA transkripti ile poliadenilasyon bölgesi farklılığı sonucu oluşan 2kb'luk tau mRNA transkriptinden transkripsiyona uğrayan izoformu ise genellikle nükleusu hedeflemektedir. Ayrıca 6 kb'luk mRNA transkriptinin alternatif kesilimi ile oluşan tau izoformlarından 1N4R görece yüksek oranda, diğer izoformlar ise daha düşük oranda nükleusu hedefleyebilmektedir. Şekil 2.13 'te gösterildiği gibi nüklear tau' nun kromozom stabilitesi, RNA ve DNA korunması (Şekil 2.14), nüklear veya nükleolar transkripsiyon düzenleme ile ribozomal RNA (rRNA) 'nın işlenmesi ve olgunlaşması işlevlerinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar bulunmuştur (Maina ve ark, 2016; Wang ve Mandelkow, 2016).

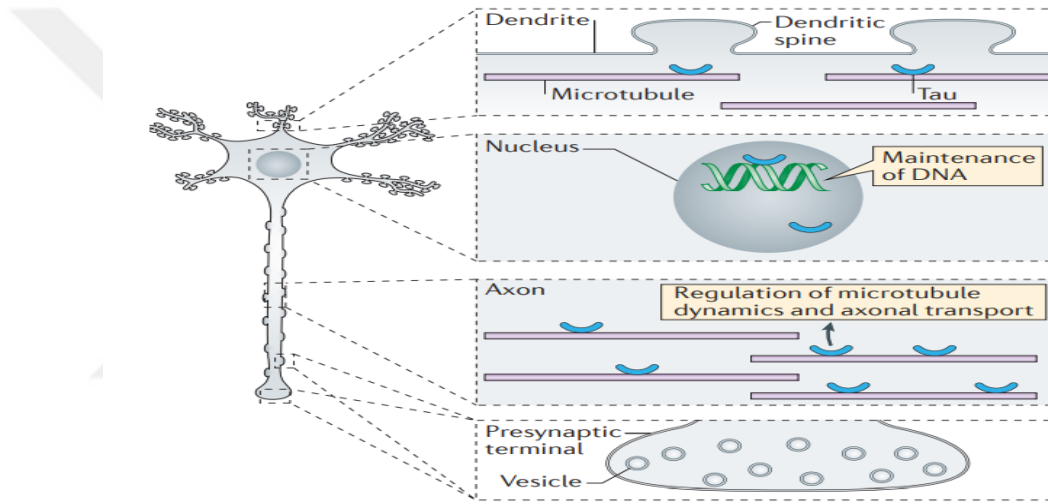


Şekil 2. 13 Nuklear Tau' nun potansiyel görevleri (Maina ve ark., 2016).

İnsanda 17. kromozomda bulunan MAPT'de 80' in üzerinde mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonlar alternatif kesilim bölgelerini ve peptid dizilimlerini değiştirebilmektedir. Alternatif kesilimi etkileyen mutasyonlar 4R ve 3R tau izoformlarının oranını etkilemektedir. MTB yakınında bulunan yanlış anlamalı mutasyonlardan bazıları; 272. glisin/valin (G272V), 279. asparjin/lizin (N279K), 301. prolin/lösin (P301L) dönüşümleri ve 280. lizin delesyonudur. Bu mutasyonlar tau'nun mikrotübüllere olan afinitesini azaltmakta ve bu şekilde tau birikiminin tetiklenmesine neden olmaktadır. Tau proteini ile ilişkili pek çok hastalık (taupati) bulunmaktadır. Birincil taupatiler olarak adlandırılan FTDP-17, arjirofilik tanecik hastalığı (AGN), sporadik çoklu sistem taupatisi (SMST), ilerleyen supranuklear palsi (PSP) ve kortikobazal dejenerasyon (CBD) dışında ikincil taupatiler olarak bilinen AH ve Creutzfeldt-Jakop hastalıkları bulunmaktadır. Taupatilerin çoğu sporadik olarak gelişmekle birlikte özellikle FTDP-17, PSP ve CBD gibi bazı taupatilerde MAPT genindeki ailesel geçişli mutasyonlar söz konusudur (Matarin ve ark, 2015; Wang ve Mandelkow 2016). Ayrıca yeni yapılan çalışmalarda bazı tau mutasyonlarının kanserde risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Rossi ve ark, 2018).

Tau proteini AH' da hücre içi protein birikimleri olan NFT'lerin içeriğinde bulunmakla birlikte, yapılan çalışmalarda tau ile benzer şekilde ortalama 3

mikrotübül bağlanma bölgesi içeren MAP2 bu yumaklarda bulunmamaktadır. AH 'de APP, PSEN1 ve PSEN2' deki mutasyonların ve yaşlanmanın sporadik tau birikimini tetiklediği, ancak MAP2 kaynaklı olan protein birikimi saptanamamış nörotoksisitenin AH'dan bağımsız olarak yaşlanma ve diğer taupatilerle tetiklenebileceği gösterilmiştir (Dehmelt ve Halpain 2004). Tau'nun sağlıklı nöronlardaki görevleri Şekil 2.14'te gösterilmiştir. Akson boyunca mikrotübüllerin organizasyonunu sağlayan tau aksonal iletimi düzenlemekle birlikte NF'ler ile birlikte aksonun bütünlüğüne de yardımcı olmaktadır. MAP2 yönünden zengin olan dentritlerde düşük oranda bulunan tau'nun görevi tam olarak açıklanamamıştır (Wang ve Mandelkow 2016).

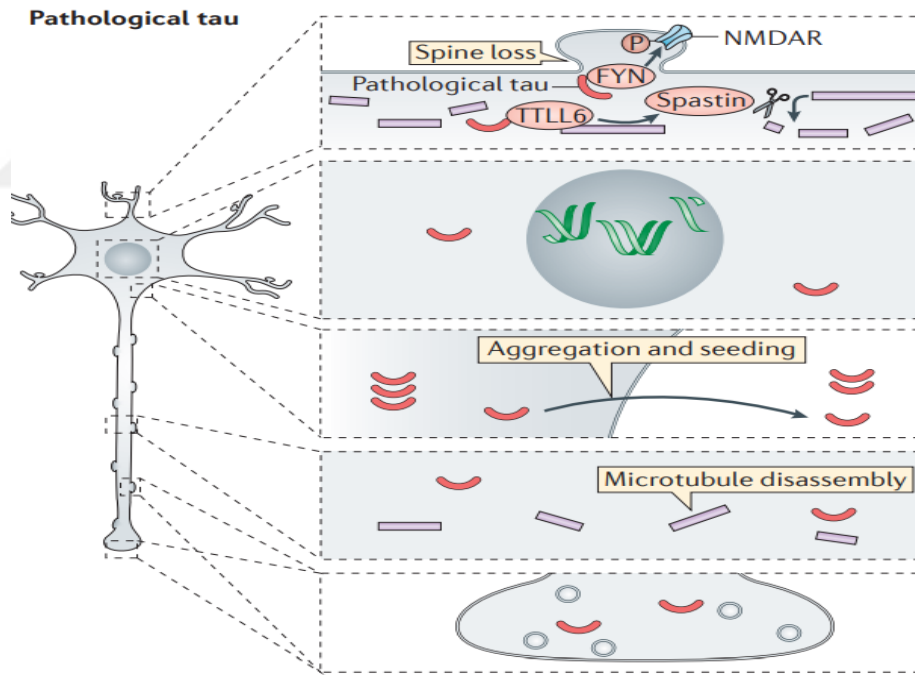


Şekil 2. 14 Tau proteininin sağlıklı nöronlardaki olası görevlerinin şematize edilmesi (Wang ve Mandelkow 2016).

2.5.2 Tau' nun Post-Translasyonel Modifikasyonlarının Taupatiler ile İlişkisi

Tau genellikle hücre içerisinde lokalize olan bir protein olmakla birlikte nöronal aktivite varlığında sinaptik alandan ekzositozla interselüler alana verilebilirler. Bu nedenle genellikle sağlıklı bireylerde CSF'de veya beyin İnterstisyel sıvısı (ISF)'nda tau'ya rastlanabilmektedir. Hiperfosforilasyon, asetilasyon, ubikuitinasyon veya kesilimide içeren çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar tau' nun mikrotübüllerden serbestlenmesine neden olabilmektedir. Sonuçta Şekil 2.15'te gösterildiği gibi aksonal iletimde bozulma, tau agregasyonu veya patolojik tau'nun eksozomlar veya ekzositoz ile ISF'ye geçmesi söz konusudur. ISF'deki tau endositoz, reseptör aracılı endositoz veya eksozomların plazma membranı ile füzyonuyla

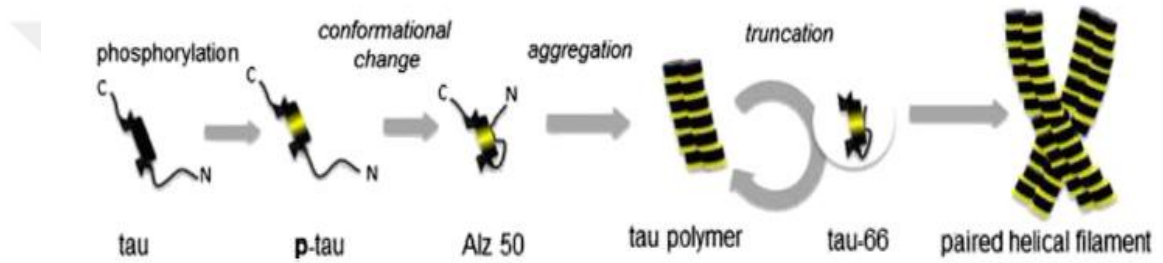
sağlıklı nöronlara iletilebilmektedir. Patolojik tau'nun pre-sinaptik alanlarda yanlış lokalizasyonu ile sinaptik vesikül kaybı, dentritler ya da post-sinaptik alanlarda yanlış lokalizasyonu ile de post-sinaptik iletimin bozulması ve sonuç olarak sinapsların kaybı veya patolojik tau'nun sağlıklı nöronlarda tau birikimi başlatmasına bağlı toksisite söz konusudur. Örneğin A β toksisitesi gibi stres faktörleri, tubulin tirozin ligaz-benzeri enzim 6 (TTL6) tarafından tau'nun dentritlerdeki yanlış lokalizasyonunu tetiklemektedir. Ardından spastin enziminin ATPaz aktivitesi ile mikrotübül bütünlüğünün bozulması uyarılmaktadır. Ayrıca patolojik tau nükleusta DNA ile bağlantısının kaybolması nedeniyle DNA koruyucu işlevini yerine getirememektedir (Şekil 2.15). Nüklear tau' daki mutasyonlar veya post-translasyonel düzenlemedeki anormalliklerin özellikle AH ve kanser gibi pek çok hastalığın patolojisinde önemli olduğu gösterilmiştir (Maina ve ark, 2016; Wang ve Mandelkow, 2016).



Şekil 2 15 Taupatilerin nöronlardaki muhtemel etkilerinin şematize edilmesi (Wang ve Mandelkow 2016).

Tau proteininin anormal düzeyde fosforile durumda olması NFT oluşumunu tetiklemektedir. Tau proteininin agregasyonunun aşamaları Şekil 2.16'da gösterilmiştir. Eksi yüklü fosfat gruplarının aşırı miktarda olması MTB' nin mikrotübüller yerine fosfat gruplarıyla etkileşimine neden olur ve sonuçta mikrotübüllerden serbestlenen

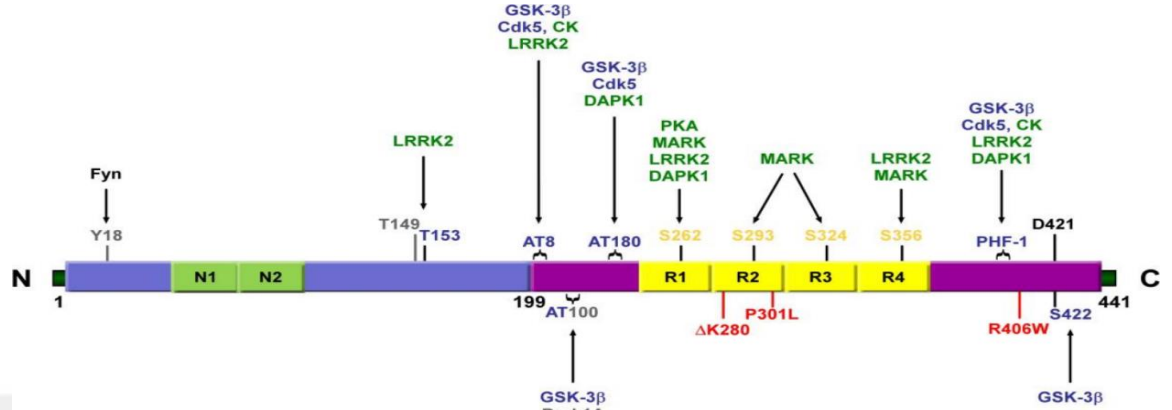
tau, Alz50 aşaması olarak adlandırılan kompakt yapıyı oluşturur. Bu aşamadan sonra proteolitik kesimler sonucu oluşan tau-66 formu, normal formuna kıyasla tau polimerlerinin ve sonuç olarak eşleşmiş helikal filament (PHF) 'lerin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. PHF'lerin çökmesi sonucunda ise NFT'ler oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda ayrıca AH beyin biyopsilerinde nükleuslarda da PHF'lerin varlığına rastlanmıştır (Lim ve ark., 2014; Mainave ark, 2016). Yapılan proteomik çalışmalarda NFT'lerin mitokondrilerde voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC), adenin nükleotid translokator ve ETS kompleks-I/IV/V'i hedefleyerek mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu tetikledikleri gösterilmiştir (Rodolfo ve ark, 2010).



Şekil 2. 16 Tau agregasyonunun aşamaları (Lim ve ark, 2014).

Tau fosforilasyonu tıpkı diğer proteinlerde olduğu gibi kinazların ve fosfatazların aktiviteleri arasındaki denge ile düzenlenmektedir. Bu dengenin tau kinazlarının aktivitesinin artması ve/veya tau fosfatazlarının aktivitesinin azalması lehine değişmesi tau proteininin fosforile formunun birikmesine neden olmaktadır. 2N4R tau üzerinde 85 potansiyel fosforilasyon bölgesi taşımaktadır. Bu fosforilasyon bölgelerinin 80'i serin/treonin (Ser/Thr) kinazlar, 5'i tirozin (Tyr) kinazlar tarafından hedeflenmektedir. Tau'yu fosforile eden 20'nin üzerinde kinaz bulunmaktadır (Şekil 2.17). Bunlar: stres ile aktive olan kinaz (SAPK)/c-Jun N-ucu kinazı (JNK), mitojenle aktive edilen kinaz (MAPK) ailesinden p38, tau protein kinaz 1/2 (TPK1/2), GSK3 α , GSK3 β , sikline bağımlı kinazlar (Cdk); hücre bölünme devri kinazı-2 (cdc2) ile CDK5, kalsiyum-kalmodülün bağımlı protein kinaz-2 (CaMK2), kasein kinaz (CK)' lar; CK1 ile CK2, mikrotübül afinite düzenleyici kinaz (MARK), protein kinaz A (PKA), ribozomal protein S6 kinaz beta-1 (p70S6K), lösince zengin tekrar kinazı-2 (LRRK-2), adenosin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK), ölüm ilişkili protein kinaz (DAPK), Fyn kinaz ve ikili-spesifik protein kinaz -1A (Dyrk1A)'dır. Şekil 2.17'de gösterilen AT8 (S199/S202/T205),

AT100 (T212/S214), AT180 (T231) ve PHF-1(S396/S404), tau üzerindeki fosforile olmuş yanlarında parantez içinde belirtilen ikili ve üçlü Ser/Thr bölgelerini tanıyan monoklonal antikordlardır (Mietelska-Porowskave ark, 2014; Tenreiro ve ark, 2014).



Şekil 2. 17 2N4R Tau proteini üzerindeki farklı fosfo-epitop bölgelerini hedefleyen farklı tau kinazları (Tenreiro ve ark, 2014). Mavi renkle belirtilenler Sistein-Prolin/ Treonin-Prolin (SP/TP) motiflerini, sarı ile belirtilenler Lizin-X-Glisin-Sistein (KXGS) motiflerini, gri ile belirtilenler prolin yönelimli kinazların (örneğin Fyn, LRRK2) fosforile ettiği epitopları ve yeşil ile belirtilenler ise prolin yönelimli olmayan serin/ treonin kinazların hedeflediği epitopları göstermektedir. Kırmızı ile belirtilen kısımlar ise FTDP-17 ile ilişkili bazı mutasyonları göstermektedir.

Tau fosforilasyonunun düzenlemesiyle ilgili olan bir diğer enzim grubunda protein fosfatazlar (PP): PP1, PP2A, PP2B, PP2C ve PP5 'tir. PP2A beyindeki tüm fosfataz aktivitesinin %70'ini yerine getirmesi nedeniyle tau'yu defosforile eden başlıca enzimdir (Wang ve Mandelkow 2016). Yapılan çalışmalarda PP2A ve PP2B aktivitelerinin AH beyin biyopsilerinde hastalık taşımayanlara kıyasla daha düşük olduğu gösterilmiştir. Okadaik asit gibi bazı inhibitörlerin varlığı PP2A ve PP1 aktivitesini engelleyerek tau fosforilasyonunu arttırdıkları gözlenmiştir. Ayrıca vücut sıcaklığındaki düşüğe bağlı olarak her 1°C'de PP2A aktivitesinin üssel bir şekilde azalmasına bağlı olarak tau fosforilasyonunun % 80 oranında arttığı ifade edilmektedir. Örneğin farelerde anestezi kaynaklı hipoterminin fosfo-epitopa bağlı olarak tau fosforilasyonunu 1,5 ile 31 kat arasında arttırdığı gösterilmiştir (Bretteville ve ark, 2012; Kamat ve ark, 2013).

Tau agregasyonunun önemli bir aşamasında Alz50 fragmentinin proteazlar tarafından kesilmesidir. Önemli tau proteazları: kaspazlar, kalsiyumla aktive olan proteazlar (Kalpainler), trombin, katapsinler ve puromisine duyarlı aminopeptidaz (PSA)'dır.

Bu proteazların aktivitelerinin çeşitli hücrel stres koşullarında değişmesi tau birikimini tetikleyebilmektedir. Tau proteini fosforilasyon ve kesilimi dışında asetilasyon, glikolizasyon, glikasyon, deamidasyon, izomerizasyon, nitrasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon gibi diğer bazı post-translasyonel modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda O-bağlı glikolizasyonun tau fosforilasyonuna karşı koruyucu, N-bağlı glikolizasyonun ise tau fosforilasyonu ve birikimini tetiklediği gösterilmiştir. MTB'deki lizin metilasyonunun ise tau agregasyonunu engellediği belirtilmektedir. Ayrıca glikasyon, deamidasyon ve izomerizasyonun PHF'lerin yapısında gözlenmesi nedeniyle tau birikimini tetiklediği, nitrasyonun ise hedeflediği bölgenin konumuna göre tau birikiminden koruyucu veya tetikleyici etkileri olabileceği öngörülmektedir (Hanger ve Wray 2010; Lim ve ark, 2014; Wang ve Mandelkow 2016).

Sporadik taupatilerin tetiklenmesinde potansiyel mekanizma şu şekilde ifade edilmiştir: başlangıçta mekanik hasar, oksidatif stres, okside olmuş LDL, A β oligomerleri gibi hasar sinyalleri dinlenme durumundaki mikroglialar tarafından algılanır, sonuçta NF κ B sinyal yolağı aktive olur ve pro-inflamatuvar sitokinler yüksek oranda salgılanır. Nöronlar tarafından algılanan pro-inflamatuvar sitokinler CDK5 ve GSK3 β gibi tau kinazlarının anormal aktivasyonunu sağlamaktadır. Sonuçta hiperfosforile olan tau sırasıyla PHF'leri ve NFT'yi oluşturmaktadır. Bunun yanında ailesel tau mutasyonları ile tetiklenen patolojik tau da burada döngüye katılır ve her iki kaynakla da oluşan tau oligomerleri ve PHF'ler ekstrasöronal alana salınarak, mikrogliaların aktivasyonunu uyarırlar. Sonuçta bir nöroinflamasyon döngüsü oluşur ve patolojik tau aynı zamanda APOE aracılığı ile mikrogliaların ve nöronların hasar sinyali ile uyarılmasını tetiklemektedir. Bu pozitif geri besleyicili taupati modeli nöroinflamasyon döngüsü nörodejenerasyonu arttırmaktadır (Cortés ve ark, 2018).

2.6 TAUPATİLER İLE DİĞER PROTEİNOPATİLERİN İLİŞKİSİ

Proteinopatiler arasında kesişen noktalar bulunmaktadır. Birincil taupati çeşitlerinden olan FTDP-17, PSP, CBD ve Pick cisimciği hastalığında temel olarak tau birikimi söz konusudur. Fosforile olmuş α -syn'in lewy cisimciği olarak birikim gösterdiği hastalıklar (Sinükleopatolojiler) PH dışında; demans ile birlikte görülen PH (PHD),

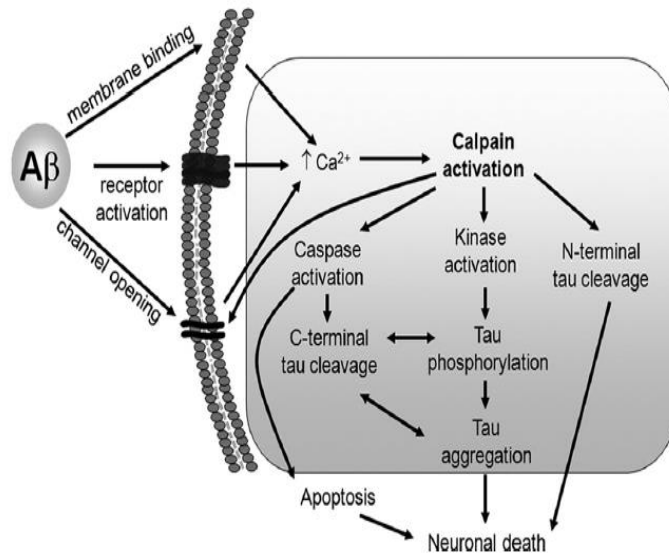
demans ile birlikte görülen LCH (DLB) ve çoklu sistem atrofisi (MSA)' dır. İkincil taupatiler olan AH ve Creutzfeldt-Jakop hastalığında birincil olarak biriken A β veya prion proteinleri taupatiyi tetiklemektedir. PDD, DLB, AH'nin Lewy cisimciği türevi (LBVAD), Guam-Parkinson-ALS demans kompleksi ve Down sendromunda NFT, lewy cisimciği veya A β birikimleri büyük oranda birlikte gözlenmektedir. Ayrıca AH ve PH' li bireylerin otopsilerinde her iki grupta da NFT ve lewy cisimciklerinin görülebildiği belirlenmiştir (Alafuzoff ve Hartikainen 2017; Moussaud ve ark, 2014).

2.6.1 Amiloid-Beta İlişkili Hücresel Sinyal Yolakları

Hücre dışarısındaki A β oligomerlerinin bazı sinaptik reseptörlere bağlanarak hücresel stresi ve sonuçta nöron kaybını tetiklediğine dair kanıtlar gittikçe artmaktadır. A β oligomerlerinin olası sinaptik reseptörleri: insülin reseptörü (IR), NGF reseptörü (NGFR), hücresel prion proteini (PrPc), metabotropik glutamat reseptörü-5 (mGluR5), efrin tipi-A reseptör 4 öncülü (EphA4), efrin tipi-B reseptör 2 öncülü (EphB2), NMDAR ve Wnt sinyaline ait frizzled koreseptörü olarak belirtilmiştir. A β oligomerlerinin bağlanması ile aktive veya inhibe olan bu reseptörlerin sonucunda hücre içerisinde tirozin kinaz (Tyr K), Fyn ve hücresel Abelson tirozin kinaz (c-Abl) gibi Tyr kinazlar ile CDK5 ve GSK3 gibi Ser/Thr kinazlar aktive olmaktadır (Beraldo ve ark, 2016; Izzo ve ark, 2014).

Dentritlerde yanlış lokalize olan patolojik tau, aynı zamanda bir tau kinaz olan Fyn'ye yapı-iskelesi proteini görevi yaparak onun A β oligomerlerine bağlanan PrPc aracılığı ile aktive olarak NMDAR'ı fosforile etmesini tetiklemektedir. Sonuçta direkt A β oligomerlerinin bağlanması veya PrPc'ye A β oligomerlerinin bağlanmasıyla Fyn tarafından fosforile olarak aktive olan NMDAR'dan hücre içersine Ca⁺² girişi gerçekleşmektedir. Ayrıca membran kolesterol oranının yüksek olduğu lipid sallarına bağlanabilen A β oligomerleride hücre içersine Ca⁺² girişini tetikleyebilir. A β teşviki ile hücre içersine giren Ca⁺² aracılığı ile AMPK ve CDK5 gibi kinazlar aktive olmaktadır (Nisbet ve ark, 2015). Sonuçta reseptör sinyalizasyonu veya Ca⁺² ile aktive olan kinazlar tarafından tau, α -syn ve NF'ler gibi hedefler fosforile edilir ya da hücre içersine giren Ca⁺² iyonları aracılığıyla kaspaz-3 ya da kalpainler gibi proteazların aktivasyonu sağlanmaktadır (Hoover ve ark, 2010; Millerve ark, 2014; Wray ve Noble, 2009).

Şekil 2.18'de gösterildiği gibi hiperaktif olmuş tau kinazları tarafından hiperfosforile edilmiş tau; kaspazlar tarafından C-ucundan, kalpain tarafından ise C-ucu ve N-ucundan kesilime uğrayarak agregatlar oluşturmaya başlamaktadır. Özellikle nöronal PGD'de önemli olan kaspaz-3 aktivasyonu, kalpainler tarafından veya hücre içi A β 'nin MMP'yi uyarması ile sağlanmaktadır. Sonuçta oluşan kronik oksidatif stres tau fosfatazlarını inhibe ederek ve oksidatif stres ile aktivitesi artan bir MAPK olan p38 tarafından tau'nun fosforilasyonu artırarak tetiklemektedir. Kaspazlar tarafından kesilen tau'nun da MMP'yi tetiklediği belirlenmiştir. Ayrıca dentritlerde yanlış lokalize olan patolojik tau'nun bir Ca⁺² /kalmmodulin bağımlı Ser/Thr fosfataz olan kalsinörini aktive etmesiyle defosforile edilen, aynı zamanda hücre dışı A β oligomerlerinin bağlanmasıyla α -amino-3-hidroksi-5-metil-4 izooksazol-propionik (AMPA) reseptörü (AMPA) olarak adlandırılan iyonotropik glutamat reseptörünün (AMPA) hücre içine alınıp yıkılması sonucunda uyarıcı glutamajik sinyalin azalması söz konusudur. Sonuçta tau sitotoksitesine veya kaspaz kaskadına bağlı olarak nöronal ölüm gerçekleşmektedir (Hoover ve ark, 2010; Miller ve ark, 2014; Wray ve Noble, 2009).

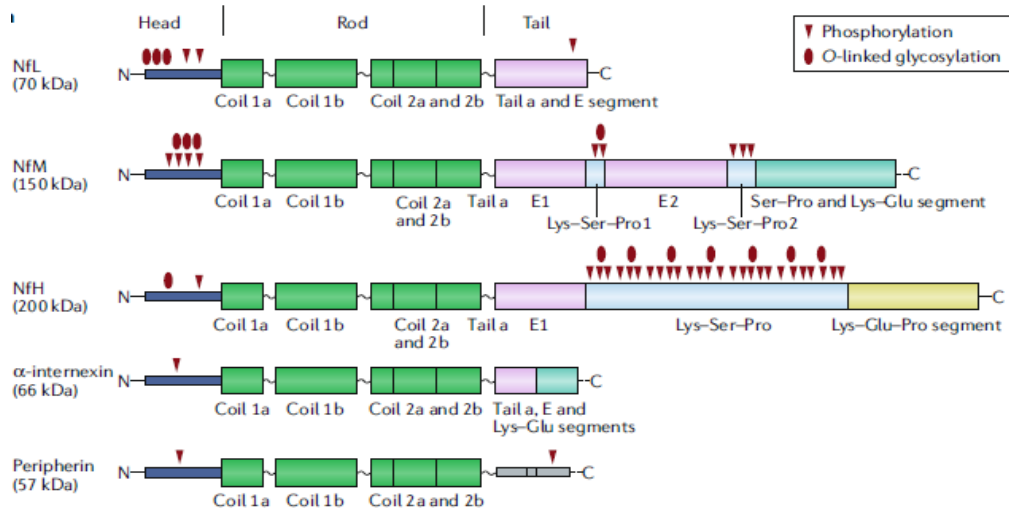


Şekil 2. 18 Hücre dışı Amiloid beta oligomerleri ile tau birikimi ve nöronal ölüm arasındaki ilişkiler (Wray ve Noble, 2009).

2.6.2 Nörofilament Patolojisi

NF'ler, nöronlar ve bazı nöron-benzeri hücrelerde sentezlenen ara filamentler (IF)'dir. Ağır-NF (NF-H), orta -NF (NF-M), hafif -NF (NF-L), α -interneksin gibi tip 4

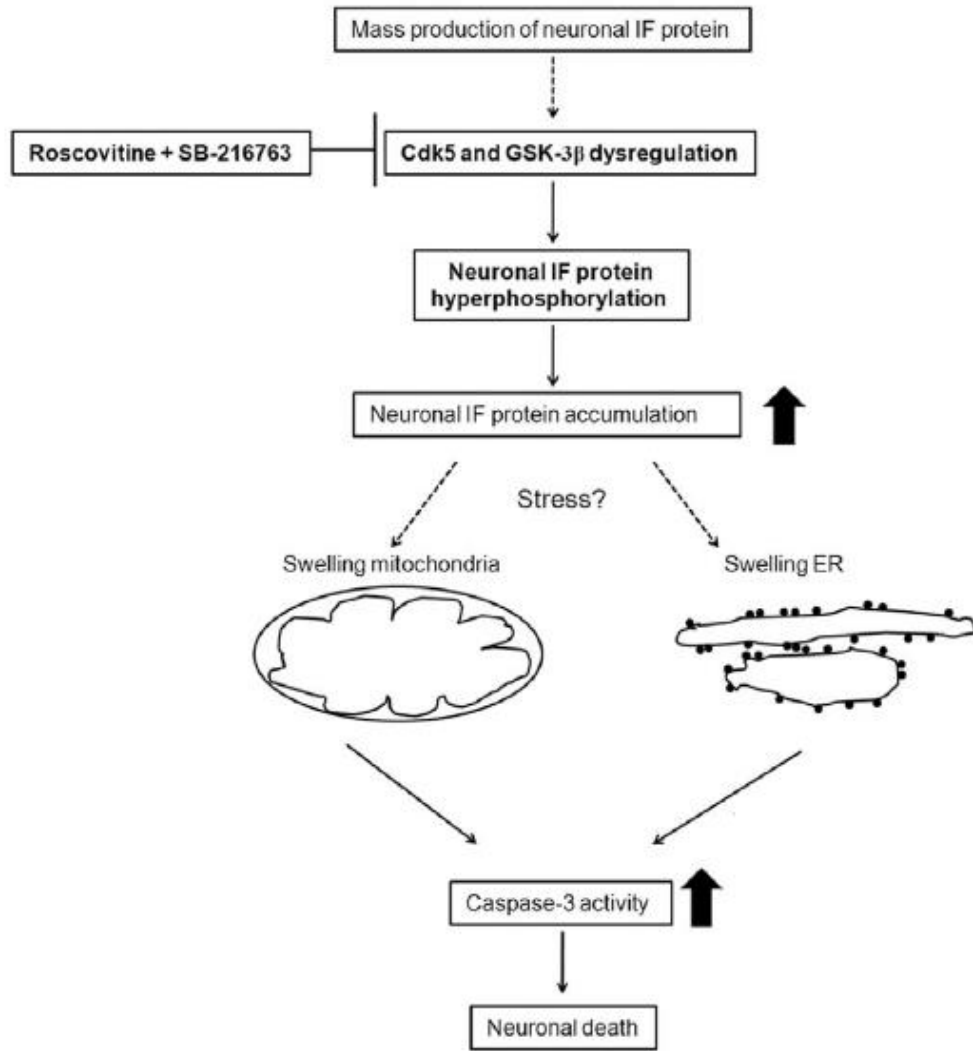
IF'ler ile periferin gibi tip-3 IF'ler olmak üzere 5 monomer grubuna ayrılan ve heteropolimer yapılar oluşturan NF'lerin birincil yapıları, moleküler ağırlıkları, fosforilasyon ile O-bağlı glikolizasyon bölgeleri Şekil 2.19'da gösterilmiştir. Buna göre baş kısımları olarak adlandırılan N-ucu bölgelerinde PKA ve protein kinaz-C (PKC) gibi kinazlar tarafından hedeflenmektedir. Kol bölgesi ise α -heliks protein yapılarının bir araya gelmesi ile oluşan sargılı bobin domainlerinden oluşmaktadır. NF'ler arasında asıl uzunluk ve amino asit diziliş farklılığını içeren kısımlar olan kuyruk bölgeleri ise NF-M ile NF-H'de daha yüksek oranda fosforile olmaktadır. Glutamik asit (Glu) açısından zengin segment (E segment), NF-M'de iki tekrarlı olarak (E1 ve E2) bulunmaktadır. E segmentleri ağırlıklı olarak tau kinazlarından GSK3 tarafından fosforile edilmektedir. NF-H'da bir büyük lizin-serin-prolin (KSP) domaini, NF-M'de ise iki adet kısa KSP domaini (KSP-1 ve KSP-2) bulunmaktadır. KSP domainleri ağırlıklı olarak tau kinazlarından olan GSK3 ve CDK5'in de dahil olduğu prolin yönelimli kinazlar tarafından fosforile edilmektedir. Ayrıca Ser-Pro, Lys-Glu veya Lys-Glu-Pro tekrarları açısından zengin domainler NF-L ve periferin dışındaki NF'lerin C-ucu kuyruk bölgelerinde bulunmaktadır (Khalil ve ark, 2018; Yuanve ark.,2012).



Şekil 2. 19 NF'lerin birincil yapıları ve modifikasyonları (Khalil ve ark, 2018).

NF'ler özellikle aksonların sağlamlığında önemli rol oynamaktadır. NF fosforilasyonu normal şartlar altında NF çapraz bağlanması, nöritlerin büyümesi, NF'lerin akson boyunca taşınması ve proteazlara karşı direnci sağlamaktadır. Ancak A β oligomerleri gibi çeşitli stres faktörleri tarafından GSK3, JNK1, p44/42, CK1

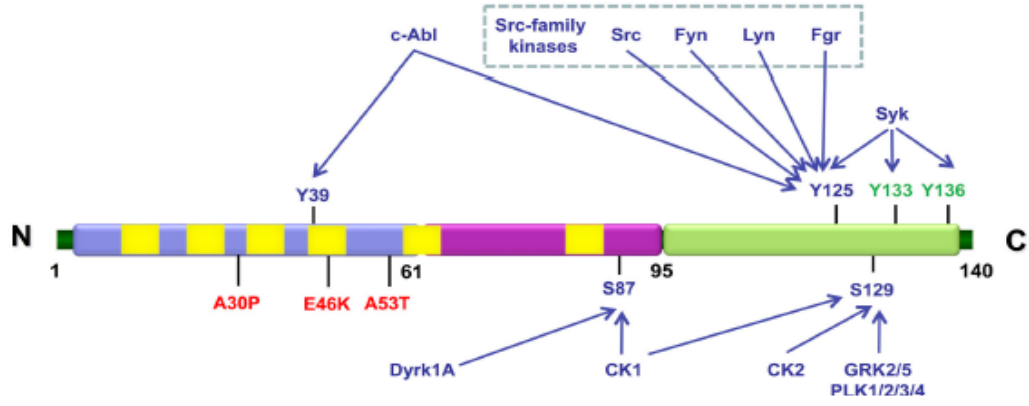
veya p38'in anormal aktivasyonu ya da PP1, PP2A veya PP2B'nin inaktive olması ile NF'lerin hiperfosforilasyonu ve birikimine neden olmaktadır. Sonuçta aksonların bütünlüğü bozulmakta ya da mitokondri ve ER aktivitesinin bozulması ile tetiklenen kaspaz-3 aktivasyonu sonucunda nöronal ölüm gerçekleşmektedir. Roskovitin (ROSC) gibi CDK5 inhibitörleri ya da SB-216763 gibi GSK3 inhibitörleri tarafından bu nörodejeneratif etkinin azaltılabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 2.20). Çeşitli mutasyonlar ve/veya NF'lerin anormal fosforilasyonuna bağlı olarak AH, bazı FTD çeşitleri, ALS, PH, DLB, spinal muskular atrofi (SMA), diyabetik nöropati, giyant aksonal nöropati gibi hastalıklarda nöronlarda NF birikimlerine ve CSF ile plazma sıvılarında NF formlarına rastlanılmıştır (Dale ve Garcia 2012; Khalil ve ark, 2018; Lee ve ark, 2012; Lee ve ark, 2014; Yuanve ark, 2012).



Şekil 2. 20 Nörofilament hiperfosforilasyonu ve nöronal ölüm arasındaki ilişki (Lee ve ark, 2012)

2.6.3 Alfa-Sinüklein Patojisi

Sinükleinler; α , β , γ ve sinoretin olarak 4 gruba ayrılan bir protein ailesidir. Alfa-syn 140 amino asitlik, asidik yapıda sinaptik bir proteindir. Başlıca görevleri; membran bütünlüğünün korunması, sinaptik plastisite, vesiküllerin taşınmasının kontrolü, dopamin gibi nörotransmitterlerin sinaptik vesiküller aracılığı ile ekzositozu ve tubulinler ile bağlantı kurulmasıyla mikrotübül ilişkili aktivitedir. Şekil 2.21'de gösterildiği gibi yapısal olarak 4 ana kısma ayrılmaktadır: N-ucu amfipatik bölge (mavi), A β olmayan komponent (NAC)'ide içeren hidrofobik merkez bölgesi (mor), yüksek asidik C-ucu bölgesi (yeşil) ve tamamlanmamış lizin-treonin-lizin-glutamik asit-glisin-valin (KTKEGV) tekrarları (sarı). Alfa-syn geni (SCNA), insanda 4. kromozomda konumlanmıştır ve ailesel geçişli; 30. alanin/prolin (A30P), 46. Glu / Lys (E46K) ve 53. Ala/Thr (A53T) tek nokta mutasyonları (Şekil 2.22, kırmızı) PH patogenezinde önemlidir. Alfa-syn mRNA'sı demir (Fe⁺) cevap elementi (IRE) içermektedir. Bu nedenle sitoplazmik Fe⁺ konsantrasyonunun artması durumunda α -syn protein üretimi ve birikimi artmaktadır. Alfa-syn pek çok kinazın hedefidir. Bunlar ; c-Abl, Rous sarkoma (Src) ailesi kinazları: Src, Fyn, lenfosit hücresi - spesifik-TyrK (Lck)/Yamaguchi sarkoma virüs onkogeni (Yes)-ilişkili yeni protein TyrK (Lyn) ve Felin Gardner-Rasheed sarkoma viral onkogen homologu (Fgr), Spleen TyrK (Syk), Dyrk1A, CK1, CK2, G-protein bağlantılı reseptör kinaz 2/5 (GRK2/5) ve Polo-benzeri kinaz-1/2/3/4 (PLK 1/2/3/4)'dır. Alfa -syn üzerindeki *in vivo* çalışmalar ile belirlenen fosforilasyon bölgeleri (Şekil 2.21, mavi): 39.Tyr (Y39), Ser 87 (S87), Y125 ve S129, *in vitro* çalışmalarla belirlenen fosforilasyon bölgeleri ise Y133 ve Y136 (Şekil 2.21, yeşil)'dir. Alfa-syn'in hiperfosforilasyonu lewy cisimciği oluşumunu tetiklenmektedir (Alafuzoff ve Hartikainen, 2017; Tenreiro ve ark, 2014).

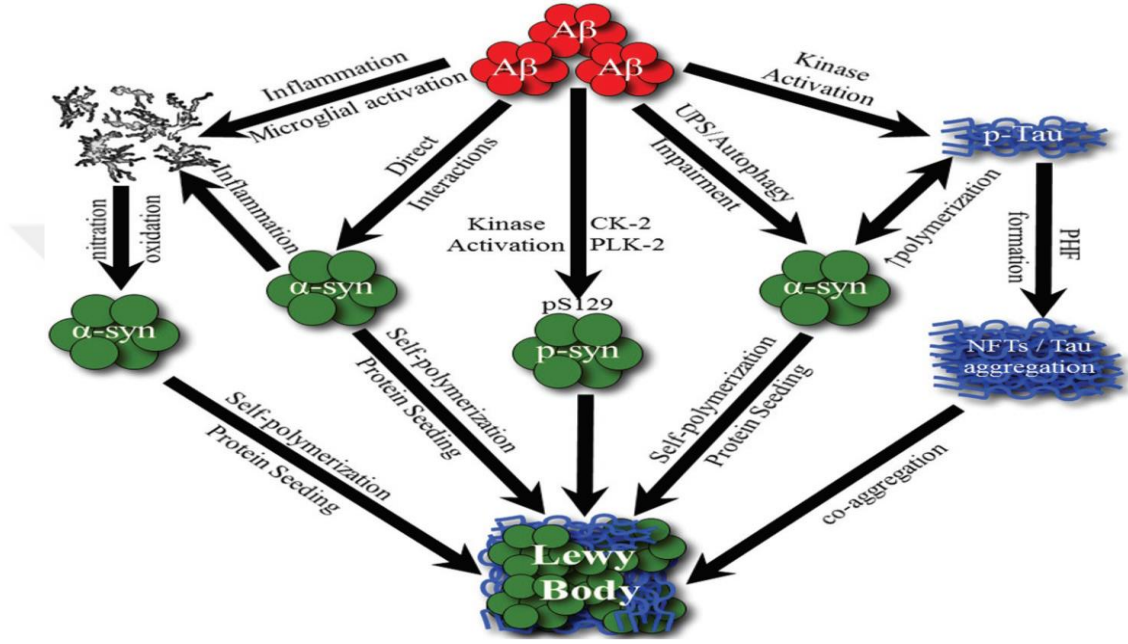


Şekil 2. 21 Alfa-sinükleinin birincil yapısı, hedefleyen protein kinazlar ve fosforilasyon bölgeleri (Tenreiro ve ark, 2014).

LCH veya AH ile PH'nın geç evrelerinde A β ve Lewy cisimciğinin birlikte birikimi söz konusudur. AH'de, amiloid içerikli olmayan plaklar (NACP) yapısında α -syn bulundurmaktadır. NAC domaini, α -syn yapısında bulunan 35 amino asitlik oldukça hidrofobik bir bölgedir ve A β ile etkileşime girerek amiloid plak oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda LCH'da A β 'nin α -syn birikimini tetiklediği gösterilmiştir (Şekil 2.22). Tanımlanan modelde bir molekül A β varlığındaki moleküler etkileşimler ile α -syn monomerleri sırasıyla dimer, trimer, tetramer ve merkezi por benzeri pentamerler oluşturmaktadır. Sonuçta MMP aktivasyonu sonucu Cyt-c salınımı ile apoptoz tetiklenebilmektedir. Ayrıca fosfotidil-inositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolağı ve APOE' ninde α -syn ve A β 'nin etkileşiminde önemli olduğu gösterilmiştir (Alafuzoff ve Hartikainen 2017; Crews ve ark, 2009; Majd ve ark, 2015).

Fosforile olmuş α -syn monomerlerinin mitokondri dışı membranın translokazı (TOR) aracılığı ile mitokondriye girip ETS-kompleks-1'in inhibisyonuna bağlı olarak ROS veya reaktif nitrojen türevleri (NOS)'nin üretimini tetiklediği belirtilmektedir. Bu nedenle α -syn'in nitrasyonu veya oksidasyonu aracılığı ile birikimi artarken ayrıca mitokondriyal DNA ve mitokondriyal matriks proteinlerinin hasarlanması ile mitokondriyal stres ve apoptozun tetiklenebileceği belirtilmektedir. Ayrıca ROS üretimi ile mikroglial aktivasyonu ve nöroinflamasyon tetiklenmektedir. A β varlığında tetiklenen mikroglial aktivasyonu ve nöroinflamasyonun etkisi ile aktive olan CK-2 ve PLK-2 tarafından tetiklenen α -syn S129 fosforilasyonunun UPS inaktivasyonu ve oksidatif strese neden olduğu, bu fosforilasyonun engellenmesi durumunda ise otofaji mekanizması ile α -syn oligomerlerinin temizlenmesinin aktive

edildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. PP2A, S129 defosforilasyonunda önemli rol oynadığından çeşitli hücrel stres koşullarında inhibe olmasının sinükleopati gelişimi açısından önemli olduğu söylenebilir. Ayrıca tau birikimi ile α -syn birikiminin karşılıklı olarak birbirlerini tetikleyebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 2.22) (Ganguly ve ark, 2017; Marsh ve Blurton-Jones 2012; Rocha ve ark, 2018; Tenreiro ve ark, 2014).



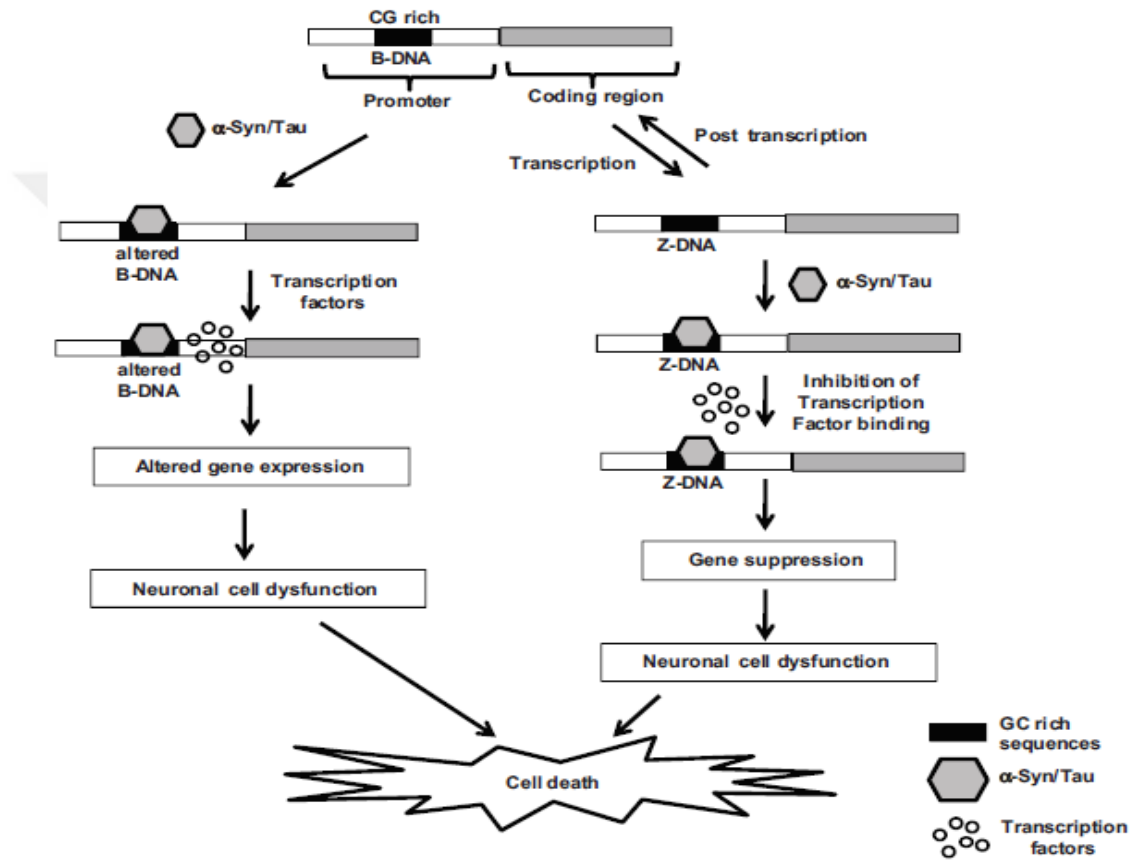
Şekil 2. 22 Amiloid beta, alfa-sinüklein ve tau' nun potansiyel etkileşimleri (Marsh ve Blurton-Jones 2012)

Tau ve α -syn'in nörodejenerasyon modellerinde birbirlerini tetikleyebilmesi ile ilgili pek çok yaklaşıma bağlı çalışma bulunmaktadır. Genetik çalışmalarda, SCNA, MAPT ve GSK3 genlerindeki polimorfizimlerin PH, DLB gibi hastalıklarda sinerjistik etkiden bağımsız olarak riski arttırabildiği belirlenmiştir. SCNA'nın ailesel mutasyonlarında veya gen ikilenmesi ve üçlenmesi gibi durumlarda tau birikiminin tetiklendiği gösterilmiş, ancak diğer PH ilişkili ailesel mutasyonlarda somut bir veri elde edilememiştir. MAPT genindeki mutasyonların ise aynı aile içerisinde bile parkinsonizm gibi heterojenik nörodejeneratif fenotiplere neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca insanlarda MAPT geninin % 75 oranında görülen H1 haplotipine göre yaklaşık 900 kb insersiyon bölgesi içeren H2 haplotipinin taupatiler ve onunla ilişkili sinükleopatilere karşı koruyucu tipte olduğu gösterilmiştir (Goedert ve ark, 2017; Moussaoud ve ark, 2014).

Tau ve α -syn'in birbirlerinin birikimlerini tetiklemesi ile ilgili moleküler çalışmalar; yavaşma bölgelerinin ve mutasyonların etkileşim üzerindeki etkileri veya tau ile α -syn'in kinazlar ya da tubulin ile etkileşimlerine dayalıdır. Tau' nun MTB'si ile α -syn'in C-ucu bölgesinde 55. ve 140. amino asitler arasındaki bölgenin etkileşime girebileceğine dair veriler elde edilmiştir. Tau S214 fosforilasyonunun α -syn ile bağlanmayı arttırdığı, α -syn üzerindeki ailesel PH ile ilişkili A30P, E46K ve A53T mutasyonlarının da tau ile bağlanmayı arttırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Tau üzerindeki P301L mutasyonunun ise α -syn ile etkileşimini azalttığı gözlenmiştir. Alfa-syn'in GSK3 β , PKA, LRRK2, JNK ve ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinaz (ERK veya p44/42)'lar ile bağlantı kurarak tau fosforilasyonu ve birikimini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca α -syn'in tubulin ile bağlantı kurarak tau'nun tubulinler ile bağlanmasını azalttığı ve dolaylı olarak tau fosforilasyonu ile birikimini arttırdığı belirlenmiştir. Alfa-syn üzerindeki ailesel PH ile ilişkili A30P, E46K ve A53T mutasyonlarının ise mikrotübül stabilitesini azalttığı ve PKA aracılı tau fosforilasyonunun arttırdığı, α -syn oligomerlerinin ise mikrotübül ilişkili motor proteinlerden olan kinesin ile tubulin etkileşimini bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* çalışmalarda doğal tip veya P302L mutant tau'nun vektörler aracılı ile anlatımının artırılmasının α -syn birikimi ve salgılanmasını tetiklediği gösterilmiştir. Bunun yanında tau anlatımının artırılmasının UPS ile otofajide önemli bir eleman olan, aynı zamanda da tubulini deasetile eden histon deasetilaz-6 (HDAC6) aktivitesini inhibe ederek α -syn birikimini ve tubulin destabilitesini tetiklediği gösterilmiştir (Leyk ve ark, 2015; Moussaud ve ark, 2014; Perez ve ark, 2009; Sengupta ve ark, 2015).

Alfa-syn ve tau' nun patolojik etkilerine dair yapılan DNA temelli çalışmalarda iki yeni hipotez ortaya atılmıştır (Şekil 2.23). Bu hipotezlerin temeli α -syn ve tau'nun DNA üzerindeki bazı genlerin sitozin/guanin (CG) tekrarları açısından zengin promotorlarına bağlanması ile ilişkilidir. DNA fizyolojik şartlar altında B-DNA konformasyonuna sahiptir. İlk hipoteze göre CG açısından zengin gen promotorlarına bağlanan α -syn veya tau B-DNA yapısını değiştirerek transkripsiyon faktör (Tf)'lerinin bağlanmasını etkileyerek gen anlatım profillerini değiştirmektedir. Sonuçta nöronal hücre fonksiyonları bozulmakta ve nöronal hücre ölümü tetiklenmektedir. Bir diğer hipotez ise transkripsiyon sırasında CG açısından zengin DNA bölgelerinin negatif süpersarım oluşumu ile B-DNA yapısından Z-DNA

yapısına değişimi ile ilişkilidir. Normal şartlarda transkripsiyon sonrasında Z-DNA yapısı, B-DNA yapısına geri dđnmektedir. Ancak transkripsiyon sırasında tau ve α -syn'in bağlanması Z-DNA yapısını stabilize ettiği ve transkripsiyonel strese neden olduğu belirtilmektedir. Sonuçta TF'ler ve RNA polimeraz'ın promotor bđlgesine bağlanması inhibe olmaktadır. Bu durumda bazı genlerin susturulması, nđronal fonksiyonların bozulması ve sonunda hđcre ۆlümünün tetiklenmesi sđz konusu olmaktadır (Maina ve ark, 2016; Raove ark.,2012).



şekil 2. 23 Alfa-sinüklein ve tau'nun spesifik DNA bđlgelerine bağlanarak nđronal ۆlümü tetiklemesine dayanan hipotezler (Rao ve ark, 2012).

2.7 TAU KİNAZLARI İLE İLİşKİLİ HÜCRESEL SİNYAL YOLAKLARI VE NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ

2.7.1 Glikojen Sentaz Kinaz-3

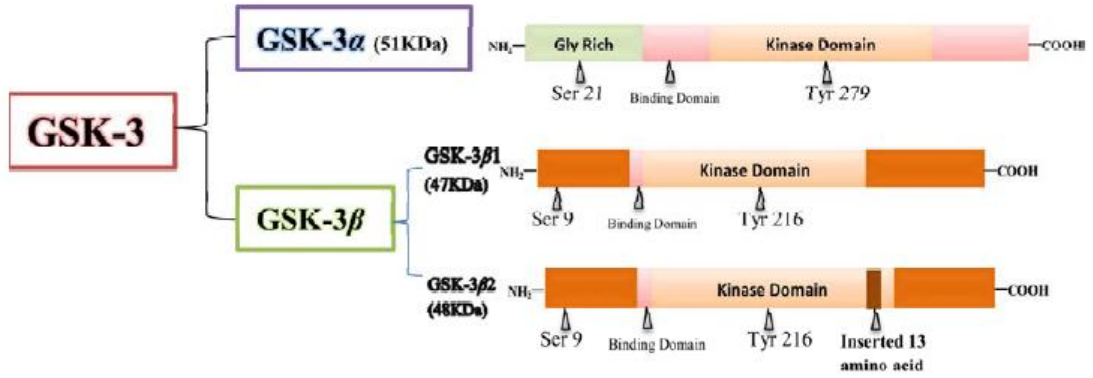
GSK3, prolin yönelimli serin-treonin kinaz ailesine mensup bir enzim olup tüm ökaryotlarda ortologları ve paralogları bulunmaktadır. GSK3-alfa (GSK3 α) ve GSK3-beta (GSK3 β) memelilerde iki farklı genden sentez edilmekte olup her iki

paralog enzimde; hücre büyümesi ile canlılığı, enerji metabolizması, gelişim, duyu durumu, immun cevap ve sirkadyen ritimde önemli olan sinyal yollarında merkezi bir rol oynayan serin-treonin kinazlardır (Hur ve Zhou 2010; Li ve Jope, 2010).

2.7.1.1 GSK3'ün Genetiği ve Moleküler Yapısı

İnsanda 19. kromozomda bulunan GSK3 α geninden sentezlenen 51 kilodalton (kDa) moleküler ağırlığa sahip bir protein olan GSK3 α ve 3. kromozomdaki GSK3 β geninden sentez edilen ekson8A'nın alternatif kesilim ürünleri 47 kDa'lık GSK3 β 1 ile 48kDa'lık GSK3 β 2 enzimlerinin primer yapıları kinaz domainleri açısından yüksek homoloji göstermekle birlikte, C-ucu amino asit dizilimleri ve GSK α 'nın N-ucu bölgesinde glisin (Gly) amino asidi açısından zengin bir alan içermesi bakımından farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 2.24). GSK3 β 1'ye göre kinaz domaininde 13 amino asitlik bir ilave bölge taşıyan GSK3 β 2 sentez edilen toplam GSK3 β miktarının %15'ini kapsamaktadır ancak merkezi sinir sisteminde bu izoform bulunmaktadır ve GSK3 β 1'e göre tau fosforilasyonunu daha az teşvik etmektedir. GSK3 β 2 beyinde dominant olarak sentez edilen izoform olması nedeniyle özellikle AH ve diğer taupatilerde önemli rol oynamaktadır. GSK3 β 'nin anormal aktivitesi tau üzerindeki Ser 199/202/400/404 ve Thr 50/149/153/386/403 gibi bazı domainlerde fosforilasyonu arttırmaktadır (Cai ve ark, 2012; Kaidanovich-Beilin ve Woodgett 2011; Lim ve ark, 2014).

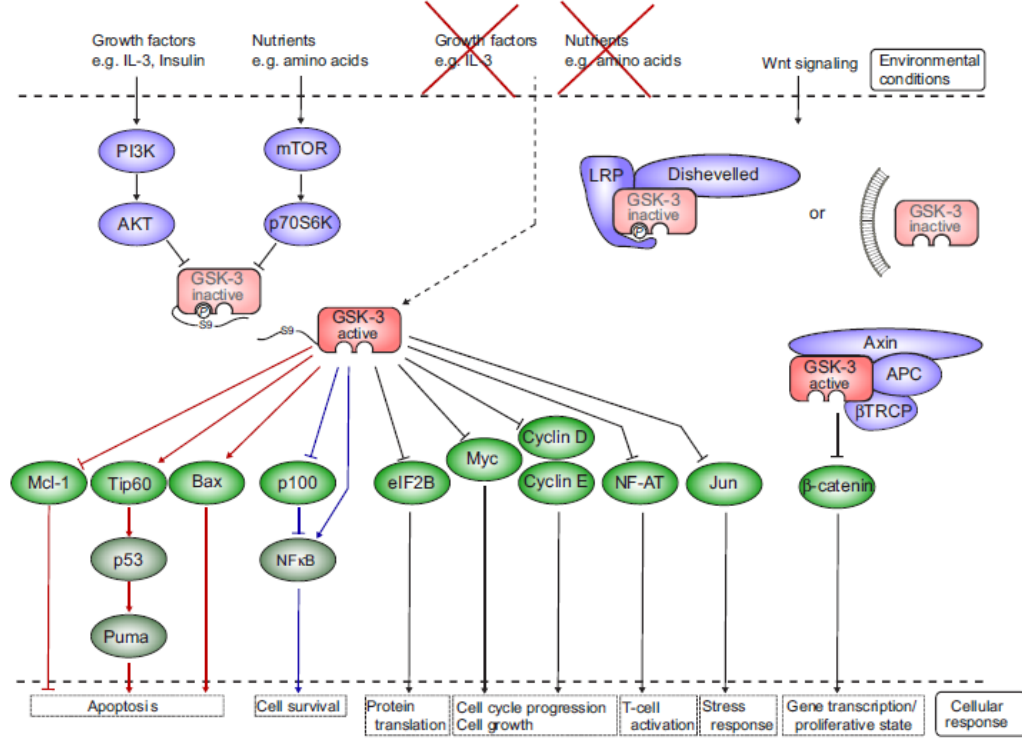
GSK3 paraloglarının aktivitesinin düzenlenmesinde fosforilasyon önemli bir post-translasyonel modifikasyondur. GSK'ün fosforilasyonu başka kinazlar ya da otofosforilasyonla düzenlenebilmektedir. Şekil 2.24'te gösterilen ve her iki paralog GSK3 formunda da mevcut olan bağlanma domainleri spesifik substratların seçiliminde önemlidir. Kinaz domainlerinin GSK3 α 'da Tyr279 ve GSK3 β 'nin alternatif izoformlarında Tyr216 fosforilasyonları enzim aktivitesini artırırken, GSK3 α 'nın Gly zengin domaininin Ser21 ve GSK3 β 'nin alternatif izoformlarının Ser9 fosforilasyonları ise enzim aktivitesini inhibe etmektedir (Cai ve ark, 2012; Kaidanovich-Beilin ve Woodgett 2011; Lim ve ark, 2014).



Şekil 2. 24. Memelilerde GSK3 proteininin farklı paraloglarının şematize edilmesi (Cai ve ark, 2012)

2.7.1.2 GSK3 İlişkili Tau Kinazları, Hücresel Sinyal Yolakları ve Nörodejenerasyon ile İlişkisi

Şekil 2.25' te GSK3 ün aktivitesini düzenleyen pek çok sinyal yolağı bulunduğu, aynı zamanda GSK3' ün; hücre ölümü, hücre sağkalımı, hücre devrinin ilerlemesi, hücre büyümesi ve bölünmesi, gen transkripsiyonu ve protein sentezi, stres cevabı ve immün sistem hücrelerinin aktivitesi ile ilişkili proteinleri düzenleyen kinaz olduğu gözlenmektedir. GSK3'ün aktivitesini düzenleyen başlıca sinyal yolakları: büyüme faktörleri, hormonlar veya sitokinlerin bağlanmasıyla aktive olan reseptör TyrK (RTK), G-protein reseptörleri veya hücre içi steroid hormon reseptörlerinin aktive ettiği PI3K/protein kinaz-B (PKB veya AKT) sinyal yolağı, pek çok sinyal yolağı ile etkileşimde olan ve önemli hücre içi monomer konantrasyonlarına bağlı olarak protein sentezi gibi pek çok metabolik olayın düzenlenmesinde görev alan rapamisinin mekanistik hedefi (mTOR) sinyal yolağı, özellikle embriyonik gelişim ile hücre sağkalımında önemli olan Wnt/ β -Katenin sinyal yolağı ve stres ile aktive olan p38 sinyal yolağıdır (Kaidanovich-Beilin ve Woodgett 2011; Maurer ve ark., 2014; Metcalfe ve Bienz 2011).



Şekil 2. 25 GSK3 ile ilişkili sinyal yollarına genel bir bakış (Maurer ve ark, 2014).

Post-mitotik nöronlarda IL-3, insülin, insülin-benzeri büyüme faktörleri (IGFs), NGF, BDNF ve Nt3/4/5 ile NPC'lerde FGF ve BMP gibi büyüme faktörleri, nörotrofinler veya morfojenlerin varlığı ile fosforile olan RTK'ler adaptör proteinler aracılığıyla PI3K'yı aktive etmektedir. Sonuçta hücre membranının sitosolik yüzeyine bakan inositol fosfolipidlerinin baş bölgesini fosforile edilmektedir. Burada fosforilasyon bölgesini tanıyarak aktive olan fosfoinositide bağımlı kinaz-1(PDK-1) ve mTOR'un rapamisine duyarlı olmayan refakatçısı (Rictor)/mTOR kompleksi (mTORC2) tarafından aktive edilen AKT tarafından Ser21 veya Ser9 fosforilasyonuna uğrayan GSK3 inaktive olmaktadır. Ayrıca GPCR'lere bağlanan nörotransmitterler, büyüme faktörleri veya peptid hormonları tarafından uyarılan Fosfolipaz-C (PLC), PP2A/Arestin-2 ve adenilil siklaz enzimleri ile PKC, AKT ve PKA aktive edilerek GSK3'ün inhibe edici fosforilasyonunu sağlayabilmektedir. PI3K/AKT veya ERK aracılığıyla aktive olan, hücre içi besin yetersizliği gibi stres koşullarında AMPK vb. proteinler aracılığıyla inaktive olan mTOR'un rapamisine duyarlı refakatçısı (Raptor)/mTOR kompleksi (mTORC1) normal şartlarda protein, nükleotid ve lipid sentezi, ribozom biyogenezini gibi bazı metabolik olayları tetikleyen bazı proteinleri aktive etmekte, otofajiyi ise inhibe etmektedir. mTORC1'nin aktive ettiği proteinlerden birisi olan p70S6K ribozom biyogenezini teşvik etmekte, ayrıca

GSK3'ü Ser21 veya Ser9 fosforilasyonu ile inhibe etmektedir (Bedse ve ark, 2015; Hermida ve ark, 2017; Hur ve Zhou, 2010; Kaidanovich-Beilin ve Woodgett, 2011; Maurerve ark, 2014; Taga ve ark, 2011)

AH risk faktörlerinde belirtildiği gibi yetersiz insülin sinyali PI3K sinyal yolağının çalışmaması aracılığıyla tau hiperfosforilasyonu ile ilişkilidir. Bunun yanında A β oligomerleri teşvikiyle; aktive olan CK2 ve CAMKII kinazları aracılığıyla IR endositozunu, anlatımı artan TNF- α aracılığıyla tetiklenen JNK tarafından, insülin reseptör subsratı-1 (IRS-1)'in inhibe edici fosforilasyonuna sebep olmaktadır. İnsülin direncinin ise; A β 'yı yıkan enzimlerden olan insülin degrades edici enzim (IDE) anlatımını azalttığı, PI3K/AKT sinyal yolağının işlememesine bağlı olarak nöral sağkalım, büyüme, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızayı azalttığı, ayrıca nitrik oksit (NO.) sentetaz aktivasyonunu azaltarak NO. üretimini düşürdüğü ve sonuçta serebral kan akışını azalttığı, pro-inflamatuar sitokinler ile ROS 'un seviyesini arttırdığı belirlenmiştir (Baranellove ark, 2015; Bedseve ark., 2015; Bosco ve ark, 2011).

MAPK ailesi: ERK'ler, SAPK/JNK, ERK/Büyük MAPK-1(BMK1) ve p38 grubu protein kinazlar olarak 4 alt gruba ayrılmaktadır. Forbol esterleri tarafından aktive edilen PKC ya da plazma membranındaki kinaz veya kinaz uyumlu reseptörlerine bağlanan büyüme faktörleri aracılığıyla aktive olan MAPK sinyal yolağındaki ERK ve onun hedefi p90 ribozomal S6 kinaz-1 (p90RSK1) tarafından da GSK'ün inhibe edici fosforilasyonu söz konusudur (Kaidanovich-Beilin ve Woodgett 2011). PI3K/mTOR/AKT sinyal yolağı tarafından aktive edilen p70S6K'ın aynı zamanda Tau üzerinde Ser 262/214 ve Thr 212 üzerinden fosforile ederek ve ribozomal protein S6 fosforilasyonu aracılığıyla tau mRNA'sının sentezini arttırarak PHF oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. p38 kendi içinde α , β , γ ve δ olarak lokalizasyonları aynı veya farklı olan dört alt tipe sahiptir. İnflamasyon, hücre çoğalması/sağkalımı/farklılaşması, stres cevabı ve apoptoz ile ilgili hedefleri bulunmaktadır. TNF α , IL-1 β /17, lipopolisakkaritler (LPS), mekanik stres, UV, osmotik stres, trombin, yüksek glukoz, NO., estradiyol, GPCR veya RTK'lar tarafından aktive edilen p38'de GSK3'ün inhibe edici fosforilasyonunu

tetiklemektedir. A β aracılı sitotoksosite ile de tetiklenebilen p38 tau hiperfosforilasyonunda rol oynamaktadır. Ayrıca oligomerik A β aracılı ile tetiklenen rat sarkoma viral onkogen homolog (Ras) guanozin trifosfatı hidrolize eden monomerik enzim (GTPaz)/ERK sinyal yolağı ve GSK3 tarafından APP Thr 668 fosforilasyonu ve tau hiperfosforilasyonu tetiklenmektedir. Benzer şekilde JNK'nın A β toksisitesi aracılığıyla tetiklenen glutamaterjik sinaps kaybında tau hiperfosforilasyonu ve APP Thr 668 fosforilasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. APP Thr 668 fosforilasyonu onun kesilimini tetiklemekte ve böylece A β kendi üretimini tetiklemektedir (An ve ark, 2005; Kirouac ve ark, 2017; Lee ve Kim 2017; Li ve Jope 2010; Pei ve ark, 2008; Taga ve ark, 2011).

GSK3 aktivitesini düzenleyen bir başka molekül grubu olan Wnt'ler gelişim ve homeostaside önemli olan parakrin faktörlerdir. Wnt sinyal molekülü tek geçişli LRP-5/6 ve çok geçişli Frizzled eş-reseptörleri tarafından sitoplazmik alanda algılanmaktadır. Wnt sinyali yokluğunda sitozolde yapı iskelesi proteinleri aksin ve Adenomatous poliposis koli (APC) tarafından tutulan kompleksteki GSK3 ve CK1 kinazları beta-katenin (β -katenin) Tf'sini fosforile ederek onun yine aynı komplekste bulunan Beta-transdüsin tekrarı içeren ubikuitin ligaz (E)-3 (E3) sınıfına ait β TRCP tarafından ubikuitin (Ub)'lenerek UPS tarafından yıkılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle nukleustaki β -katenin tarafından hedeflenen genler kapalı durumdadır. Farklı görüşlere göre; Wnt sinyali varlığında aktive olan koreptörlere bağlanan dishevelled yapı-iskelesi proteini aracılığıyla aksin ve APC'nin tutulması sonucunda GSK3, CK1 ve β TRCP'yide içeren kompleksi dağıtılır ya da GSK3 ile CK1 aktive olan LRP5/6 ve dishevelled tarafından tutularak inaktive edilir. Sonuçta UPS tarafından yıkılmaktan kurtulan β -katenin nukleusa geçerek hücre sağkalımı ile ilgili önemli genlerin sentezini sağlamaktadır. Wnt sinyalindeki bozuklukların AH ve kanserde dahil pek çok hastalıkla ilişkisi bildirilmiştir (Hur ve Zhou 2010; Kaidanovich-Beilin ve Woodgett 2011; Maurer ve ark, 2014; Metcalfe ve Bienz, 2011).

Aktif GSK3 proteini pek çok hücrel olayda rol oynamaktadır. Örneğin Bcl-2 ailesinden proapoptotik Bax'ı direkt fosforile ederek aktive etmekte, antiapoptotik Mcl-1'da inaktive etmektedir. Büyüme faktörü eksikliği, DNA hasarı ve ER stres gibi çeşitli hücrel stres koşullarında GSK3, insan immun yetmezliği virüsü (HIV)

transaktivatör proteini (Tat)-etkileşimli protein-60kDa (Tip60)'ı aktive ederek p53 aracılı apoptozu teşvik etmektedir. Pro-inflamatuvar sitokinler, antijenler, çeşitli protein epitopları veya LPS gibi patojenik belirteçler aracılığı ile aktive edilen TNFR, B-hücre reseptörü (BCR), TCR ve TLR gibi reseptörler NFκB sinyal yolağını aktive etmektedir. NFκB sinyal yolağı; kanonikal ve kanonikal olmayan sinyal yolları olarak ikiye ayrılmaktadır. Ayrıca RTK'lar veya GPCR'ler aracılığı ile aktive edilen AKT aracılığı ile de NFκB TF'lerinin aktivasyonu söz konusudur. NFκB TF'leri, pek çok retikuloendoteliyosiz (REL)-benzeri domain içeren alt ünitenin oluşturduğu; RELA/p65, RELB, NFκB1/p105, NFκB1/p50, REL, NFκB2/p52 ve en bol bulunan p65/p50 homodimer veya heterodimer protein kompleksleri şeklinde DNA'ya bağlanmaktadır. DNA'ya bağlanan NFκB TF'lerinin transkripsiyonal hedefleri arasında c-IAP ve FLIP gibi hücre sağkalımını tetikleyen proteinlerde bulunmaktadır. Aktif GSK3, NFκB inhibitörlerinden p100'ün UPS tarafından yıkılmasını sağlayarak hücre sağkalımını tetikleyebilmektedir (Lawrence, 2009; Maurer ve ark, 2014; Weizmann Institute of Science, 2017). Bununla birlikte NFκB p50/p65'in nöronlardaki transkripsiyonal hedefleri arasında APP ve BACE1'de bulunmaktadır (Snow ve Albensi 2016).

AH'de p53 ve GSK3β'nın etkileşimi direkt ile ilgili çalışmalarda elde edilen hipotez şu şekildedir: normal şartlar altında p53 seviyesi arttığında bir Ub ligaz 3 sınıfından fare çift dakika 2 (Mdm2) enzimi tarafından Ub'lenerek proteozomlarda yıkımı uyarılmaktadır, bununla birlikte DNA hasarı gibi stres koşulları altında p53 GSK3β ile etkileşime girerek stabilize edilir, bu durumda p53 GSK3β'nın aktivitesini tetikleyerek tau hiperfosforilasyonunu ve Aβ üretimini sağlamaktadır. Sonuçta üretilen Aβ, p53'ün transkripsiyonunu tetiklemekte ve ayrıca UPS'yi inhibe ederek p53'ün yıkımını engellemektedir. Bu şekilde bir döngü oluşmakta ve AH patogenezi ilerlemektedir (Proctor ve Gray, 2010).

Aktif GSK3'ün hedeflerinden biride ökaryotik translasyon başlama faktörü-2-beta alt ünitesi (eIF2B)'dir. Örneğin insülin sinyali olmadığında GSK3β fosforilasyonu aracılığı ile inaktive edilen edilen eIF2B protein sentezinin başlatamamaktadır. Yüksek glukoza bağlı olarak insülin sinyali varlığında ise defosforile edilerek aktive olmaktadır ve protein sentezi başlamaktadır (Mariappan ve ark, 2008). Aktif GSK3'ün hedeflerinden Miyelositomatos viral onkogen homologu (Myc) Tf, siklin

D ile siklin E hücre büyümesi ve hücre devrinin ilerlemesi için önemlidir. GSK3 tarafından fosforile edilerek inaktive edilen T hücrenin nuklear faktörü (NF-AT), kalsinörin aktivitesiyle defosforile edilerek nukleuse geçmektedir. Özellikle T hücre aktivasyonu ile adı anılsada MSS'de mikrogliya aktivasyonunda önemlidir. Düşük kalsinörin aktivitesinin AH'deki sinaptik fonksiyon bozukluğu, mikrogliya aktivasyonu ve nöronal ölümle bağlantısı gösterilmiştir. Ayrıca AH evrelerinde farklı NF-AT'lerin nukleusta biriktiği, *in vitro* çalışmalarda ise NF-AT'nin inhibe edilmesinin A β teşvikli nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir (Abdul ve ark, 2010; Maurer ve ark, 2014). Tau kinazlarından ERK, JNK ve p38 tarafından aktive edici fosforilasyona maruz kalan aktivatör protein-1 (AP-1) Tf alt ünitelerinden proto-onkogen Jun ailesi yine bir diğer tau kinazı olan GSK3 tarafından inhibe edici fosforilasyona uğramaktadır. Jun alt ünitelerinin yine AP-1 alt ünitelerinden Fos ailesiyle farklı şekillerde oluşturdukları dimerler hücre sağkalımı, stres cevabı gibi pek çok farklı görevden sorumludur (Sweeney ve Firestein, 2007).

2.7.2 Sikline Bağımlı Kinaz-5 ve Nörodejenerasyon

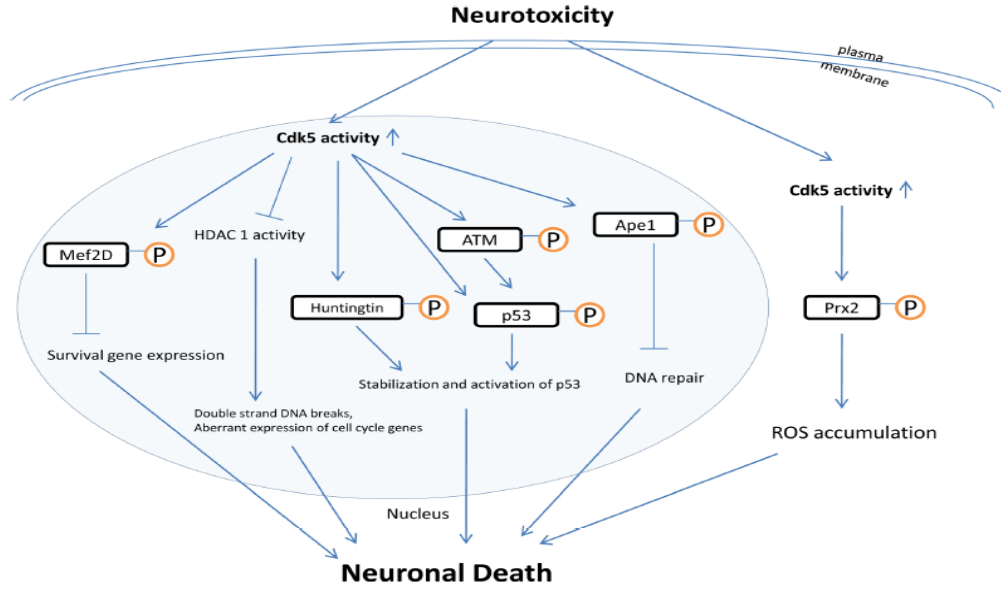
Sikline bağımlı kinaz (Cdk)'lar ailesinden olan CDK5, diğer Cdk'lerden farklı olarak mitotik hücrelerde hücre devrinde aktif rol oynamamaktadır. Ayrıca CDK5'in aktivitesi kendine özgü bağlanma proteinleri olan CDK5 düzenleyici alt ünite 1 (CDKR1 veya p35) ve CDK5 düzenleyici alt ünite 2 (CDKR2 veya p39) tarafından düzenlenmektedir. p35 beynin serebral korteksinde yüksek oranda sentezlenirken, p39 baskın olarak arka beyin ve post-natal serebral kortekste sentezlenmektedir. CDK5/p35 birlikteliği ekzositoz, sinaptik plastisite, nöronal sağkalım, nöral gelişim ve göç, farklı kinazlar arasında iletişim, hücre adhezyonu, hücre iskeleti proteinlerinin düzenlenmesi ve bellek gibi pek çok hücresel ya da sistemsel olayın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Castro-Alvarez ve ark, 2014; Shah ve Lahiri, 2014; Shukla ve ark, 2012).

Çoğalan hücrelerde Cdk-bağımlı inhibitör (CKI)'ler, örneğin CKI-1A (p21 Cip1) ve CKI-1B (p27 Kip1) tarafından veya Wee kinazlar ve membran-ilişkili Tyr ve Thr-spesifik Cdc2 inhibitör kinaz (Myt1) tarafından fosforilasyon ile inhibe edilmektedir. Bununla birlikte siklinler ve Cdk7 fosforilasyonu ile aktive edilmektedir. Post-mitotik nöronlarda ise SiklinD1, SiklinE ve GST-P1 (GSTP1) tarafından inhibe edilen CDK5, Siklin1, p35 ve p39 protein birliktelikleri veya Abl, EphA tarafından

fosforile edilerek aktive olmaktadır. ER stres veya eksisotoksisite kaynaklı hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ile aktive olan kalpainler tarafından kesilen p35 veya p39 proteinlerinin ürünleri olan p25 veya p29 ürünleri CDK5'in hiperaktivasyonuna neden olmaktadır. p35'in CDK5 tarafından fosforilasyonu ve bu fosforilasyonun PP2A ile PP1 tarafından geri döndürülmesi tarafından protein kompleksinin aktivitesi düzenlenmektedir (Castro-Alvarez ve ark, 2014; Shah ve Lahiri, 2014; Shukla ve ark, 2012).

Nörotoksik sinyaller altında CDK5'in nöronal ölümü tetiklemesinde farklı mekanizmalar söz konusudur. Örneğin A β teşvikiyle CDK5 aktivitesinin Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü-3 (STAT3) Tf'yi fosforile ederek nukleusa göçünü teşvik etmektedir. Sonuçta STAT3'ün hedef genlerinden BACE-1'in anlatımı teşvik edilerek APP kesilimi ve A β üretimi tetiklenmektedir. Ayrıca A β teşvikiyle artan CDK5 aktivitesinin GSK3 β ve PP1 inhibe edici fosforilasyonunu ancak sonuçta tau fosforilasyonunu, p38 ve JNK'nın aktive edici fosforilasyonunu ve golgi cisimciği fragmentasyonunun tetiklediği belirlenmiştir (Cheung ve Ip, 2012).

Artan CDK5 aktivitesinin; sağlıklı genlerinin sentezinden sorumlu olan miyosit-spesifik yükseltici faktör-2D (MEF2D)'nin inhibe edici fosforilasyonu, HDAC1' in inhibisyonu aracılığı ile çift zincirli DNA kırıklarının artması ve hücre devri proteinlerinin anormal sentezi, antiapoptotik protein hungtingtinin ya da DNA çift zincir kırıkları ile aktive olan Ataksi-Telenjektazi kinaz (ATM)'in fosforilasyonun veya p53'ün direkt fosforilasyonu aracılığı p53 proteinin stabilizasyonu ve aktivasyonu, DNA' nın baz-kesip çıkarma onarımı (BER)'dan sorumlu olan apürinik/apirimidinik endonükleaz-1 (APE-1)'in inhibe edici fosforilasyonu ve nöron sitoplazmasında konumlanan antioksidan enzim peroksiredoksin-2 (Prx2)'nin inhibe edici fosforilasyonu ile tetiklenen oksidatif stres aracılığı ile nöronal ölümü tetikleyebilmektedir (Zhu ve ark, 2011).



Şekil 2.26 Nörotoksik sinyaller altında CDK5 aracılı nöronal ölümün şematize edilmesi (Zhu ve ark, 2011).

2.8 ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ

ER, sitosolden tek katlı lipid membranı tabakasıyla ayrılmış tubular yapıda büyük bir organel sistemidir. ER sinyali içeren proteinler sitosolden çeşitli kanallar aracılığı ile ER lümenine veya membranına girerek golgi cisimciği, endozomlar ve plazma membranının arasında bir zar ve protein akımına katılmaktadırlar. Sitoplazmadaki proteinler ise içerdikleri sinyallere göre nukleus, mitokondri, kloroplast ve peroksizomlara gitmekte veya sitosolde kalmaktadırlar. ER lümenine alınan proteinler şaperon ER şaperon proteinleri tarafından bir kalite kontrolüne maruz kalmaktadır. ER lümenindeki ya da membranındaki yanlış katlanmış proteinlerin doğal yapılarına katlanmaları sağlanamazsa ER-ilişkili protein degradasyonu (ERAD) adı verilen proteinleri sitosole dönerek UPS ile yıkımlarını içeren bir düzenleme mekanizması devreye girmektedir. (Bermales ve ark, 2012; Hetz ve Saxena 2017; Lemus ve Goder 2014; Perri ve ark, 2016).

Nöronlarda oksidatif stres, genetik mutasyonlar, SNP'ler, nöral yaşlanma, UPS ve ERAD fonksiyonundaki bozukluklar, post-translasyonel modifikasyonlardaki değişimler, nöroinflamasyon, salgı yollarındaki bozukluklar ve Ca^{+2} düzenlenmesindeki bozukluklar proteinlerin yanlış katlanması veya birikimini

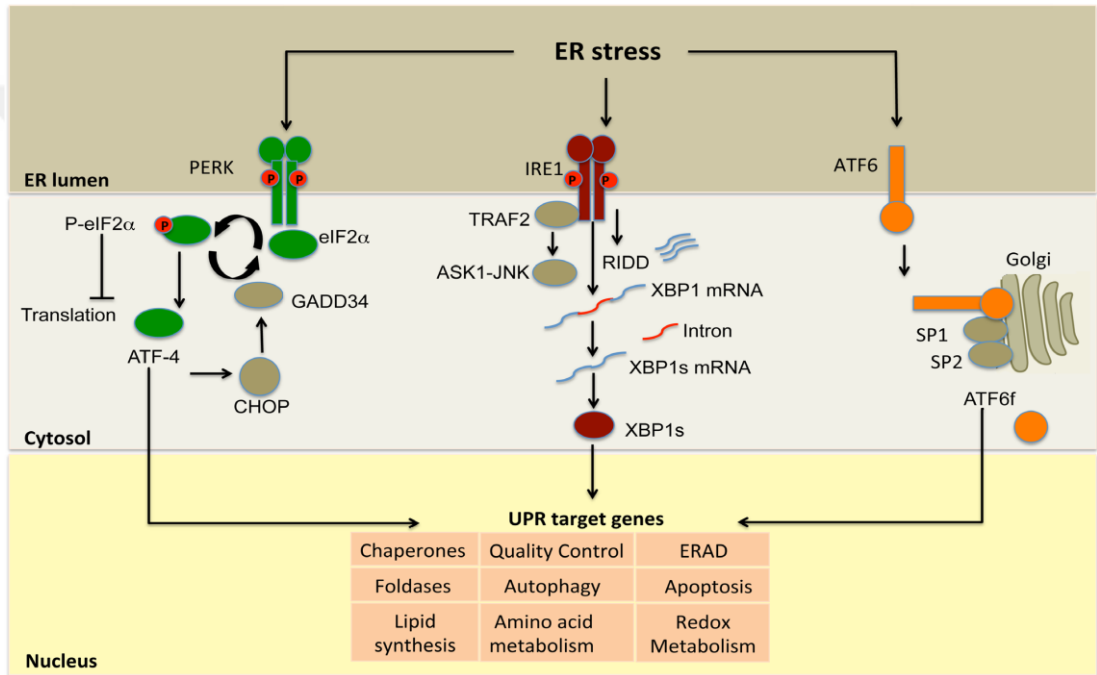
tetiklemektedir. Bu durumda ER lümenindeki veya sitosoldeki protein birikimleri ER stresi tetikleyebilmekte veya ER stresinde protein birikimlerini tetikleyebilmektedir. Sonuçta katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen bir sistem devreye girmektedir. UPR protein katlaması ve kalite kontrolü mekanizmalarını tetikleyerek ER stresini baskılayabilir, bu durumda protein birikimleri ile bozulan nöronal plastisite düzeltilebilmektedir. Ancak ER homeostasisinin yeniden sağlanmaması durumunda uzun süren ER stresi sinaptik fonksiyon bozukluğu, aksonal dejenerasyon veya nöronal ölümü tetikleyebilmektedir. ER stresi pek çok hastalıkla ilişkili olmakla birlikte özellikle proteinopatilerdeki rolü önemlidir (Bermales ve ark, 2012; Hetz ve Saxena 2017; Lemus ve Goder 2014; Perri ve ark, 2016).

2.8.1 Endoplazmik Retikulum Stresinin Moleküler Mekanizması

ER'de proteinlerin kalite kontrolü: şaperonlar tarafından protein katlanmasının doğru kontrolü ve ERAD aracılığı ile yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonu ile olmaktadır. ERAD ile kalite kontrolünde yanlış katlanmış proteinler ER membranındaki özel translokon sistemi ile sitosole geri transloke edilmektedir. Bu esnada ER membranında bulunan E3 tarafından geri-transloke edilen proteininin sitosolik kısmı Ub' lenir ve olaya diğer E1 ve E2'ninde katılmasıyla çoklu-ubikuitin zinciri (PUC) oluşur. Yine sitosolde bulunan deubikitinaz (DUB) tarafından doğru katlanmış proteinler üzerindeki Ub kaldırılıp ER'ye geri translokasyonları sağlanmaktadır. Uzayan Ub zincirleri ER lümenindeki veya sitosoldeki proteinlerin proteozomlara yönlendirilmesini sağlamaktadır (Lemus ve Goder 2014; Omura ve ark, 2013).

ER şaperon proteinleri; protein disülfit izomeraz (PDI), Ca⁺² ilişkili kalretikulin (CALR) ile kalneksin (CALNX), glukoz-düzenlenmiş protein-78 kDa (GRP78) veya diğer adıyla immunoglobulin ağır zincir bağlanma proteini (BİP), ısı şok proteini (HSP) 90 (HSP90) veya GRP94, GRP170 ve HSP47'dir. ER membranında bulunan transmembran stres algılama proteinleri: inositol gerektiren enzim 1 α (IRE1 α), aktive Tf 6 (ATF6) ve protein kinaz RNA-benzeri ER kinaz (PERK)'dir. Normal şartlarda ER lümeninde proteinlerle etkileşmeyen BİP şaperon proteinleri tarafından ER lümenine bakan kısımları tutularak inaktive durumda olan bu transmembran stres algılayıcı proteinler, ER lümeninde hatalı katlanmış veya biriken proteinlerin varlığı

durumunda BİP şaperon proteinlerinden serbestlenirler ve aktive olurlar. PERK ve IRE1 α , N -ucu domainleri ER lümeninde bulunan tek geçişli tip-1, ATF6 ise N-ucu domaini sitosolik yüzeye bakan tek geçişli tip-2 transmembran proteinlerdir. PERK ve IRE1 α 'nın sitosolik domainleri Ser/Thr kinaz aktivitesi taşımaktadır. ER stresi durumunda PERK'in otofosforilasyon ve oligomerizasyonu, IRE1 α 'nın ise bunlara ek olarak endoribonükleaz aktivitesinin teşvik edilmesi söz konusudur. Sonuçta UPR aktive olmaktadır (Şekil 2.27) (Bermales ve ark, 2012; Cabral-Miranda ve Hetz 2017; Graner ve ark, 2015).



Şekil 2.27 Memelilerde ER stresi ve UPR ilişkili sinyal yolları (Cabral-Miranda ve Hetz 2017).

PERK aktivasyonu ile eIF2 α 'nın inhibe edici fosforilasyonu aracılığıyla genel translasyon inhibe edilmektedir. Ancak eIF2 α bağımsız olarak bazı spesifik mRNA'ların translasyonu devam eder ve aktive Tf4 (ATF4) bunlardan biridir. ATF4'ün transkripsiyonel hedefleri arasında; ER şaperonları, otofaji ilişkili genler, redoks ve amino asit metabolizması ile ilgili genler bulunmaktadır. Kronik ER stres durumunda ATF4'ün transkripsiyonel hedeflerinden olan CCAAT/yükseltici-bağlanma-proteini-homolog protein (CHOP) Tf bulunmaktadır. CHOP Tf; PP1'in düzenleyici alt ünitesi-15A ya da büyüme tutulumu, DNA hasarı ile tetiklenen protein 34 (GADD34), ER oksidoredüktaz 1 α (Ero1 α), TRAILR-2 ve yalnızca BH3

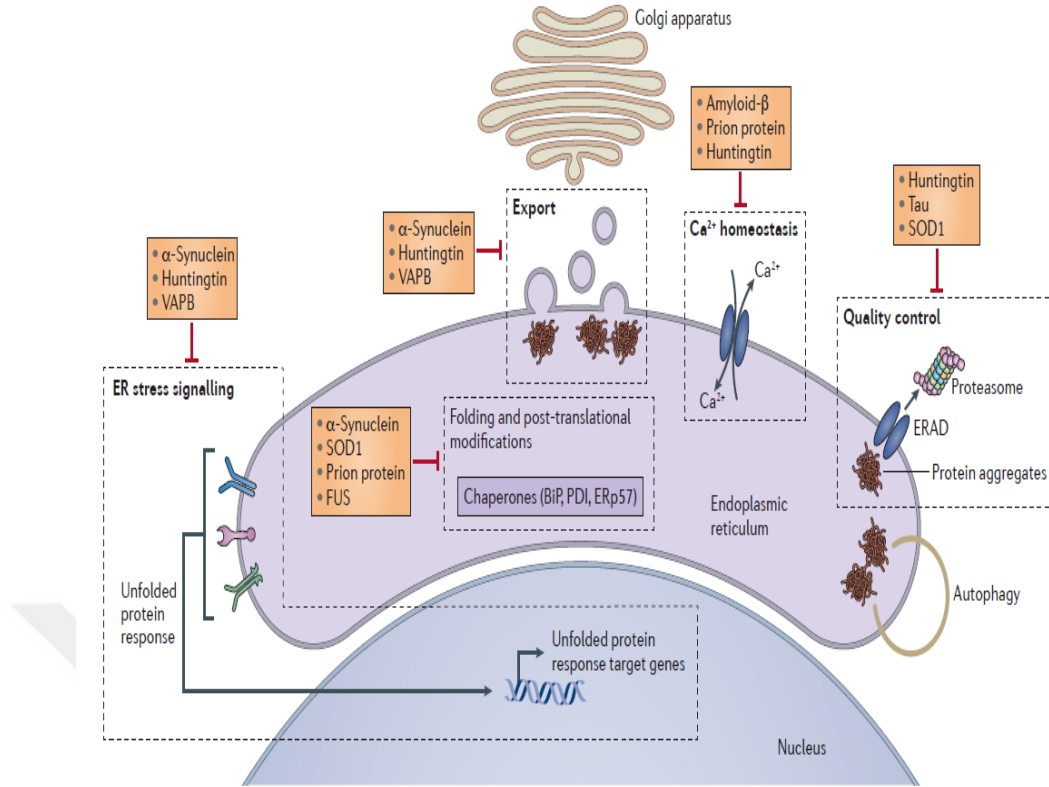
ile TM domaini içeren proapoptotik proteinlere ait genlerin aktivasyonundan sorumludur. Ero1 α aracılığı ile ER'nin hiperoksidasyonu sonucu inositol trifosfat reseptör (IP3R)'ünün aktivasyonu söz konusudur. Bu durumda; ER lümenindeki yüksek konsantrasyondaki Ca⁺²'nin sitosole veya IP3R ile VDAC'ın HSP70 ailesinden GRP75 (HSP75) tarafından bağlanmasıyla oluşan mitokondri ilişkili ER membranı (MAM) aracılığı ile mitokondriye geçmektedir. Normal şartlar altında IP3R aracılı MAM oluşumu BİP, AKT, Bcl-2/Xl tarafından inhibe edilirken kronik ER stres durumunda sitosolde kalpain aktivasyonu ile kaspaz-12 kesilimi ile başlatılan apoptotik yolağın, MAM aracılığıyla gerçekleşen MMP ile içsel apoptotik yolağın ya da TRAILR2 aracılığı ile dışsal apoptotik yolağın teşviki söz konusudur. Ayrıca GADD34 tarafından düzenlenen PP1'in aktivasyonu ile eIF2 α 'nın defosforilasyonu sonucunda protein translasyonunun yeniden başlatılması söz konusudur (Cabral-Miranda ve Hetz, 2017; Deldicque, 2013; Perri ve ark, 2016; Sano ve Reed 2013; Schäfer ve ark, 2014).

IRE1 α aktivasyonu ile tetiklenen IRE1 α -bağımlı mRNA yıkılımı (RIDD) ile sağkalımı tetikleyen proteinlerin ve ER'ı hedefleyen salgı proteinlerinin mRNA'larını hedeflenmektedir. Ayrıca IRE1 α 'nın endonükleaz aktivitesi X-kutusu bağlanma proteini-1 (XBP1) içerisindeki 26 nükleotidlik bir intron bölgesinin kesilimini tetiklenmekte ve oluşan kesilmiş XBP1 izoformu (XBP1s) mRNA'sından aktif XBP1s TF'ü sentezlenmektedir. XBP1'in transkripsiyonal hedefleri arasında ER şaperonları, ERAD, otofaji, lipid biyosentezi sağkalım ile ilişkili genler bulunmaktadır. IRE1 α fosforilasyonu sonrası TNF reseptörü ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve MAPK ailesinden apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) aktivasyonunda sağlanır. Böylece kapp B'nin inhibitörü (IkB) kinaz (IKK)'nın aktive edici fosforilasyonu ile IkB'nin fosforilasyonu ve UPS'de yıkılımı sonrası NF κ B sinyal yolağı aktive edilir. Böylece pro-inflamatuvar genlerin sentezi tetiklenir. Ayrıca p38 ve SAPK/JNK'ların aktivasyonu sonucu; AP1 fosforilasyonu aracılı inflamatuvar genlerin sentezinin tetiklenmesi, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin inhibe edici fosforilasyonları veya Tf'lerin aktivasyonu ile pro-apoptotik genlerin sentezi, BİM ve BAD'ın aktive edici fosforilasyonları aracılığı ile içsel yoldan apoptozu tetiklenmesi söz konusudur. ER stresi durumunda ATF6, Golgi aygıtına transfer olmakta ve buradaki bölge 1/2 (SP1/2) proteazlar tarafından kesilerek

sitosolik ATF6 fragment (ATF6f)'ini oluşturmaktadır. Sonuçta aktive forma geçen ATF6f TF 'nün bazı hedefleri; ERAD, CHOP, XBP1 ve ER şaperon genleridir (Cabral-Miranda ve Hetz 2017; Deldicque, 2013; Perri ve ark, 2016; Sano ve Reed 2013; Schäfer ve ark, 2014).

2.8.2 Nörodejeneratif Hastalıkların Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkisi

NH'lerde biriken farklı proteinler, çeşitli mekanizmalar aracılığı ile ER stresini tetiklemektedir (Şekil 2.28). Örneğin AH'de biriken tau, Huntington hastalığında biriken hungtingtin ve ALS'de biriken mutant SOD1 proteinleri ERAD aracılı kalite kontrolü ile proteozomal yıkıma ket vurmaktadır. Ayrıca AH'de biriken A β , prion hastalığında biriken prion ve hungtingtin birikimleri ER'den Ca⁺² salınımını teşvik ederek homeostasisi bozmaktadır. PH'da α -syn, ALS'de mutant vesikül-ilişkili membran protein- ilişkili protein B (VAPB) ya da hungtingtin protein birikimleri ER'den Golgiye vesikül trafiğini ve ER stres sinyal proteinleri aracılı UPR aktivasyonunu inhibe etmektedirler. Alfa-syn , mutant SOD1, prion veya ALS'de RNA bağlanma proteini olan sarkomda erimiş (FUS)'in mutant formunun birikimleri ER şaperonlarından PDI ailesine mensup ER-yerleşik proteini 57 (ERp57) ve BİP'in inhibisyonu aracılığıyla doğru protein katlanması ve post-translasyonel modifikasyonlarına ket vurulabilmektedir (Hetz ve Saxena 2017).



Şekil 2.28 Nörodejeneratif hastalıklarda biriken proteinlerin ER ve UPR üzerindeki etkileri (Hetz ve Saxena 2017).

2.8.2.1 Endoplazmik Retikulum Stresinin Taupatiler ve Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi

GWAS'lar aracılığı ile PERK geninine ait farklı alellerin PSP gibi çeşitli taupatiler için risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda ER stresinin NFT oluşumunun erken aşamalarında nöronlarda tetikleyici unsur olduğu, ayrıca tau'nunda ER stresini tetiklemeyle karşılıklı bir aktivasyonun söz konusu olduğu belirlenmiştir. IRE1 α fosforilasyonu ile aktive olan XBP1s TF'nün hedefleri arasında bulunan APP bulunmaktadır. Ayrıca IRE1 α ile aktive edilen JNK yolağında sentezi artan APP'nin kesilimini tetikleyen fosforilasyonunu uyarmaktadır. Sonuçta A β birikimi tetiklenmektedir. Yapılan çalışmalarda BIP ile HSP27 gibi ER şaperonlarının anlatımlarının AH'li bireylerin beyin otopsilerinde yüksek olduğu, BİP'in amiloid plaklar ile PDI'nın ise NFT ile aynı bölgelerde konumlandığı gösterilmiştir. Ayrıca fosforile olmuş PERK ve eIF2 α 'nda NFT'ler ile aynı bölgelerde konumlandığı gösterilmiştir. AH'de hiperfosforile tau'nun; düz ER ile Golgi'nin yapısal değişimlerini, tau'nun anormal N-glikolizasyonunu ve düz ER ile mitokondrilerin azalmasını tetiklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Bruch ve

ark, 2017; Cabral-Miranda ve Hetz, 2017; Iqbal ve ark., 2010; Perri ve ark, 2016; Yuan ve ark, 2018).

2.9 HÜCRESEL GERİ DÖNÜŞÜM SİSTEMLERİ VE NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ

Hücrede proteinlerin katlanma ara ürünleri NH'de olduğu bazı şaperonlar, mutasyonlar, oksidatif stres veya post-translasyonel modifikasyonlardaki değişiklikler aracılığı ile yanlış katlanabilirler. Bu yapılar bazı şaperon proteinleri aracılı ile katlanma ara ürünleri formuna geri döndürülebilir. Bu durumda proteinlerin doğal formlarına katlanmaları teşvik edilebilir. Ancak yanlış katlanan proteinlerin miktarı fazla olduğunda moleküler şaperon sistemleri yetersiz kalır ve hücresel geri dönüşüm sistemlerinin devreye girmeleri gerekir. Bu sistemler otofaji ve UPS'dir. Hücrede doğal protein formları ve yanlış katlanan proteinler daha çok UPS tarafından temizlenirken otofaji ile yanlış katlanan proteinler ve onların oligomerleri, yaşlanmış organeller gibi daha büyük yapılar geri dönüştürülmektedir. Hücresel geri dönüşüm sistemleri yetersiz kaldığında ise yanlış katlanan protein oligomerleri ve fibrilleri inklüzyon cisimciklerini oluşturmaktadır (Dantuma ve Bott 2014; Lackie ve ark, 2017).

2.9.1 Otofaji Çeşitleri ve Mekanizması

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA) olarak 3 ana sınıfa ayrılmaktadır. Mikrotofaji sitoplazmik içerikteki proteinlerin lizozom membranı tarafından invajinasyonu ile, CMA ise sitosolde HSP70 ve eş-saperonlar aracılığı ile tanınan lizin/fenilalanin/glutamik asit/arjinin/glutamin (KFERQ) motifi içeren proteinlerin lizozom membranındaki lizozom-ilişkili membran proteini-2 (LAMP-2A) tarafından lizozom içerisine translokasyonu ile yıkılmalarını içermektedir. Makrotofaji: ER, trans golgi ağı (TGN), plazma membranı, nukleus membranı veya mitokondridişi membranı gibi farklı kaynaklardan elde edilen veya de novo olarak sentez edilen fagofor yapısının büyük protein oligomerleri veya yaşlı organelleri içine alacak şekilde uzayıp kapanarak otofagozom, geç endozom veya lizozom ile otofagozomun kaynaşmasıyla oluşan otofagolizozomlarda asit hidrolazlar tarafından otofagozomun iç membranının ve lümenal içeriğinin sindiriminin gerçekleşip açığa çıkan metabolik öncüllerinin sitosole bırakılması aşamalarını

içeren mekanizmadır. Makrotofaji ilişkili protein (Atg)'ler, makrotofajiyi düzenleyen yaklaşık 33 proteinin bulunduğu bir ailedir (Choi ve ark, 2013; Okamoto, 2014; Yates ve ark, 2017).

2.9.1.1 Makrotofajinin Moleküler Mekanizması

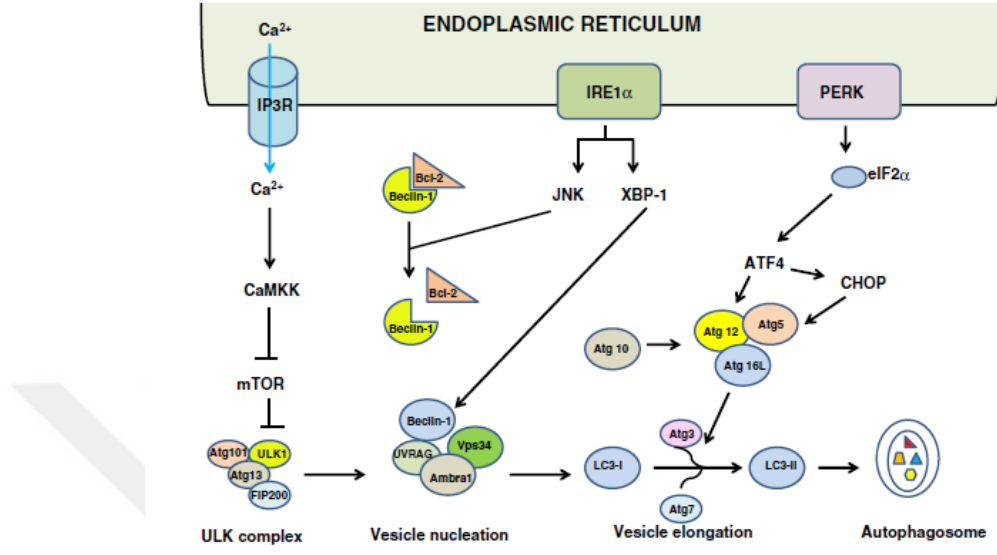
Makrotofajide ilk olarak mTORC1 sinyalinin inhibisyonuna bağlı olarak Unc51 (*C.elegans*)-benzeri otofaji aktive edici Ser/Thr kinaz (ULK1 veya Atg1A) kompleksinin uyarılması söz konusudur. ULK1 kompleksi: ULK1, ATG101, ATG13 ve Fokal adezyon kinaz (FAK)-ilişkili protein-200kDa (FIP200 veya ATG17)'den oluşmaktadır. ULK1 ve ATG13, mTOR tarafından inhibe edici, AMPK tarafından aktive edici fosforilasyona, TIP60 tarafından asetilasyona ve TRAF6 tarafından çoklu-Ub' ne uğramaktadır. ULK1, kendisini ve ayrıca ATG13, FIP200 ile ATG101'i fosforile etmektedir. Ub ve asetilasyon ULK1 kompleksini tetiklemektedir. Normal şartlarda golgi, TGN ve endozomlar arasında taşınan bir transmembran protein olan Atg9'un, açlık vb. otofaji tetikleyici stres varlığında ULK1 ve ATG13 tarafından fosforile edilerek otofagazom oluşturacak bölgede birikimi sağlanır. Atg9, fagofor oluşturulma bölgesi (PAS)'ın belirlenmesini sağlayan proteindir. Daha sonra vakuolar protein sınıflandırma (Vps) 34 (Vps 34) kompleksi, ULK1 kompleksi tarafından fosforilasyon ile aktive edilerek PAS'ta birikmekte ve otofajik vesikülün çekirdeklenmesini sağlamaktadır. Vps34 kompleksi: PI3K-katalitik alt ünite tip-3 (PIK3C3 veya Vps34), sargılı bobin miyozin-benzeri Bcl2-ilişkili protein (Beklin1, ATG6 veya VPS 30), UV-dirençli-ilişkili (UVRAG, Beklin-1 bağlanma proteini veya p63) ile otofaji ve Beklin 1 düzenleyici 1 (Ambra1)'den oluşmaktadır. ULK1 tarafından aktive edilen kompleks Vps34 aracılığı ile fosfotidil inositollerin baş grupları fosforile edilmektedir. Bu sayede otofagozom membranının uzamasıyla ilişkili Ub-benzeri konjugasyon sistemleri otofagozom membranına yönlendirilmektedir. MAP 1-hafif zincir 3 α (LC3A veya ATG8E) veya MAP1 hafif zincir 3 β (LC3B veya ATG8F), ilk olarak bir sistein proteaz olan ATG4 tarafından kesilerek LC3A/B-I'i adını almakta, ardından ise E1 benzeri Ub-benzeri düzenleyici aktive edici enzim (ATG7) ve E2 benzeri Ub-benzeri konjuge edici enzim (ATG3) aracılığı ile ubikutinlenmektedir. ATG10, E3 benzeri aktivite gösteren ATG5 ve ATG12'nin konjugasyonunu sağlamaktadır. ATG5/ATG12, LC3-I'in lipidasyonunu sağlayarak onun otofagozom üzerindeki fosfotidil etanolaminler ile LC3A/B-II adını alacağı konjugasyonunu sağlamaktadırlar. ATG16 benzeri 1 (ATG16L1) ise

ATG5/ATG12 ile LC3'nin etkileşimini sağlamaktadır. Seçici otofaji söz konusu olduğunda ise yanlış katlanan proteinlerin veya hasarlı organellerin öncelikle Ub'lenmesi, ardından ise Ub-bağlanma proteini sekuestrozom 1 (p62) gibi bir adaptör protein ve özgül otofaji reseptörü aracılı ile otofagozom membranı ile bağlantı kurması gerekmektedir. LC3A/B-II yapısının oluşumu otofagozom yapısının kapanıp olgunlaşmasını ifade etmektedir (Şekil 2.29). Daha sonra olgunlaşmış otofagozom ile geç endozom veya lizozom membranlarının kaynaşması ise çözünür N-etilmaleimid - duyarlı faktör bağlanma protein reseptör (SNARE)'leri ve Ras-ilişkili GTP-bağlanma proteini 7 (Rab7) GTPaz tarafından düzenlenen bir protein kompleksi ile sağlanmaktadır (Gatica ve ark, 2018; Müller ve ark, 2015; Okamoto, 2014; Sano ve Reed 2013; Yates ve ark, 2017; Zachari ve Ganley, 2017; Zaffagnini ve Martens 2016).

2.9.1.2 Makrotofajinin Hücre Ölümü, Endoplazmik Retikulum Stresi ve mTOR Sinyal Yolağı ile İlişkisi

ER stresi sonucunda IP3R'den salınan Ca^{+2} 'nin aktive ettiği CaMK kinaz(CaMKK) mTORC1'i inhibe ederek otofajiyi tetikleyen ULK1 kompleksinin aktive edilmesini sağlamaktadır. Anti-apoptotik protein Bcl-2 ile Beklin 1'in etkileşimi otofajiyi inhibe etmektedir. ER stresinde IRE α aracılığıyla JNK aktivasyonu ile Bcl 2'nun inhibe edici fosforilasyonu, Beklin 1'in serbestlenmesi sonucu otofaji tetiklenmektedir. Bir başka mekanizma ise kronik ER stresi ile tetiklenen MAM aracılı mitokondri Ca^{+2} konstrasyonu artışının, mitokondri bütünlüğünün bozulması sonucu sitoplazmik ATP'yi arttırması ile AMPK'nın ve dolayısıyla makrotofajinin inhibe edilmesini öngörmektedir. Ayrıca IRE α aracılıyla aktive olan XBP1s TF, Beklin-1 anlatımını arttırarak otofajiyi tetiklemektedir. Proapoptotik BİM aracılığı ile Beklin 1'in mikrotübüllerde tutulumuda otofajiyi inhibe etmektedir. Apoptotik kaspazların aktivasyonu ile Beklin 1 ve ATG 4'ün kesilimi de otofajiyi inhibe etmektedir. ATG12'nin konjuge olmayan formu pro-apoptotik yalnızca BH3 ve TM domaini içeren proteinlere benzerlik göstermektedir. Bu nedenle Bcl 2'yi tutarak içsel yolaktan apoptozu tetiklemektedir. Ancak anti-apoptotik Bcl-xl'in anlatımının yüksek olması, ATG3 ve ATG12'nin konjugasyonunu sağlayarak apoptozun inhibe edilmesine neden olmaktadır. Eksisotoksisite veya ER stresi aracılığı ile tetiklenen Kalpain aktivasyonu sonucu ATG5'in kesilimide otofajiyi inhibe etmektedir. Bununla birlikte PERK aktivasyonu ile aktive olan ATF4 TF'ü ATG12 ve CHOP

anlatımını arttırmaktadır. Ayrıca CHOP aracılığıyla da ATG5'in anlatımı tetiklenmektedir. Sonuçta PERK aktivasyonu ile otofaji tetiklenmektedir (Şekil 2.29) (Gorman, 2008; Sano ve Reed, 2013; Tait ve ark, 2014).



Şekil 2.29 Makrotofajinin moleküler mekanizması ve ER stres ile ilişkisi (Sano ve Reed 2013).

Otofagozolizozomun asidifikasyonu vakuolar tip-ATPaz (V-ATPaz) pompası ile sağlanmakta ve bu olay düzenleyici proteinlerle kontrol edilmektedir. mTORC1 tarafından bu düzenleyici genleri kodlayan Tf'nin inhibe edici fosforilasyonunda otofajik içeriğin yıkımını engellemektedir (Puertollano ve ark, 2018). Otofajinin düzenlenememesi veya anormal derecede tetiklenmesi hücre ölümünü tetikleyebilmektedir. Örneğin anormal derecede tetiklenen otofajinin FADD tutulumunu artırarak RIPK3 aktivasyonu aracılığı ile nekroptozisi tetikleyebileceği veya RIPK1 yıkılımı ile nekroptozisi inhibe edebileceği öngörülmüştür. Ayrıca otofajinin tetiklenmesi ancak tamamlanamamasının RIPK1 stabilizasyonu ve ROS üretiminin artmasıyla nekroptozisi tetikleyebileceği belirtmektedir (Duprez ve ark,2009; Gorman, 2008; Kroemer ve ark, 2009; Matarin ve ark, 2015; Tait ve ark., 2014).

2.9.2 Moleküler Şaperonlar ve Nörodejenerasyon

A β ile eş konumlanan moleküler şaperonlardan; HSP10 protein katlanması görevi ile mitokondri, sitosol, ER ve nukleusta ya da HSP60 protein birikiminin önlenmesi görevi ile mitokondride bulunmaktadır. Tau, A β , hungtingtin ve α -sinüklein ile eş

konumlanan HSP27; sitosol, ER ve nukleusta protein yıkımı görevi yapmaktadır. A β , hungtingtin, α -syn ve prion ile eş konumlanan; HSP70 protein katlanması/katlanmamış forma döndürülmesi görevlerini sitosol, ER, nukleus ve mitokondride, HSP90 ise protein yıkımı veya Tf görevleri ile sitosol ve ER'de bulunmaktadır. Hungtingtin ve α -syn ile sitosolde eş konumlanan HSP40 gen anlatımı, translasyonun başlaması, protein katlanması veya doğal haline döndürülmesi, α -syn veya prion ile sitosol ve ER'de eş konumlanan HSP104/110 ise ısı dayanıklılığı görevlerini gerçekleştirmektedir (Maiti ve ark, 2014; Wang ve ark, 2014).

HSP90, ATP veya ADP bağlı değilken açık konformasyonda olan ve yalnızca C-ucu domainleriyle etkileşen dimerlerden oluşmaktadır. ATP bağlandığında ATPaz aktivitesi gösteren N-ucu domainleri de dimerize olarak kapalı konformasyonu alırlar, bu durumda ATP hidrolizi tetiklenerek ADP bağlı yarı-açık konformasyona erişilmektedir. ADP'nin ayrılması sonucunda ise kapalı konformasyona tekrar erişilir ve bu bir döngü şeklinde devam etmektedir. Yanlış katlanmış proteinlere yüksek ilgi genellikle ADP bağlı formdadır. HSP90 aktivitesi; istemci proteinler: kinazlar, farklı enzimler, Tf'ler ve hücre iskeleti elemanları, eş şaperonlar: HSP 40/70/104, prostaglandin E sentaz 3 (p23), Cdc37 ile ATPaz homolog 1 (Aha1), geçici reseptör potansitel (TRP) domaini içeren: Hsp70/Hsp90 organize edici protein (HOP), E3 görevindeki HSP70'in C-ucu-etkileşimli protein (CHIP) ile PP5 vb. proteinler tarafından kontrol edilmektedir (Maiti ve ark, 2014). Örneğin HSP70 ATP hidrolizinin teşvikini düzenlemektedir. Yanlış katlanmış proteinlerde HSP90'ın rolü tam anlamıyla açıklanamamıştır. Çünkü yapılan çalışmaların sonuçları tezatlıklar içermektedir. Örneğin; *In vivo C.elegans* modelinde HSP90 ve eş-şaperonlarının nakavt edilmesi sonucu A β toksisitesi artarken, *in vivo* AH modeli farelerde HSP90 inhibitörlerinin kullanılması A β toksisitesini inhibe etmektedir. Bununla birlikte HSP70'in genel olarak nörodejenerasyona karşı korumada önemli olduğu, HSP90'ın ise ısı şok faktörü 1 (HSF1) Tf 'nü inhibe ederek HSP70 ile HSP40 gibi diğer şaperonların anlatımlarını azaltması aracılığı ile NH'yi tetiklediği belirtilmektedir (Lackie ve ark, 2017; Wang ve ark., 2014).

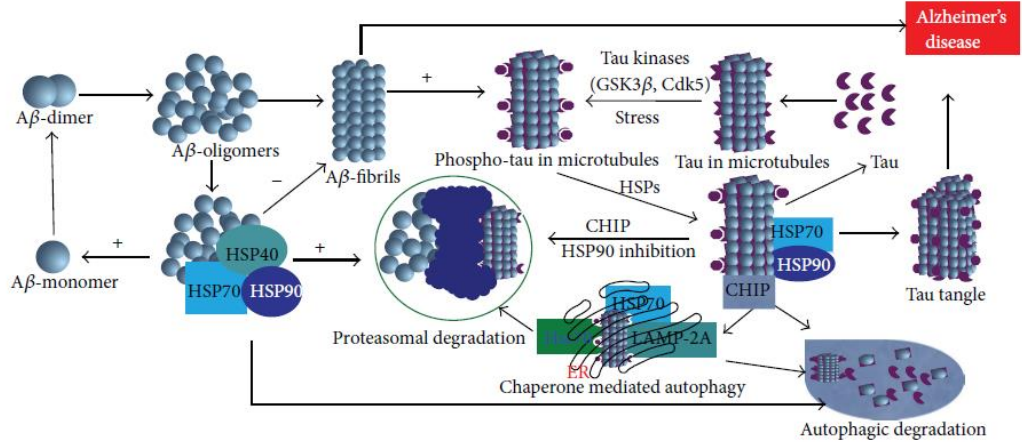
2.9.3 Hüresel Geri Dönüşüm Sistemlerinin Nörodejenerasyondaki Önemi

Pek çok NH'de gerçekleşen farklı protein birikimlerine benzer şekilde, Taupatiler ve AH'de biriken tau proteinin hüresel yıkım mekanizmaları; monomerik tau'nun Ub-

bağımsız olarak 20 sedimenastasyon katsayısı (S)'na sahip proteozomlarda yıkımı ya da fosfo tau, kesilen tau ile PHF'nin 26S UPS'de yıkımı ve NFT'nin seçici veya seçici olmayan otofaji ile yıkımıdır. Proteozom sistemi 20S kor bölgesi ile iki adet baş bölgesi olarak ifade edilen 19S düzenleyici kısımdan oluşmaktadır. Normal şartlar altında tau 20S kor bölgesi tarafından tanınarak yavaş şekilde yıkılabilmektedir, ancak stres koşulları altında iken Ub-edilmiş tau 19S baş bölgesi kısımlarınca tanınarak hızlı bir şekilde yıkımı düzenlemektedir (Lee ve ark, 2013; Wang ve ark, 2014).

2.9.3.1 Alzheimer Hastalığında Moleküler Şaperonların Hücresel Geri Dönüşüm Sistemleri ile İlişkisi

Şekil. 2.30'da gösterildiği gibi, A β oligomerleri HSP90/70/40 şaperon sistemi aracılığı ile A β monomerlerine çevrilebilmekte ya da otofaji ve proteozomlardaki yıkımı teşvik edilmektedir. Ayrıca HSP70 aracılığı ile APP'nin hücre membranına verilmesi engellenerek A β üretimi düşürülmektedir. AH patogenezinde çok önemli olan A β fibrilleri veya diğer stres koşulları aracılığıyla tetiklenen tau kinazlarının aktivitesi ile oluşan fosfo (p)-tau; şaperonların aktivitesinin düşük olmasına bağlı olarak birikebilir, HSP90/70 şaperon sistemi ile çözünür hale getirilebilir, kaspaz 3 tarafından kesilimi engellenebilir ya da fosforilasyonu engellenebilir. Şaperon sistemine CHIP'in katılımıyla Ub edilerek HSP90 inhibisyonu sonucu proteozomlarda, CHIP/HSP70 ve LAMP-2A aracılığıyla CMA'da veya otofajik sistemde yıkımı teşvik edilebilir (Maiti ve ark.,2014). Ayrıca ROS, p62, HDAC6, çatal kafa kutusu O (FOXO) Tf'leri veya K63 Ub zinciri aracılığıyla PHF ve fosfo tau'nun UPS ya da otofaji ile yıkımı tetiklenebilmektedir (Lee ve ark, 2013; Maiti ve ark, 2014; Zhang ve ark, 2017).



Şekil 2. 30 Moleküler şaperonların, otofaji ve UPS ile ilişkili olarak AH'deki rolü (Maiti ve ark, 2014)

2.9.3.2 Alzheimer Hastalığı ve Taupatilerin Hücresel Geri Dönüşüm Sistemleri Üzerindeki Etkileri

AH'de Aβ ile oligomerlerinin ve p-tau'nun 26S proteozomu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca Ub kodlayan gendeki çerçeve kayması mutasyonu tarafından UPS'nin inhibisyonunun AH gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. E3 görevi yapan parkin ve ERAD -ilişkili 5-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz degregasyon 1 homolog (HRD1)'in aktivitesinin AH'de azaldığı, CHIP'in ise arttığı gösterilmiştir. DUB aktiviteli Ub-C-ucu-hidrolaz L1 (UCHL1)'in aktivitesinin ise AH'de azaldığı belirlenmiştir AH ilişkili hiperfosforile tau'nun UPS ve kalpainlere dirençli olduğu gösterilmiştir. HSP70'in düzenleyici partneri olan Bcl 2-ilişkili athanojen 1 (Bag1)'in anlatımının artmasının tau'nun CMA' da yıkılmasını engelleyerek 20S proteozom sisteminde yıkılmasını tetiklediği belirlenmiştir (Dantuma ve Bott, 2014; Iqbal ve ark, 2010; Riederer ve ark., 2011; Sweeney ve ark, 2017; Zhang ve ark., 2017; Zheng ve ark, 2016).

AH ilişkili ailesel PSEN1 mutasyonu ile bazı sporadik faktörlerin lizozom asidifikasyonu ve otofagozom füzyonunu engellediği belirlenmiştir. Bu durumda otofajik vakuoller, tau ve p62 hücrede birikmektedir. Bu nedenle bozulmuş otofaji sistemiyle biriken p62 ve fosfo tau'nun 26S proteozomları inhibe ettiği, bu nedenle birikimi daha da artan ve kesilen tau'nunda proteozom inhibisyonunu daha fazla tetiklediği öne sürülmektedir (Chesser ve ark, 2013; Zhang ve ark, 2017). Tau fosforilasyonunun onun otofaji veya proteozomlarda yıkımını engelleyebileceği belirlenmiştir. Örneğin Ser262/356 fosforilasyonları, tau'nun CHIP-HSP90

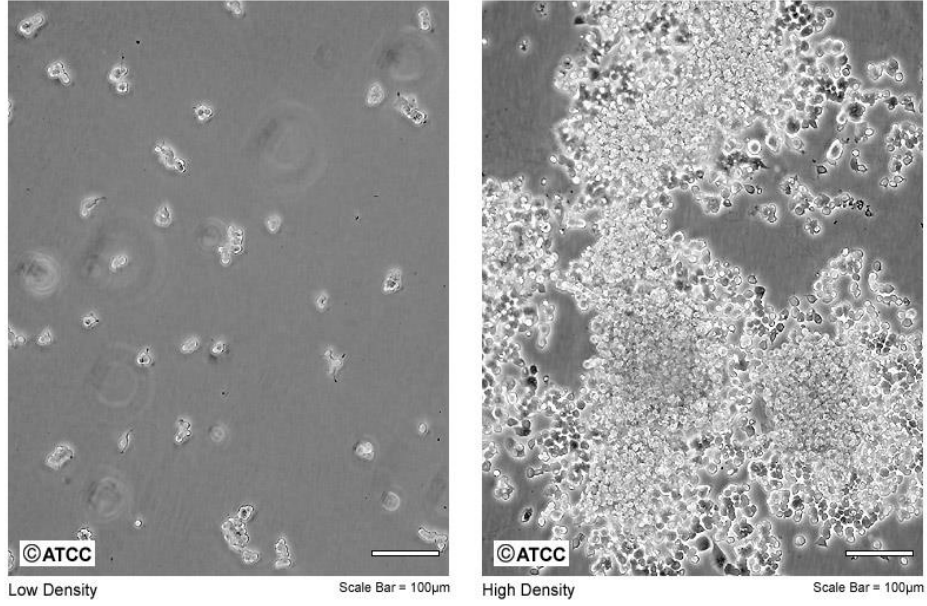
kompleksince tanınmasını engelleyerek proteozomlarda yıkılımını engellemektedir (Wang ve Mandelkow 2016).

2.10 FEOKROMASİTOMA-12 HÜCRE HATTI

NH patogenezinin incelenmesi, ilaç denemelerinin yapılabilmesi için çeşitli in vitro, in vitro ve ex vivo modeller bulunmaktadır. Örneğin AH ve taupatilerde birincil hipokampal veya kortikal nöronal kültür kurulabileceği gibi, köken olarak MSS ve PSS ile benzeyen, nörona özgü gen anlatımı veya endokrin profile sahip olan; PC12, HEK293, SH-SY5Y veya SK-N-AS gibi hücre hatları kullanılabilir. İn vivo modeller olarak ise *C.elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* ve *Rattus norvegicus* gibi model organizmalar tercih edilmektedir. Ex vivo tekniklerle istenilen NH'ye özgü modeller oluşturulabilmektedir (Rine, 2014; Schlachetzki ve ark, 2013; Westerink ve Ewing 2008).

PC12, eril *Rattus norvegicus* (sıçan) böbreküstü bezindeki kromafin hücrelerinden türetilen nöroendokrin tümör olan feokromasitomadan elde edilmiş, küçük ve düzensiz şekilli hücre hattıdır. (Şekil 2.31). Hücre popülasyonunun iki katına çıkma süresi 48 saattir. PC12 hücreleri 38+XY (40) kromozom taşımaktadır. NGFR ile beyin veya sempatik nöronlarda da sentez edilen Tyr türevli katekolamin sınıfından dopamin ve nöroepinefrin'i sentezlemekte, ancak epinefrini sentezlememektedir. Bunların dışında nikotinik Ach reseptörü, AChE, gama-aminbutirik asit (GABA) ve tirozin hidroksilaz sentezlemektedir. Androjen veya NGF uygulanması durumunda PC12 hücreleri farklılaşarak sempatik nöronlara benzer şekilde; çoğalmanın durması, nörit gelişimi, nörotransmitter salınması ve elektriksel aktivitenin artması özelliklerine sahip olmaktadır. Tropomiyozin reseptör kinaz A (TrkA), β 1 integrin, androjen reseptörü (AR), filamin A ve PI3K- δ kompleksi aracılığıyla tetiklenen Rac GTaz aktivasyonu sonucunda aktin filamentler ilişkili nöritogenesizi sağladığı gösterilmiştir. PC12'nin yüksek veya düşük oranda farklılaşmış ya da farklılaşmamış çeşitleri bulunmaktadır (ATCC 2016; Donato ve ark, 2015; W.-L. Wang ve ark, 2015; Westerink ve Ewing 2008).

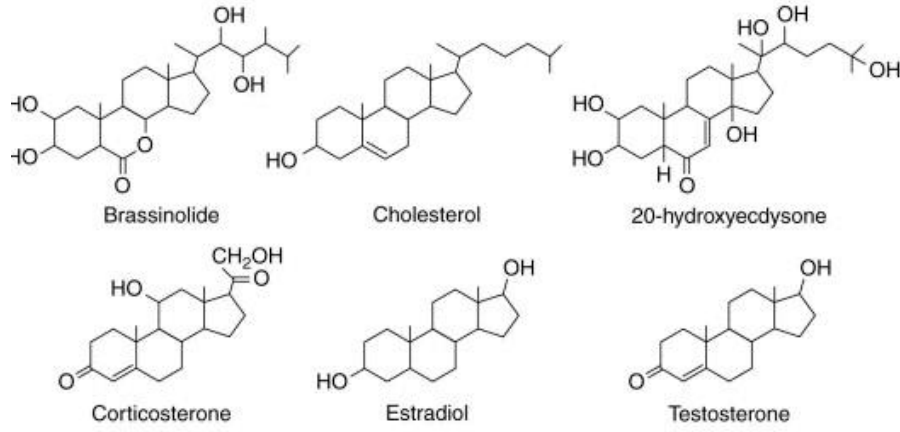
ATCC Number: **CRL-1721**
Designation: **PC-12**



Şekil 2.31 PC12 hücrelerinin az yoğun ve çok yoğun olduğu durumlardaki morfolojileri (ATCC, 2016).

2.11 STEROİD TÜREVLERİ VE BRASSİNOSTEROİDLER

BR'ler polihidroksile olmuş steroid türevli fitohormonlardır. Hücre uzaması ve bölünmesi, kök büyümesi ve yer çekimine karşı cevabı, fotomorfogenez, stomatal ve vasküler farklılaşma, tohum çimlenmesi, üreme, bağışıklık, oksidasyon ürünlerinin eliminasyonu, etilen sentezi, biyotik veya abiyotik stres cevabı gibi pek çok olayda önemli rol oynamaktadırlar (Tang ve ark, 2016). Şekil 2.32'de gösterildiği gibi BR'ler yapısal olarak hayvanlardaki kolesterolden türelenen; aldesteron, kortikosteron, kortizol, 20-hidroksiekdizon, estradiyol gibi östrojen çeşitleri, androjen (testesteron) ve progesteron gibi steroid hormonlara benzemektedir (Becraft, 2001). Ayrıca D vitamini olarak da bilinen kalsitriyol ve A vitamini türevi retinoik asit de steroid yapıdadır. BR'ler A, B, C ve D olarak dört steroid halka taşımaktadır. Steroid halkalardan dallanan veya steoid halka yapısında olmayan bölgedeki karbon (C) iskeletinden dallanan bazı gruplardaki değişiklikler, BR'lerin çeşitliliğini sağlamaktadır. BR ler Cyt P450 ailesinden bir enzim tarafından genellikle ER'de sentezlenmektedir (Tang ve ark, 2016).



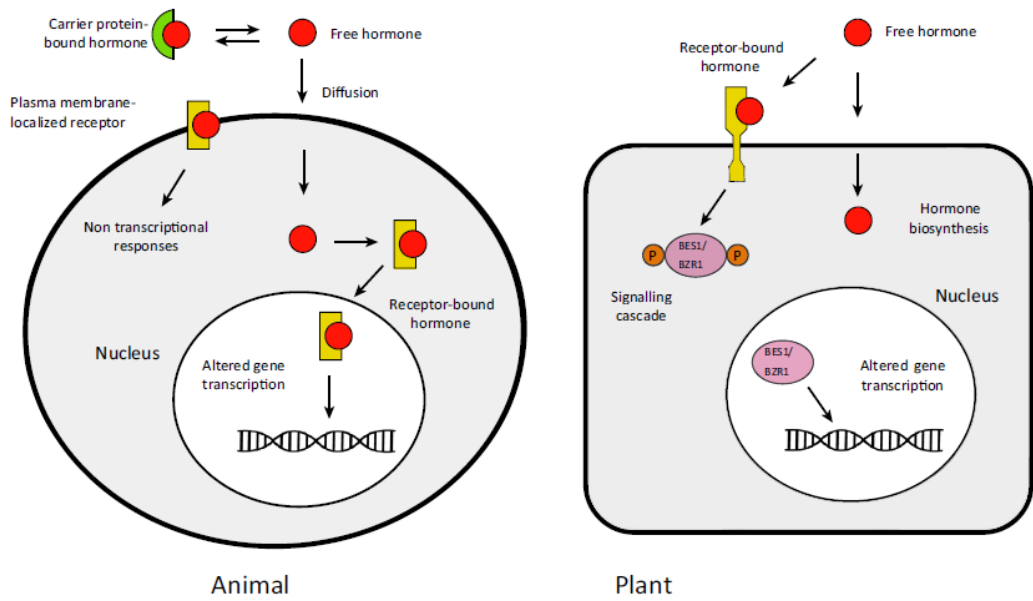
Şekil 2.32.Hayvansal steroidler ve BR'lerin moleküler yapısı (Becraft, 2001).

2.11.1 Bitkisel ve Hayvansal Steroidlerin Sinyal Mekanizması

Steroid hormonların bitki ve hayvan hücrelerindeki farklı moleküler etkileşimleri Şekil 2.33'de gösterilmiştir. Hayvan dolaşım sisteminde steroid hormonlar taşıyıcı proteinlere bağlı şekilde bulunmaktadır. Taşıyıcı proteinlerden ayrılan steroid hormonlar hidrofobik yapıları gereği genellikle plazma membranından çözünerek geçmekte veya plazma membranındaki bazı reseptörlerle etkileşmektedirler. Plazma membranından difüze olan steroid hormonlar sitosol veya nükleusta kendine has yapıdaki steroid hormon reseptör (SR)'lerine bağlanmaktadır. SR'ler normal şartlar altında HSP kompleksleri tarafından tutularak inhibe edilen Tf'lerdir. Steroid hormonların bağlanmasıyla HSP'lerden ayrılır ve dimerizasyonla aktive olurlar. Ardından eş-aktivatörleri veya eş-inhibitörleri ile birlikte hedef genlerini aktive ya da inhibe etmektedir. Ayrıca plazma membranında bulunan bazı özel reseptörler aracılığı ile de genellikle transkripsiyonel olmayan hızlı cevapların verilmesini teşvik etmektedirler (Boonyaratanakornkit ve Edwards, 2007).

Bitkilerde, BR'ler gibi steroid hormonlar plazma membranındaki BR duyarlı 1 (BRI1) reseptörüne bağlanmaktadır. BRI1 sitosolik bölgesinde hem Ser/Thr, hem de Tyr kinaz özelliği taşımaktadır. BR'nin, BRI1'e bağlanması ile eş reseptörü BRI1 ilişkili reseptör kinaz 1 (BAK1) heterodimerizasyon gerçekleştirerek aktive olmaktadır. Sonuçta çeşitli fosforilasyon ve defosforilasyonları içeren bir sinyal mekanizması tetiklenmektedir. PKC inhibitör protein-1 (14-3-3), hayvanlarda ve bitkilerde yüksek oranda korunmuş olan bir fosfoserin bağlanma proteini ailesidir. BR varlığında ilk olarak BRI1 'e bağlı durumdaki BRI1-kinaz inhibitör 1 (BKII1)'in fosforile olarak. 14-3-3 tarafından tutulup inhibe edilmesi sağlanır. Bu sayede

BRI1'in aktivasyonu artırılarak BR sinyalizasyon kinaz 1 (BSK1) ve temel diferansiyel büyüme 1 (CDG1) kinazlarının fosforilasyon aracılı aktivasyonları tetiklenmektedir. Aktive olan BSK1 ve CDG1 aracılığıyla BRI1-baskılayıcı 1 (BSU1) fosfatazın fosforile edilerek aktivasyonu sağlanmaktadır. BSU1 ve PP2A'nın aktivasyonu GSK3 benzeri kinaz olarak adlandırılan BR duyarlı 2 (BIN2) kinazın fosforile gruplarının uzaklaştırılarak inaktivasyonu sağlanmaktadır. BR sinyali yokluğunda BIN2 fosforilasyonu ve 14-3-3 tutulumu aracılığı ile inaktive edilen brassinazol-direnç 1 (BZR1) ile BR duyarlı etil metansülfonat (EMS) baskılayıcı 1 (BES1) Tf'leri, BR varlığında defosforile edilerek nukleusa göçmeleri ve hedef genlerini aktive etmeleri sağlanmaktadır (GeneCards, 2017; Tang ve ark, 2016; Vukašinovic ve Russinova, 2018).

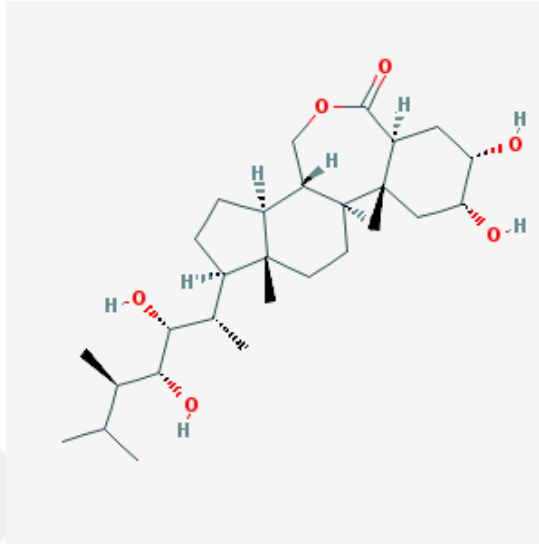


Şekil 2. 33 Steroid hormonların hayvan ve bitki hücrelerindeki farklı moleküler etkileşimleri (Vukašinovic ve Russinova, 2018).

2.11.2 Epibrassinolid

BR ailesine ait olan 24-Epibrassinolid veya EBR; kapalı formülü $C_{28}H_{48}O_6$, moleküler ağırlığı 480,345 g/mol olan bir steroid hormondur. 4 adet verici, 6 adet ise alıcı H bağına, 5 adet rotasyon yapabilen bağa, 1 adet kovalent bağlı birime, belirlenmiş 8 adet stereo merkeze, tanımlanmamış 5 adet stereo merkeze sahiptir (Şekil 2.34). EBR; dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil formamid (DMF) ve etanol (ETOH) gibi organik solüsyonlarda çözünmektedir (Kim ve ark, 2016). EBR'nin

Lycopersicon esculentum (domates) ve *Brassica juncea* L (Hindistan hardalı) bitkilerinde katalaz (CAT), SOD ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimatik antioksidan aktivitelerini arttırdığı, ayrıca *Oryza sativa* L (pirinç) ve *Brassica juncea* L bitkilerinde lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Carange ve ark, 2011).



Şekil 2. 34 24-Epibrassinolid'in moleküler yapısı (Kim ve ark, 2016).

2.11.2.1 Epibrassinolid'in Apoptotik Etkisi

Malikova ve ark.'nın (2008) yaptığı çalışmada EBR'nin östrojen reseptörü (ÖR) bulunan (ÖR+) insan meme adenokarsinoma hücre hattı MCF7'de apoptotik etkinliği gösterilmiştir (Malíková ve ark, 2008). Ayrıca, Kvasnica ve ark.(2014)'nin yaptığı çalışmada EBR'nin hücre kültüründe akut T-lenfosit lösemi hücre hattı CEM, MCF7 ve insan servikal adenokarsinoma hücre hattı Hela' da düşük dozlarda apoptotik etkinliği gösterilmiş, bununla birlikte sağlıklı insan fibroblast hücrelerinde bu etkinlik gözlenmemiştir (Kvasnica ve ark, 2014). Obakan ve ark (2014) yaptığı çalışmada, hücre sağkalımı ile ilgili önemli bileşenler olan poliaminlerin katabolizması ile EBR'nin apoptotik etkinliğinin ilişkisi, sırasıyla androjen reseptörü (AR) bulunan (AR+) ya da bulunmayan (AR-) insan prostat karsinoma hücre hatları LnCAP ve DU145'de gösterilmiştir (Obakan ve ark, 2014). Ayrıca Obakan ve ark (2015) yaptıkları çalışmada hücre kültüründe amino asitlerin stabil izotoplar ile işaretlenmesi (SILAC) yöntemi kullanılarak LnCAP hücrelerinde EBR ile tetiklenen ER stresi aracılı apoptozda anlatımı en anlamlı biçimde değişen proteinin ER şaperon molekülü CALR olduğu gösterilmiştir (Obakan ve ark, 2015).

Obakan-Yerlikaya ve ark. (2017) yaptıkları SILAC çalışmasından yola çıkarak, steroid hormon bağımsız gelişen insan kolorektal adenokarsinoma hücre hatları HT29, DLD-1 ve SW480 ile kolorektal karsinoma hücre hattı HCT166'da EBR ile tetiklenen ER stresi aracılı apoptozda CALR'ün anahtar rolü oynadığı gösterilmişlerdir (Obakan-Yerlikaya ve ark, 2017). Ayrıca İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi laboratuvarlarında yapılan Tübitak 2209 projesi kapsamında HEK293 ve fare embriyonik fibroblast hücresi (MEF) gibi sağlıklı dokuyu temsil eden hücre hatlarında EBR'nin düşük dozlarda toksik etkisi gözlenmemiştir. Özbek (2016) yüksek lisans tez çalışması kapsamında EBR'nin p53 doğal tip HCT116, p53 DNA bağlanma bölgesi mutant HT29 ve mutant p53 taşıyan HT29 hücrelerine doğal tip p53 anlatımı kazandırılmasıyla elde edilen HT29'larda p53 bağımlı veya bağımsız şekilde apoptozu tetiklediği göstermiştir. Ayrıca laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda EBR uygulamasının otofaji veya apoptoz ile sonuçlanmasının karar mekanizması SW480 ve DLD1 hücrelerinde gösterilmeye çalışılmıştır.

2.11.3 Steroid Türevlerinin Nörokoruyucu Etkisi

Yao ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada 22R-OHC'nin, PC12 ve nöron benzeri farklılaşmış insan Ntera/D1 teratokarsinoma (NT2N) hücrelerinde A β teşvikli hücre ölümüne karşı koruyucu rolü olduğu gösterilmişlerdir (Yao ve ark, 2002). Karaciğer-X-reseptör (LXR)'leri oksisteroller tarafından aktive edilen SR'lerdir. Koldamova ve ark (2003) ise yaptıkları çalışmada, 22R-OHC ile 9-cis-retinoik asid tarafından aktive edilen LXR ve retinoik X-reseptörü (RXR)'nün ATP- bağlanma kaseti taşıyıcısı A1 (ABCA1)'in anlatımını düzenleyerek glial hücreler ile karıştırılmış primer hipokampal kültür hücrelerinde kolesterol taşınımını tetikleyerek A β üretimini azalttığı gösterilmiştir (Koldamova ve ark, 2003). L. Lecanu ve ark. (2005), benzer bir çalışmada PC12 hücrelerinde A β toksisitesinin 22R-OHC ve ondan türetilmiş spirostanoller tarafından engellendiği göstermişlerdir. Ayrıca bilgisayar modellemesi ile 22R-OHC'nin A β ' ya iki olası bölgeden bağlanarak toksisiteyi azaltabileceği öngörülmüştür (Koldamova ve ark, 2005).

Zhang (2004) yaptığı çalışmada steroid yapıda olan östrojen çeşidi 17- β -estradiyol, testosteron ve metil-testesteron'un SR'ler aracılı HSP70 anlatımını arttırarak insan primer nöronal hücre kültüründe A β teşvikli toksisiteyi engelledikleri göstermiştir

(Zhang, 2004). Prasanthi ve ark. (2009) tarafından 24-OHC ve 27-OHC'nin SH-SY5Y hücrelerinde A β toksisitesine karşı farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. 24-OHC ile 27-OHC'nin LXR'ler aracılığı ile A β miktarını ve degradasyonunu kontrol edebileceği öngörülmüştür. 24-OHC'nin ABCA1 anlatımını arttırarak APP'nin amiloidik olmayan yolla işlenimini, 27-OHC'nin ise amiloidik yolla işlenimini tetiklediği belirlenmiştir (Prasanthi ve ark, 2009). Papadopoulos ve Lecanu (2012) yaptıkları derleme çalışmasında *Gynura japonica* bitkisinden izole edilen 22R-OHC stabil analogu (22R,25R)-20 α -spirost-5-en-3 β -yl heksanoat (Kaprospinol) ve türevlerinin A β toksisitesine karşı koruyucu etkisinin olası moleküler mekanizmalarını açıklamışlardır. Buna göre kaprospinol A β ₄₂ monomerlerine bağlanarak; onların nöronlara ya da mitokondriye girişini veya oligomerizasyonlarına ket vurarak amiloid plaklarını ya da yüksek nörotoksik amiloid-türevli difüze olabilen ligandlar (ADDLs)'yi oluşturmasını engelleyebilir. Bunun yanında *in vivo* çalışmalarda amiloid plakları ortadan kaldırması etkisi gösterilmiştir. Ayrıca A β ₄₂ peptidlerini mitokondriden çıkarabilir veya A β 'ya bağlanmasından bağımsız olarak mitokondriyal ETS'yi koruyabilir ya da kaybedilen fonksiyonlarını geri kazandırabilir (Papadopoulos ve Lecanu, 2012).

2.11.3.1 Epibrassinolid'in Olası Nörokoruyucu Etkisi

Carange ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, EBR'nin ETS kompleks 1 inhibitörü 11-metil-4-fenilpiridinyum (MPP⁺) ile PH modeli oluşturulmuş NGF uygulamasıyla farklılaştırılmış PC12 hücrelerinde CAT, SOD ve GPx'i düzenleyerek antioksidant yapısı sayesinde nöral ölümü azalttığı gösterilmiştir (Carange ve ark, 2011). Benzer şekilde Ismaili ve ark. (2012) nın yaptığı çalışmada 2 doğal BR ve 5 sentetik analogun MPP⁺ ile PH modeli oluşturulmuş NGF uygulamasıyla farklılaştırılmış PC12 hücrelerinde nörokoruyucu etkisi gösterilmiş, ayrıca steroid B halkasının ve yan zincirin nörokoruyucu aktivitede önemli olduğu belirtilmiştir (Ismaili ve ark, 2012; Papadopoulos ve Lecanu, 2012).

İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi grubu laboratuvarında gerçekleştirilen TÜBİTAK 3001 projesi kapsamında doğal tip ve p53 nakavt HCT116 hücrelerinde 30 mikromolar (μ M) EBR'nin; 24 ve 48 saat uygulanmasının GSK3 β S9 fosforilasyonunu kontrol grubuna göre azaltarak hücre sağkalımına ket vurduğu, 72

saat uygulanmasının ise kontrol grubuna göre GSK3 β S9 fosforilasyonunu önemli şekilde arttırarak hücre sağkalımını tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca Shafag Nahmadova (2016) yüksek lisans tez çalışması kapsamında AH modeli SK-N-AS hücrelerinde 1 μ M ve 10 μ M EBR uygulamalarının GSK3 β S9 fosforilasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle EBR'nin potansiyel bir GSK3 β inhibitörü olabileceği ve bu nedenle de AH ve taupatilerde t rap tik olarak kullanımının söz konusu olabileceği düşünülmüştür.

Caenorhabditis elegans (C.elegans), nematodlar şubesine ait hermafrodit veya erkek eşeme sahip mikroskobik organizmalardır. Sinir ağları oldukça basittir ve şeffaf olmaları nedeniyle floresan mikroskobisi boyamalarında rahatlıkla izlenebilmektedirler. BLAST analizi sonuçlarına göre tau fosforilasyon bölgelerinin insan ile yüksek homoloji gösterdiği belirlenen *C.elegans*'ların AH gibi nörodejeneratif hastalıkların *in vivo* çalışılmasına avantaj sağlayacak mutant suşları genetik mühendisliği yöntemleriyle elde edilmiştir. *İn vitro* AH hastalık modellerinde olduğu gibi *in vivo* hastalık modellerinde de Tau kinaz inhibitörlerinin çalışılmasında düşük seviyeli tau fosforilasyon düzeyleri bir sorun teşkil etmektedir. Ancak bu sorunlar plazmid aktarımı veya tau hiperfosforilasyonunu tetikleyecek mutasyon çalışmaları ile çözülebilmektedir. Bu nedenle *C.elegans*'lar tau kinaz inhibitörlerinde çalışılmasında önemli bir potansiyele sahiplerdir.

İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi grubu laboratuvarında *in vitro* olarak gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde oluşturulan EBR'nin potansiyel bir GSK3 β inhibitörü olabileceği hipotezi *C.elegans* model organizmasıyla *in vivo* olarak gösterilmek istenmiştir. Bu bağlamda gerçekleştirilen European Cooperation in Science & Technology (COST) aksiyonu kapsamında AH modeli, GSK3 işlevsel olmayan ve sağlıklı *C.elegans* suşlarında, bir diğer potansiyel GSK3 β inhibitörü olan LiCl ve potansiyel CDK5 inhibitörü ROSC ile karşılaştırmalı olarak EBR'nin etkinliği incelenmiştir. Özellikle A β ₄₂ toksisitesi gözlenen CL2120 AH modeli *C.elegans* suşunda, kontrol suşuna göre EBR'nin LiCl ve ROSC'e göre daha az toksik geldiği, sağkalımı LiCl ve ROSC'e göre anlamlı biçimde arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada EBR'nin potansiyel bir GSK3 β inhibitörü olarak kullanımını desteklemiştir.

În vitro ve *in vivo* ön çalışmalar neticesinde laboratuvarlarımızda taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış HEK293, SH-SY5Y ve PC12 hücrelerinde EBR'nin nörokoruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu yüksek lisans tezi çalışmasında taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin nörokoruyucu etkisinin hücre sağkalımı, ER stres ve hücrenel geri dönüşüm mekanizmaları ile ilişkili olarak araştırılması amaçlanmıştır.



3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERYALLER

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar, hücre kültürü donanımları, kimyasallar, antikorlar ve kitler Bölüm 7, Ekler kısmında belirtilmiştir.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 pRK5-EGFP-Tau Plazmidi Eldesi

pRK5-EGFP-Tau ekspresyon vektörü (Şekil 3.1) ile transfekte edilmiş *E.coli* bakterileri ampisilin içeren Luria Bertani (LB) besiyerine ekilmiştir ve 37 santigrat derece (°C)' de 16 saat boyunca sallayıcıda büyütülmüştür. Ardından sallayıcıdan alınan bakteri süspansiyonlarının optik yoğunluk ₂₆₀ (OD₂₆₀) değerleri ölçülmüş ve uygun bulunanlardan plazmid izolasyonu Zymo Pure Plazmid Miniprep kiti protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmid süspansiyonlarının konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ardından plazmid süspansiyonları -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3 Doza Bağılı Hücre Canlılık Testi

İlk deney düzeneğinde PC12 hücrelerinin 96 kuyucuklu hücre petrisine 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen hücrelere 1 gece sonra 0-30 μ M EBR uygulaması yapılmıştır. Bir diğer deney düzeneğinde ise 96'lık hücre petrisine 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilen PC12 hücrelerinin bir kısmına ekimden bir gece sonra 0-1 μ g pRK5-EGFP-Tau plazmidinin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra her transfeksiyon gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmeyen PC12 hücrelerine 0 μ M, 1 μ M ve 10 μ M olmak üzere EBR uygulaması gerçekleştirilmiştir. Her iki deney düzeneğinde de EBR uygulanmasından 24 saat sonra her kuyuya 10 μ l 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) tuzu uygulanmıştır ve ardından 4 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte hücredeki oksidatif metabolizmanın miktarıyla doğru orantılı olarak MTT tuzunun formazan kristalleri şeklinde metabolize edilmesi beklenmiştir. MTT tuzu uygulamasından 4 saat sonra hücreler üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmış ve ardından 100 μ l DMSO uygulaması ile oluşan formazan kristallerinin çözülmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. 96'lık hücre petrisi 10 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra Bio Rad Elisa Reader' da DMSO'da çözünen formazan kristallerinin 570-655 nm dalga boyu altındaki absorbanlarına bağlı olarak yayımlanmaları ölçülmüştür.

3.2.4 Hücre Sağkalımının Tripan Mavisi Boyaması Sonrası Gösterilmesi

PC12 hücrelerinin 6'lık hücre petrilere 25.000/kuyu olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak (24-72 saat) farklı kondüsyonlar ile muamele edilmiş (kontrol grubu, 10 μ M EBR, 10 μ M LiCl, pRK5-EGFP5-Tau plazmid, pRK5-EGFP-Tau plazmid + 10 μ M EBR veya 10 μ M LiCl), daha sonra tripsin/EDTA ile kaldırılmış ve 2000 dakikadaki dönüm sayısı (rpm) de 5 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri 1:1 oranda karıştırılmış RPMI besiyeri ve % 10 luk tripan mavisi ile çözülmüştür, ardından Neubauer lamında sayımları gerçekleştirilmiştir. Tripan mavisi yalnızca ölü hücrelerin membranlarından geçebildiği için canlı hücrelerin ayırımları gözle ışık mikroskobu altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Hücre Akış Sitometresi

PC12 hücrelerinin 75.000 hücre / kuyu olacak şekilde 6'lık hücre petrisine ekimi gerçekleştirilmiştir. Farklı kondüsyonlar ile muamele edilen (kontrol grubu; 1, 10 veya 20 μ M EBR; pRK5-EGFP-Tau plazmidi; pRK5-EGFP-Tau plazmidi + 1, 10 veya 20 μ M EBR) tüm hücre grupları EBR uygulamasından 24 saat sonraya denk gelen zaman diliminde tripsin/EDTA ile kaldırılmıştır ve 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre akış sitometresi kullanılan boyalara göre farklı amaçlarla kullanılmıştır.

3.2.5.1 Propidyum İyodür Boyama ile Hücre Devri Analizi

PI boyası DNA'ya bağlanmaktadır ancak canlı hücrelerin membranlarından geçememektedir. Fiksasyon işlemi gerçekleştirilen hücrelerin membranından nüfuz eden PI boyası PC12 hücre popülasyonunun farklı kondüsyonlarda hücre devri fazlarındaki dağılımını DNA içeriğine göre analiz etmek için kullanılmaktadır. Bu nedenle elde edilen hücre pelletleri 1X PBS ile yıkandıktan sonra 500 μ l % 70' lik ETOH ile muamele edilmiş ve -20 °C' de en az 1 hafta fiksasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Fiksasyon işlemi sonrasında hücreler 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiş ve etanol uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre pelletleri 1X fosfat-tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmış ve 2000 rpm' de 5 dakika santrifüjle PBS uzaklaştırılmıştır. Her bir örneğe ait pellet 245 μ l BD Pharmingen™ kiti Bağlanma Solüsyonunda çözülmüştür. Ardından 2,5 μ l RNaz (10 mg/ml) ve 2,5 μ l PI boyası (10 μ g/ml) ilave edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından BD Accuri™ C6 akış sitometresi cihazında FL-2 filtresi (585/40 nm) kullanılarak her bir örneğe ait 10.000 hücrenin analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2 Anneksin-V/Propidyum İyodür Boyama ile Hücre Ölümü Analizi

Bu yöntemin temeli apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücrelerin farklı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip olmasıdır. Normal şartlarda plazma membranının sitoplazmik yarısında konumlanan fosfatidilserinler apoptotik hücrelerde flip-flop hareketi sayesinde membranın ekstrasellüler yüzeyine geçmektedir. Anneksin-V boyası bu fosfatidilserinlere bağlanarak apoptotik morfolojinin tayininde rol oynar. PI boyası ise henüz membran elektrik dengesi bozulmamış erken apoptotik hücreler ve sağlıklı hücreleri boyamamakta olup spesifik morfolojisi gereği membranlarında por oluşan nekrotik hücrelerin ve membran potansiyeli bozulmuş geç apoptotik

hücreleri boyamaktadır. Bu iki boyanın farklı hücre gruplarını boyamasına bağlı olarak apoptotik ve nekrotik hücre grupları ile sağlıklı hücrelerin popülasyondaki dağılımını akış sitometresinde analiz edilmektedir. Bu nedenle 1X PBS ile yıkaması gerçekleştirilen hücre pelletleri 245 µl BD Pharmingen™ kiti Bağlanma Solüsyonunda Bağlanma Solüsyonu içerisinde çözüldükten sonra 2,5 µl (50 µg/ml) Aneksin-V (535/617 nm) ve PI (485/535 nm) boyaları ilave edilmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen her bir örneğe ait 10.000 hücrenin analizi BD Accuri™ C6 akış sitometresi cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.3 Dikloro-Dihidro-Fluoreskein Diasetat (DCFH-DA) ile Reaktif Oksijen Türlerinin Tayini

Hücrel stresin bir göstergesi olan ROS'un oluşumu DCFH-DA boyama ile tespit edilmektedir. Bu nedenle PC12 hücrelerinde tau anlatımının arttırılması ve/veya EBR uygulanmasına bağlı olarak ROS seviyesinin gösterilmesi amacıyla elde edilen hücre süspansiyonuna 2 µg/ml DCFH-DA (495/529 nm) eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen her bir örneğe ait 10.000 hücrenin analizi BD Accuri™ C6 akış sitometresi cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Fluoresan Mikroskopi

PC12 hücreleri 75.000/kuyu olacak şekilde 6'lık hücre petrilere ekimleri gerçekleştirildikten bir gün sonra farklı kondüsyonlara (kontrol grubu; 1/10/20 µM EBR; pRK5-EGFP-Tau plazmidi; pRK5-EGFP-Tau plazmidi + 1 veya 10 µM EBR) maruz bırakılmıştır. Tüm farklı kondüsyonlara maruz bırakılan hücre gruplarına, EBR uygulamasından 24 saat sonrasında denk gelecek zaman diliminde farklı fluoresan boyaları uygulanmıştır.

3.2.6.1 Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Ölü Hücrelerin Gösterilmesi

PI, DNA'ya bağlanan ancak canlı hücre membranlarından nüfuz edemeyen bir boyadır. Bu özelliği sayesinde fluoresan mikroskobu altında canlı-ölü hücre ayırımlarının yapılmasında kullanılan bir boyadır ve fluoresan mikroskobunda yeşil renkli dalga boyuna ait ışığı absorbe ettiğinde kırmızı renkte ışık yayımlanmaktadır. Bu nedenle 1 ml RPMI besiyerineana stok konsantrasyonu 1 mg/ml olan PI (485/535 nm) boyasından eklendikten sonra 6'lık hücre petrisi 30 dakika etüvde karanlıkta

inkübe edilmiştir. Ardından her bir kondüsyona ait hücre grupları fluoressan mikroskobunda görüntülenmiştir.

3.2.6.2 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi

Apoptotik hücre ölümünün göstergelerinden birisi DNA'nın çeşitli endonükleazlar tarafından kesilmesidir. Bunun sonucunda DNA'da ip merdiven görüntüsü ortaya çıkmaktadır ve DAPI boyası oluşan DNA kırıklarına bağlanarak apoptotik hücrelerin fluoressan mikroskobu altında analizini sağlamaktadır. DAPI boyası fluoressan mikroskobu altında açık mavi renk dalga boyuna karşılık gelen ışığı absorbe ettiğinde mavi renkte ışık yayımlamaktadır. Bu nedenle besiyerine ana stok konsantrasyonu 5 mg/mg olan DAPI (350/470 nm) boyasından eklendikten sonra 6'lık hücre petrisi 10 dakika etüvde karanlık etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kondüsyona ait hücre grupları fluoressan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.6.3 3,3'-Diheksilokarbosiyanin İyodür (DiOC6) ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişikliklerin Gösterilmesi

İçsel yolak aracılığıyla apoptotik hücre ölümünün temel göstergesi mitokondri membran potansiyelinin bozulması ve bu şekilde membrana ait bazı bileşenlerin sitosole salınmasıdır. DiOC6 lipofilik karakter taşıyan ve düşük konsantrasyonlarında canlı hücre mitokondrilerine seçici olarak bağlanan bir boyadır. Bu özelliği nedeniyle DiOC6 boyası fluoressan mikroskobu altında canlı hücrelerin tayininde kullanılmaktadır. DiOC6 (482/504 nm) boyası fluoressan mikroskobu altında mavi renge ait dalga boyundaki ışığı absorbe ettiğinde yeşil renkte dalga boyuna sahip ışık yayımlamaktadır. Bu nedenle 1 ml RPMI besiyerine ana stok konsantrasyonu 4 mM olan DiOC6 boyasından 1 µl eklendikten sonra 6'lık hücre petrisinin 15 dakika karanlık etüvde inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir kondüsyona ait hücre grupları fluoressan mikroskobu altında incelenmiştir.

3.2.6.4 Dikoloro-Dihidro-Fluoreskein Diasetat(DCFH-DA) ile Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Gösterilmesi

Belirtilen kondüsyonlara maruz bırakılan PC12 hücrelerini bulduran 6'lık hücre petrisi 2 µg/ml DCFH-DA (495/529 nm) ile maruz bırakıldıktan sonra 15 dakika karanlık etüvde inkübe edilmiştir. Ardından 6'lık hücre petrisi fluoressan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.6.5 Mitotracker ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişikliklerin Gösterilmesi

Kapalı formülü $C_{34}H_{36}Cl_2N_2$ olan bu organik klorid tuzu, tiyol grupları ile etkileşen klorometil grupları aracılığı ile aktif mitokondrilerde birikmektedir. DiOC6 ile aynı amaçla kullanılmaktadır. Belirtilen kondüsyonlara maruz bırakılan 6'lık hücre petrisi, 1 μ M kontrasyona sahip olacak şekilde mitotracker koyu kırmızısı (579/599 nm) ilave edildikten sonra 45 dakika karanlık etüvde inkübe edilmiş ve ardından fluoressan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.6.6 Lizotracker ile Otofagolizozomların Tespiti

Kapalı formülü $C_{20}H_{24}BF_2N_5O$ olan bu boya canlı hücrelerde asidik organellerde birikmektedir. Boyanın asidik pH'da protonlanması fluoressans özelliğini arttırmaktadır. Belirtilen kondüsyonlara maruz bırakılan 6'lık hücre petrisi, 1 μ M kontrasyona sahip olacak şekilde lizotracker (577/590 nm) ilave edildikten sonra karanlık etüvde inkübe edilmiş ve ardından fluoressan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.6.7 Acridine Orange ile Otofagolizozomların Tespiti

Kapalı formülü $C_{17}H_{19}N_3$ olan ve Acridine Orange baz olarak da bilinen bu katyonik boya pH'a bağlı olarak çift iplikli DNA'ya bağlandığında yeşil, tek iplikli DNA veya RNA'ya bağlandığında ise kırmızı fluoressans ışımaya yapmaktadır. Ayrıca yüksek asidik ortamlar olan geç otofajik vakuollerde de birikerek kırmızı fluoressans ışımaya yapmaktadır. Belirtilen kondüsyonlara maruz bırakılan 6'lık petri konsantrasyonu 1 μ M olacak şekilde Acridine Orange (460/650 nm) ilave edildikten sonra karanlık etüvde inkübe edilmiştir ve ardından fluoressan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.7 İmmunoblotlama

Gen anlatımını protein seviyesinde göstermek için en sık kullanılan yöntem immünoblotlamadır. Bu çalışma kapsamında 60 santimetrekare (cm^2) lik hücre petrilere 150.000/kuyu olacak şekilde PC12 hücrelerinin ekimi gerçekleştirilmiştir. Farklı kondüsyonlara (kontrol grubu; 1/10/20 μ M EBR; pRK5-EGFP-Tau plazmidi; pRK5-EGFP-Tau plazmidi +1/10/20 μ M EBR) maruz bırakılan PC12 hücrelerinden total protein izolasyonu veya THERMO SCIENTIFIC, NE-PERTM kiti protokolüne göre nüklear-sitoplazmik protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein izolasyonu

için; kazıyıcı, 1.5 ml mikrofuj tüpü ve izotonik tuz çözeltileri olan tris-tamponlu tuz çözeltisi (TBS) ya da PBS kullanılarak petri kabındaki farklı kondüsyonlara maruz bırakılmış PC12 hücreleri kaldırılmıştır. Fosforile olmayan proteinlerin elde edilmesi için PBS, fosforile proteinlerin eldesi için ise TBS kullanılmaktadır. Ardından hücre süspansiyonları 13.200 rpm birimi hızında +4°C santrifujde çöktürülmüştür. Elde edilen hücre pelletleri; fosforile olmayan protein izolasyonu için % 10 proteaz inhibitörü içeren memeli hücresi lizis solüsyonunda, fosfo protein eldesi için proteaz inhibitörüne ek olarak fosfataz inhibitörü içeren memeli hücresi lizis solüsyonunda veya nüklear-sitoplazmik protein eldesi için THERMO SCIENTIFIC, NE-PER™ kiti solüsyonlarında homojenize edilmiştir. Homojenize olan hücre içerikleri +4°C santrifujde çöktürülmüş ve elde edilen üst fazdaki proteinlerin sıgır serum albumini (BSA) standart kabul edilerek Bradford yöntemi ile konstrantrasyonu belirlenmiştir. Her bir kondüsyona ait proteinler konsantrasyonları belirlendikten sonra içeriğinde; sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanı, gliserol, 2-merkaptoetanol, bromofenol mavisi ve pH-6,8 tris-hidroklorik asit (HCL) bulunan 5X-laemmlı solüsyonu ile karıştırılmıştır. Ardından 95°C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra hedef kDa'ya göre % 10, % 12 veya % 15 akrilamid konsantrasyonuna sahip jellere yüklenerek SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrılmışlardır. Jellerdeki kDa'larına göre ayrılan proteinler, hedef kDa'ya göre farklı sürelerde voltaj uygulanarak, farklı kalınlardaki (0,2 mm ya da 0,45 mm) poliviniliden diflorür (PVDF) membranlara kullanılarak transfer edilmiştir. Bu işlemlerde Bio-Rad firmasına ait cihazlar, sırasıyla yürütme tamponu ve transfer tamponu kullanılmıştır. Protein transfer edilen PVDF membranlar % 5 yağsız süt kullanılarak bloklanmıştır, ardından sırasıyla 1'er gece hedef proteine özgün 1:1000 oranında % 5 yağsız süt ile dilüe edilen birincil antikorlar ve *Armoracia rusticana* (bayır turpu) bitkisinden izole edilen peroksidaz (HRP) enzimi konjuge edilmiş olan birincil antikorlara özgün 1:3000 oranında % 5 yağsız süt ile dilüe edilen ikincil antikorlar ile muamele edilmiştir. Ardından birincil ve ikincil antikorların spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla tween deterjanı içeren TBS solüsyonu ile muamele edilen PVDF membranlar daha sonra TBS solüsyonu ile muamele edilerek tween deterjanından arındırılmıştır. Hedef proteine özgül antikorlar ile muamele edilen PVDF membranlar daha sonra içeriğinde; HRP'nin subsratı hidrojen peroksit (H₂O₂) ve kemilüminesans madde lumünol de bulunan bir solüsyonla muamele edilerek Bio-Rad ChemiDoc™ cihazında UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca hücre akış sitometresi PI hücre devri analizi sonuçları "Graph Pad Prism" programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür. İmmünoablota deneyi sonucu elde edilen bantlar İmage J programı kullanılarak sayısal değere dökülmüştür. MTT deneyinin en az üç tekrar ile elde edilen verilerin grafiği "GraphPad Prism" programı kullanılarak çizilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında 2 way ANOVA testi kullanılmış ve Bonferroni doğrulama yöntemiyle anlamlı değişimler için p değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

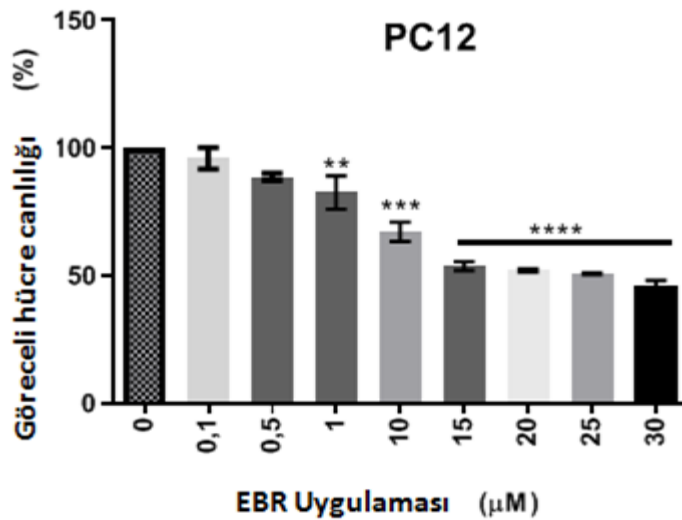


4 SONUÇLAR

4.1 EPİBRASSİNOLİD'İN DOĞAL TİP PC12 HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

4.1.1 MTT Testi ile Doğal Tip PC12 Hücrelerinde EBR'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulacak PC12 hücrelerinde nörokoruyucu etkisi gösterilmek istenen EBR'nin etkin ve toksik olmayan dozlarının seçilimi için öncelikle doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak (0-30 μ M) MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre kontrol grubu hücreleri canlılığı % 100 olarak kabul edilmiş, doza bağlı ilaç uygulanan gruptaki hücrelerin kontrol grubuna göre bağıl hücre canlılıkları hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre hücre canlılığını yaklaşık olarak % 20- % 50 arasında azaltan 1 μ M, 10 μ M ve 20 μ M EBR dozları doğal tip PC12 hücreleri üzerindeki diğer etkilerinin incelenmesi için ilk etapta seçilen dozlar olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



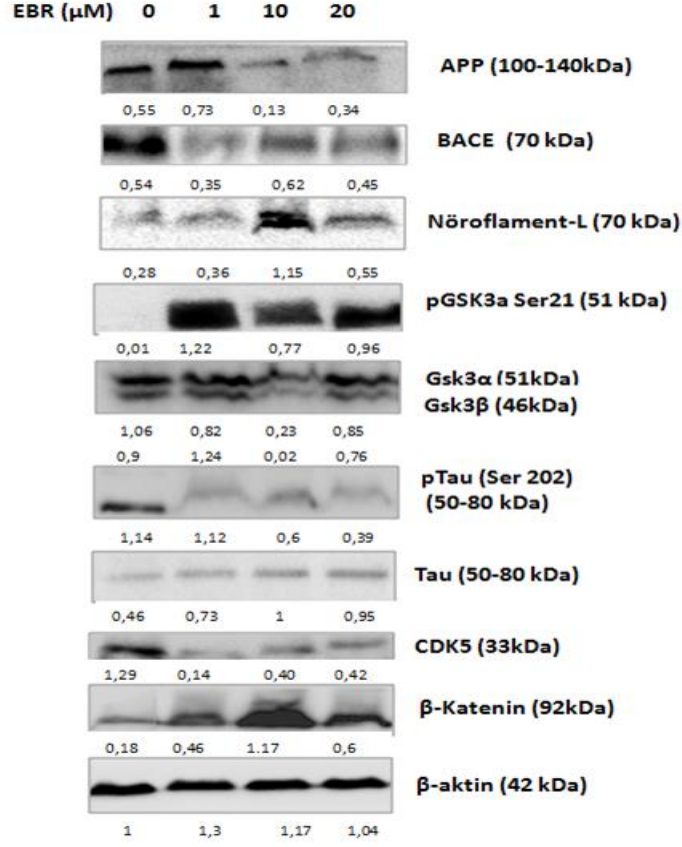
Şekil 4. 1 EBR'nin doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi. 24 saat boyunca EBR'nin 0; 0,1; 0,5; 1; 10; 15; 20 ve 30 μ M dozları uygulanması sonucunda bağıl hücre canlılığı ölçülmüştür. **p < 0,001; ***p < 0,0001; ****p < 0,00001.

4.1.2 EBR'nin Doza Bağılı Olarak Alzheimer Hastalığı ve Hücre Sağkalımı İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisinin Doğal Tip PC12 Hücrelerinde Gösterilmesi

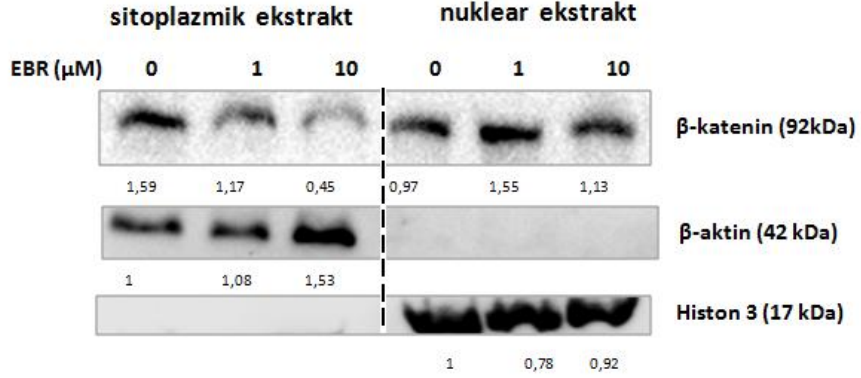
EBR'nin doza bağılı uygulandığı MTT testinde seçilen 1, 10 ve 20 μM dozlarının doğal tip PC12 hücrelerinde AH ve hücre sağkalımı ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 4.2). EBR uygulamasının doza bağılı olarak özellikle 10 ve 20 μM EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre APP anlatımını belirgin şekilde azalttığı, benzer şekilde APP'nin kesiliminden sorumlu enzimlerden olan total BACE anlatımının da 1 ve 20 μM EBR uygulanmasıyla kontrole göre azaldığı gözlenmiştir. NF-L anlatımının doza bağılı EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre arttığı ve bu artışın en belirgin olduğu dozun 10 μM olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.2 A).

Tau kinazlarından GSK3 α ve GSK3 β anlatımının 10 μM EBR uygulamasıyla kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın GSK3 α Ser21 fosforilasyonunun doza bağılı EBR uygulamasıyla kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Total tau seviyesinin EBR uygulanmasıyla doza bağılı olarak kontrol grubuna göre özellikle 10 ve 20 μM EBR uygulamasıyla arttığı, buna karşın tau Ser 202 fosforilasyonunun 10 ve 20 μM EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Tau kinazlarından CDK5 anlatımının doza bağılı EBR uygulanması ile özellikle de 1 μM EBR uygulamasında kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı gözlenmektedir (Şekil 4.2, A). GSK3 ve CK tarafından fosforile edilerek UPS' de yıkılan β -Katenin Tf'nin total anlatımının doza bağılı EBR uygulanmasıyla özellikle 10 μM ' da kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığı (Şekil 4.2, A), nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu ile de 1 μM ve özellikle 10 μM EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre nukleusa göçünün arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.2, B).

A.



B.

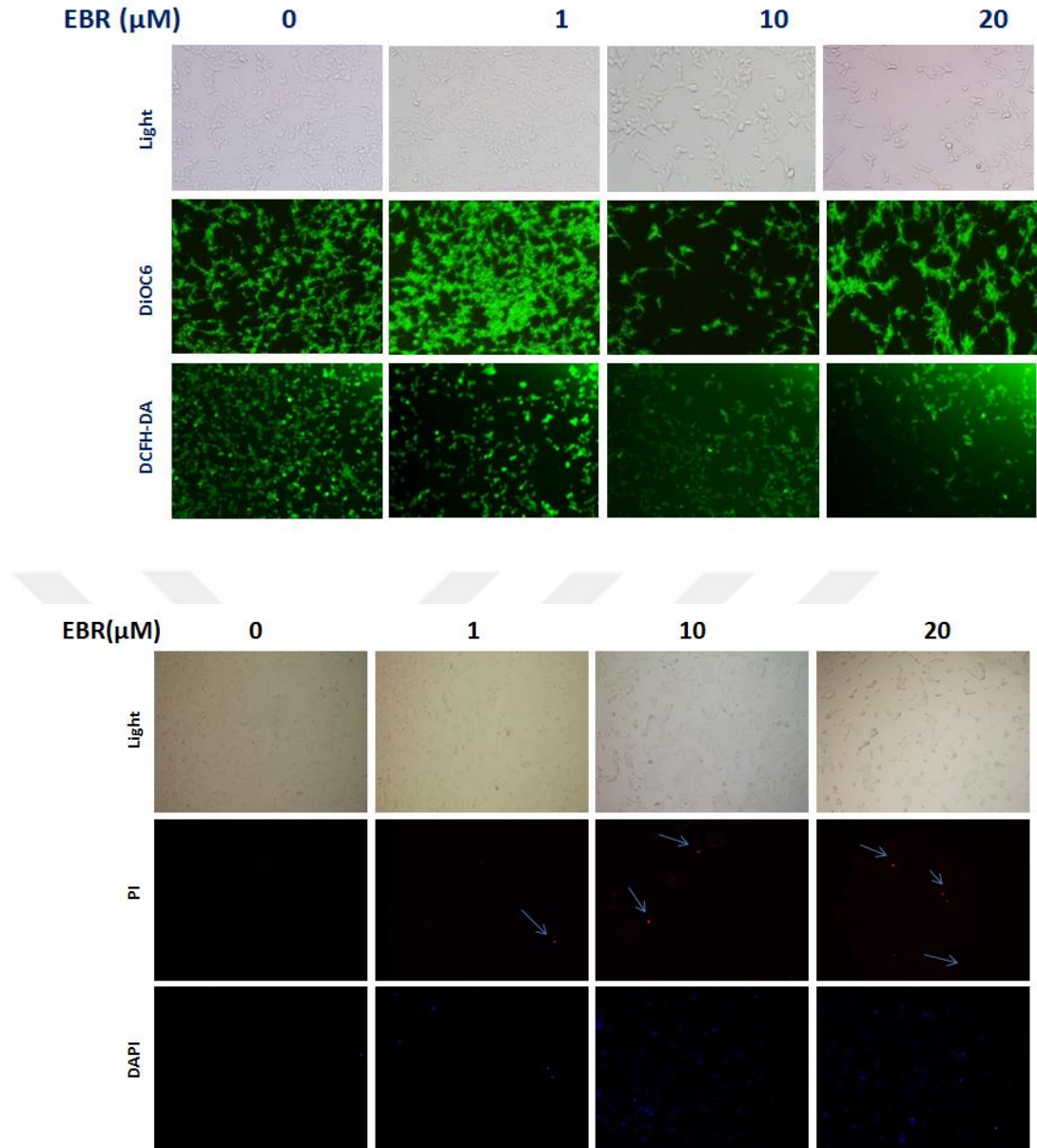


Şekil 4. 2 EBR'nin doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak AH ve hücre sağkalımı ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. EBR 'nin doza bağlı etkisi, doğal tip PC12 hücrelerinden total ve nüklear-sitoplazmik protein izolasyonu sonucu elde edilen ekstraktların SDS-PAGE ile ayrılması ve ardından uygun antikorlar ile işaretlenmesi ile gösterilmiştir. Sonuçlar en az 2 bağımsız deneyde gösterilmiş olup total ve sitoplazmik ekstraktlar için β-Aktin, nüklear ekstraktlar için ise Histon 3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

4.1.3 Doğal Tip PC12 Hücrelerinde EBR'nin Doza Bağlı Olarak Hücre Ölümü, DNA Kırıkları, Mitokondri Membran Potansiyeli ve Reaktif Oksijen Türleri Oluşumu Üzerindeki Etkisi

EBR'nin doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı MTT analizi ile seçilen 1, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının hücre ölümü, DNA kırıkları, mitokondri membran potansiyeli ve ROS/RNS üretimi üzerindeki etkisi çeşitli boyamalar ile floresan mikroskopunda gösterilmiştir. Işık mikroskobu görüntülerinde doza bağlı EBR uygulamasının, 20 μM EBR uygulaması dışında kontrol grubuna göre PC12 hücre yoğunluğu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. DiOC6 boyama ile gösterilen mitokondri membran potansiyelinin 10 ve 20 μM EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre azaldığı, bununla birlikte ROS miktarını gösteren DCFH-DA boyamasında doza bağlı EBR uygulaması ile kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil4.3).

Apoptotik ölüm ile karakterize edilen DNA kırıklarını gösteren DAPI boyamasında EBR uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını kontrol grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle 10 ve 20 μM EBR uygulamasında kontrol grubuna göre DNA kırıklarının önemli oranda arttığı gözlenmektedir. Ölü hücre membranlarından girerek DNA'ya bağlanan PI ile EBR uygulamasında doza bağlı olarak kontrol grubuna göre boyanan hücre sayısının arttığı, DAPI boyaması ile paralel olarak 10 ve 20 μM EBR uygulanmasında bu artışın fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Sonuç olarak doza bağlı EBR uygulamasının ışık mikroskobu ve floresan mikroskobu analizlerinin, MTT analizi ile paralel olduğu belirlenmiştir.

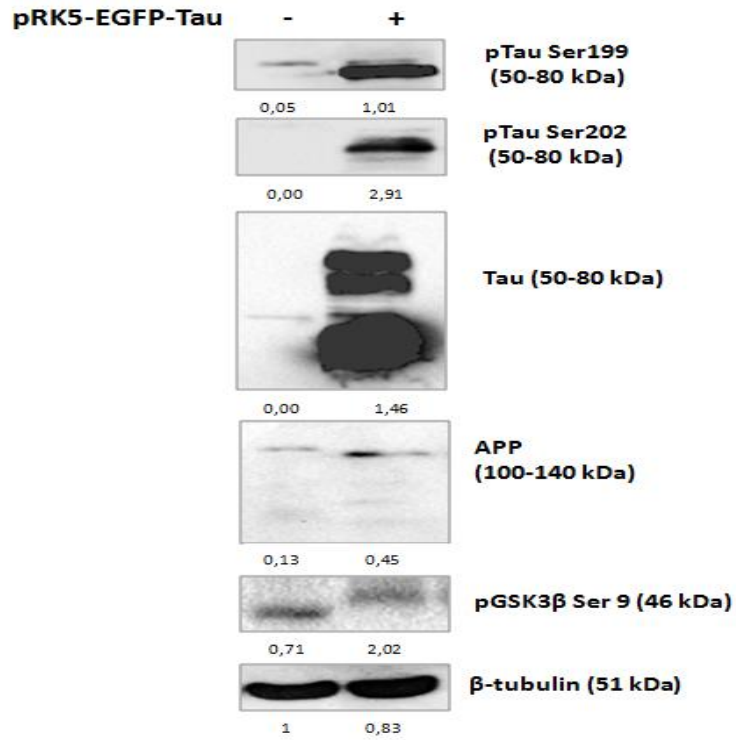


Şekil 4. 3 Doza bağlı EBR uygulamasının doğal tip PC12 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli, ROS seviyesi, DNA kırıkları ve hücre ölümüne etkilerinin floresan mikroskobu boyamaları ile gösterilmesi. 1, 10 ve 20 μM EBR'nin bu etkilerinin gösterilmesi için sırasıyla DiOC6, DCFH-DA, DAPI ve PI boyamaları yapılmıştır. Verilen sonuçlar yapılan 3 bağımsız deneyden birini temsil etmektedir.

4.2 TAUPATI MODELİ PC12 HÜCRELERİNDE EBR'NİN DOZA BAĞLI OLARAK HÜCRE SAĞKALIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

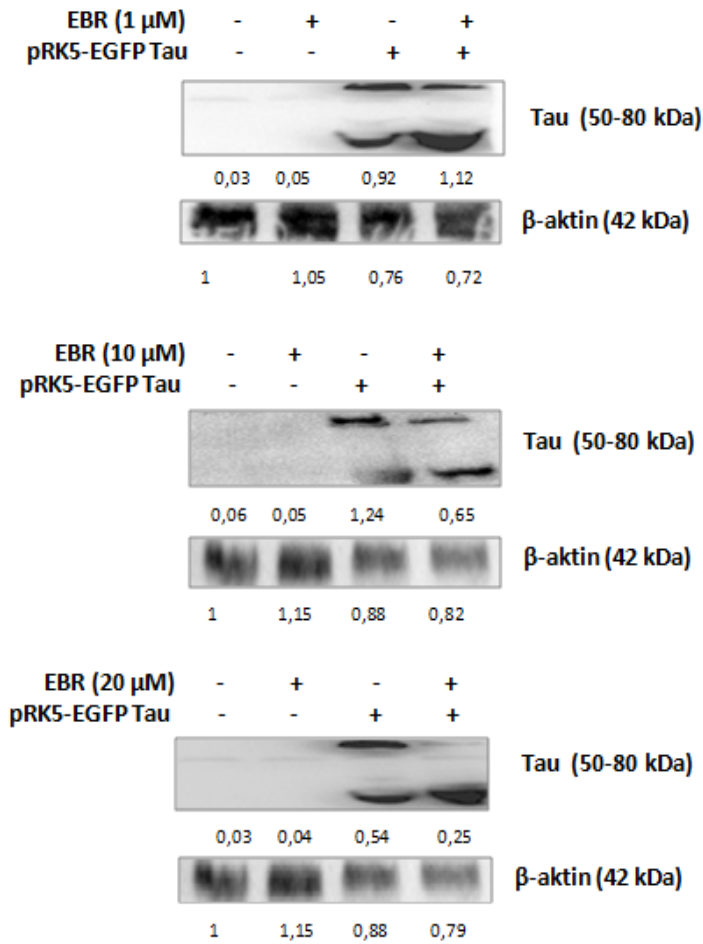
4.2.1 *In Vitro* PC12 Taupati Modelinin Oluşturulması ve EBR Uygulamasının Tau Seviyesi Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

2N4R Tau izoformunu kodlayan pRK5-EGFP-Tau ekspresyon vektörü transfekte edilen PC12 hücrelerinden uzun pasajlar sonrasında izole edilen protein ekstraktları SDS-PAGE'de ayrılmış, sonrasında immunoblotlama yöntemi ile plazmidin transfeksiyon ve taupati oluşturma başarısı test edilmiştir (Şekil 4.4). Sonuçta plazmid transfeksiyonu ile kontrole göre total tau seviyesinin ve Ser 202/199 tau fosforilasyonlarının (p-Tau) önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca plazmid transfeksiyonu ile hücrede APP anlatımı ve GSK3 β Ser 9 fosforilasyonlarının da kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 4 PC12 hücrelerine pRK5-EGFP-Tau plazmidini transfeksiyon ve taupati oluşturma başarısının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. AH ilişkili farklı antikörlerin kullanımı ile kontrol grubu PC12 hücreleri ve pRK5-EGFP-Tau plazmidini transfekte edilmiş hücreler immunoblotlama yöntemi ile kıyaslanmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. Yükleme kontrolü olarak β -tubulin kullanılmıştır.

pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edildiği immunoblotlama yöntemi ile gösterilen PC12 hücrelerine, daha önce doğal tip PC12 hücrelerinde gerçekleştirilen MTT testi ile seçilen 1, 10 ve 20 μM EBR uygulaması yapılmıştır. İlaç uygulamasından 24 saat sonra protein izolasyonları gerçekleştirilen hücrelerden elde edilen ekstraktlar SDS-PAGE ile ayrılmış ve immünoblotlama yöntemi ile tau seviyeleri gösterilmiştir (Şekil 4.5). Sonuçta pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen hücrelerde total tau seviyesinde 1 μM EBR uygulaması ile önemli bir değişiklik olmadığı, 10 ve 20 μM EBR uygulanması ile belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 5 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilmiş PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağlı olarak (1, 10 ve 20 μM) tau anlatımı ve kesilimi üzerindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 deney tekrarını temsil etmektedir. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır.

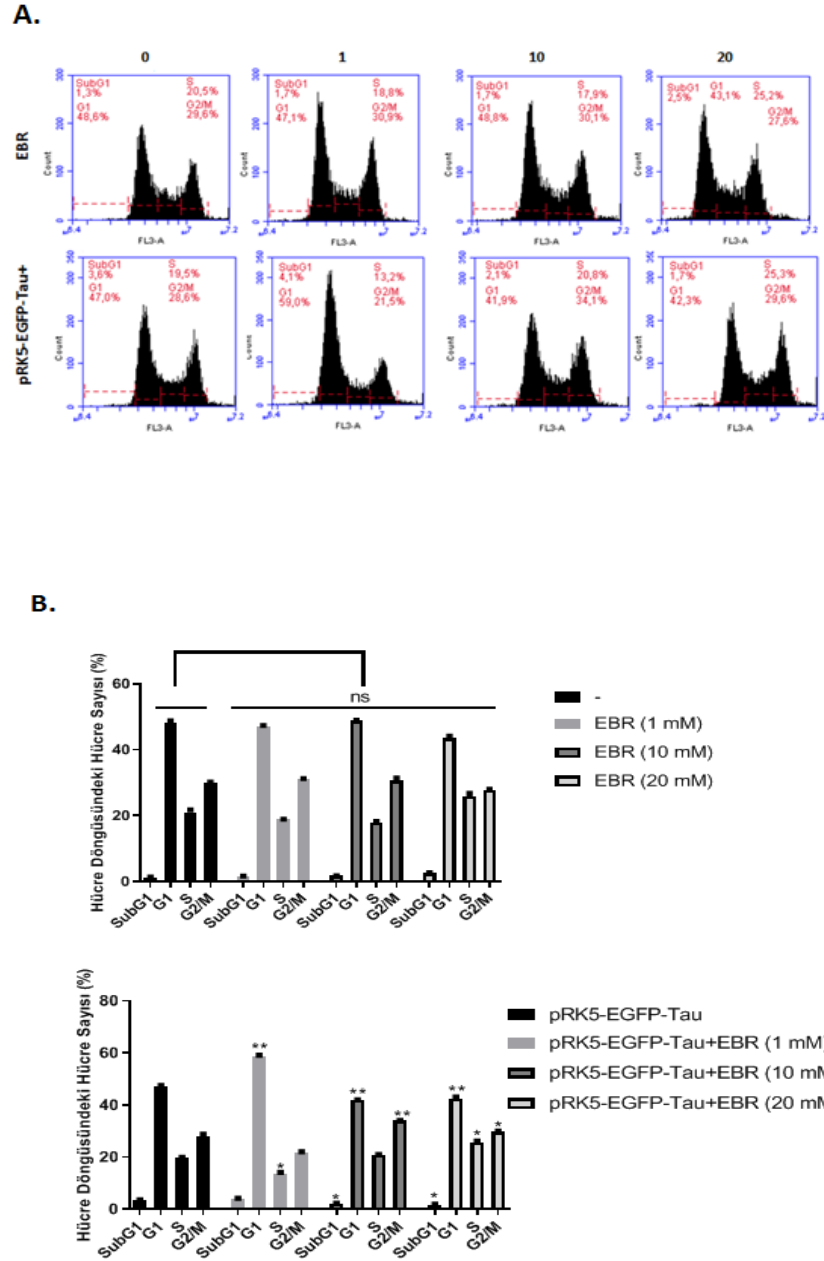
4.2.2 Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Doza Bağlı Olarak Hücre Devrine Etkisinin Gösterilmesi

pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen ve edilmeyen PC12 hücrelerine 1, 10 veya 20 μ M EBR uygulanmış, 24 saat sonra hücreler kaldırılmış ve % 70'lik ETOH ile fikse edilmişlerdir. 1 hafta sonra ETOH uzaklaştırılmış ve hücreler PI boyası ile muamele edilmiş ve ardından hücre akış sitometresinde analiz edilmiştir. Doğal tip PC12 hücrelerinde ölü hücreleri temsil eden Sub-G1 fazı popülasyonu kontrol grubunda % 1,3 iken, 1 ve 10 μ M EBR uygulanması ile % 1,7'ye, 20 μ M EBR uygulanması ile ise % 2,5'e yükselmiştir. Kontrol grubunda % 48,6 olan G1 fazı popülasyonu, 1 μ M EBR uygulanması ile % 47,1'e ve özellikle 20 μ M EBR uygulanması ile % 43,1'e gerilemiş, bununla birlikte 10 μ M EBR uygulanması ile % 48,8'e yükselmiştir.

Kontrol grubunda % 20,5 olan S fazı popülasyonu 1 μ M EBR (% 18,8) ve 10 μ M EBR (% 17,9) uygulanması ile azalmış, 20 μ M EBR (% 25,2) uygulanması ile ise önemli ölçüde artmıştır. Kontrol grubunda % 29,6 olan G2/M popülasyonu ise 1 μ M EBR uygulanması ile % 30,9'a, 10 μ M EBR uygulanması ile ise % 30,1'e yükselmiş, 20 μ M EBR uygulanması sonucu ise % 27,6'ya gerilemiştir (Şekil 4.6, A). Bununla birlikte istatistiksel analiz sonrasında EBR uygulaması ile doğal tip hücrelerde hücre devri fazlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.6, B).

pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücreleri, doğal tip PC12 kontrol grubu ile kıyaslandığında; SubG1 popülasyonu % 3,6'ya yükselmiş, bununla birlikte G1 fazı popülasyonu % 47'ye, S fazı popülasyonu % 19,5'e ve G2/M fazındaki hücre popülasyonu ise % 28,6'ya gerilemiştir. pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücrelerine doza bağlı olarak EBR uygulaması, yalnızca plazmid transfekte edilen hücreler ile kıyaslandığında; 1 μ M EBR uygulanması ile SubG1 popülasyonu % 4,1'e yükselmiş, ancak bu değişikliğin istatistiksel olarak anlamsız olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte taupati modelinde Sub G1 popülasyonu 10 μ M EBR uygulanması ile % 2,1'e, 20 μ M EBR uygulanması ile de % 1,7'ye gerilemiştir. Bu değişimlerin ise istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gösterilmiştir.

Taupati modelinde G1 fazı popülasyonu 1 μ M EBR uygulamasıyla % 59'a yükselmiş, bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte taupati modelinde 10 μ M EBR uygulaması ile G1 hücre popülasyonu % 41,9'a, 20 μ M EBR uygulanması ile ise % 42,3'e gerilemiştir ve bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Taupati modeline doza bağlı EBR uygulanması ile en anlamlı değişikliklerin G1 fazında olduğu gösterilmiştir. Taupati modelinde. 1 μ M EBR uygulanması ile S fazı popülasyonunun % 13, 2'ye gerilemesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 10 μ M EBR uygulamasıyla S fazı popülasyonu % 20,8'e yükselmiştir, ancak 20 μ M EBR uygulanması ile % 25,3'e yükselmesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Taupati modelinde. G2/M popülasyonu 1 μ M EBR uygulanması ile % 21.5'e gerilemiş, ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın taupati modelinde G2/M popülasyonunun 20 μ M EBR uygulanması ile % 29,6'ya, özellikle de 10 μ M EBR uygulanması ile % 34,1'e yükselmesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen veya edilmeyen hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak hücre devrine etkisi. 1, 10 ve 20 μ M EBR uygulanan hücreler doğal tip PC12 veya pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücreleri, fiksasyon işleminin ardından hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür (A) Daha sonra GraphPad Prism programı kullanılarak hücre akış sitometresinden elde edilen verilerin grafiği çizilmiş, grupların karşılaştırılmasında 2 way ANOVA testi kullanılmış ve Bonferroni doğrulama yöntemi kullanılarak istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir (B). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Doğal tip ve pRK-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücrelerinde doza bağlı EBR uygulaması ile ilgili gerçekleştirilen MTT testi, immunoblotlama analizleri, floresan mikroskopu ve PI hücre devri analizi sonuçlarına göre 20 μ M EBR'nin 1 ve 10 μ M EBR' uygulanmasına göre toksik etkisi gözlenmiştir. Ayrıca 1

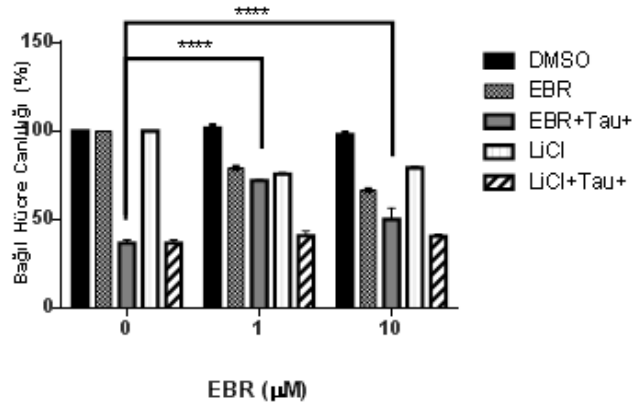
ve 10 μM EBR uygulanmasının β -Katenin Tf'nin nuklear göçünü tetiklediği, özellikle de 10 μM EBR uygulaması ile bu göçün en üst seviyede olduğu immünoblatlama ile gösterildiğinden ilerleyen deneylerde doza bağlı olarak EBR uygulamaları 1 ve 10 μM olarak yapılmıştır.

4.2.3 pRK5-EGFP-Tau Transfekte Edilmiş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Nörokoruyucu Etkisinin MTT ve Tripan Mavisi Sağkalım Analizleri ile Gösterilmesi

LiCl, potansiyel GSK3 inhibitörü olarak klinik denemeleri devam eden bir bileşendir. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi , Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi grubu laboratuvarlarında yapılan çalışmalarda EBR'nin de potansiyel bir GSK3 inhibitörü olduğu hipotezi öne sürülmüştür. Bu nedenle; PC12 hücresinde daha önce yapılan analizler ile EBR'nin toksisitesi düşük 1 ve 10 μM EBR dozlarıyla, laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen deneylerde nöral benzeri pRK5-EGFP-Tau transfekte edilmiş veya edilmemiş HEK293 ya da SH-SY5Y hücrelerinde LiCl'nin toksisitesi düşük veya hücre sağkalımını tetikleyici etkisi gözlenen 1 ve 10 μM dozlarının, pRK5-EGFP-Tau plazmidi aktarılmış ve aktarılmamış PC12 hücrelerinde hücre sağkalımına karşılaştırmalı olarak etkisi MTT testi ile gösterilmiştir. Buna göre doğal tip PC12 kontrol hücrelerindeki canlılık % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer kondüsyonlara maruz bırakılan hücrelerin bağıl hücre canlılıkları belirlenmiştir.

pRK5-EGFP-Tau transfekte edilmeyen hücrelerde 1 ve 10 μM EBR uygulamasının hücre canlılığına etkisi, daha önce EBR'nin doza bağlı (0-30 μM) uygulanması ile yapılan MTT sonuçları ile paralellik göstermiştir. Doğal tip PC12 hücrelerine 1 ve 10 μM LiCl uygulanması ile EBR'nin aynı dozlarına paralel bir hücre canlılığı oranı tespit edilmiştir. pRK5-EGFP-Tau transfeksiyonu ile hücre canlılığının, doğal tip PC12 kontrol grubuna göre büyük oranda düştüğü, taupati modeline doza bağlı EBR (1 ve 10 μM) uygulanması ile ise hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. pRK5-EGFP-Tau transfeksiyonu yapılan hücrelere LiCl (1 ve 10 μM) uygulanması ile ise hücre canlılığını EBR uygulamaları kadar etkin bir şekilde arttırmamıştır (Şekil 4.7). Sonuç olarak EBR'nin doza bağlı uygulamasının LiCl'ün doza bağlı uygulanması ile benzer toksisite gösterdiği. ancak nörokoyucu

potansiyelinin MTT deneyi açısından LiCl'e kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

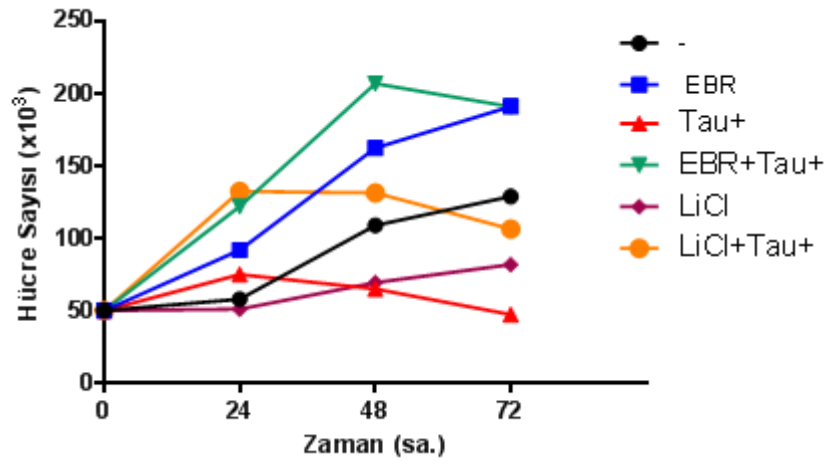


Şekil 4. 7 pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen veya edilmeyen hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin, LiCl ile karşılaştırmalı olarak MTT yöntemi ile gösterilmesi. EBR (1 ve 10 µM) ile LiCl (1 ve 10 µM) nin çözücüsü olan DMSO'nun hücre canlılığına etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen verilerin grafiği Graph Pad programı kullanılarak çizilmiş ve veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Uygulanan kondüsyonlar farklı desenler ile gösterilmiş, kondüsyonların desenleri grafiğin yanındaki rehberde belirtilmiştir. Bu grafik en az 3 bağımsız deneyin ortamasını temsil etmektedir. **** p < 0,00001.

pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen veya edilmeyen PC12 hücrelerinde 10 µM EBR'nin zamana bağlı olarak (24, 48 ve 72 saat) hücre sağkalımı üzerinde etkisi, zamana bağlı olarak (24, 48 ve 72 saat) 10 µM LiCl uygulaması ile karşılaştırılmalı olarak tripan mavisi sağkalım analizi ile gösterilmiştir. Transfekte edilmeyen hücrelerde 10 µM EBR uygulamasıyla zamana bağlı olarak hücre sağkalımını 48 saate kadar arttırdığı, sonrasında ise küçük oranda düşürdüğü, ancak genel olarak hücre sağkalımını kontrol grubu civarında tuttuğu gösterilmiştir. 10 µM LiCl'nin zaman bağlı uygulaması ile 24 saatten sonra hücre sayısının düşük oranda arttığı, ancak kontrol grubu ve yalnızca EBR uygulanan grubun gerisinde bir sağkalım verisi elde edilmesine neden olmuştur (Şekil 4.8).

pRK5-EGFP-Tau plazmidi transfekte edilen hücrelerde zamana bağlı olarak hücre sayısının ilk 24 saatte düşük oranda arttığı, ancak 48 ve 72 saatte gittikçe azaldığı gösterilmiştir. Bu hücrelere zamana bağlı olarak 10 µM EBR uygulanmasının hücre sağkalımını, yalnızca transfeksiyon yapan hücrelerin tersine 48 saate kadar büyük oranda arttırdığı, 48 saatten sonra küçük oranda düşürdüğü, ancak genel olarak hücre

sağkalımını kontrol grubu civarında tuttuğu gösterilmiştir. pRK5-EGFP-Tau transfekte edilen hücelere zamana bağlı olarak 10 μ M LiCl uygulamasının hücre sağkalımını yalnızca plazmid transfekte edilen hücelere göre arttırdığı, ancak 24 saat uygulamadan sonra toksik geldiği ve 72 saatte sağkalımı kontrol grubunun gerisine düşürdüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak EBR 'nin zamana bağlı uygulanmasının LiCl'e göre düşük toksisite gösterdiği, olası nörokoruyucu etkisinin ise hücre sağkalımı deneyi açısından LiCl'den daha fazla olduğu gösterilmiştir. (Şekil 4.8).

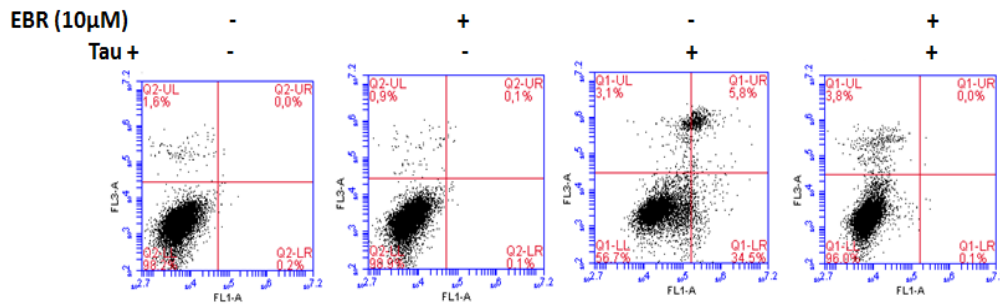


Şekil 4. 8 pRK5-EGFP-Tau plazmidini transfekte edilen veya edilmeyen PC12 hücrelerinde EBR 'nin hücre sağkalımına etkisinin LiCl karşılaştırmalı olarak tripan mavisi sağkalım analizi ile gösterilmesi. Bu deneyde 10 μ M EBR ve 10 μ M LiCl kullanılmıştır. Bu grafik 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir. Tripan mavisi ile boyanan hücreler, ölü hücre sayısı hesaba katılmaksızın sağ kalan hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Elde edilen verilerin grafiği GraphPad Prism programı kullanılarak çizilmiştir.

4.2.4 *In Vitro* Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisinin Hücre Akış Sitometresi ve Floresan Mikroskopisi ile Gösterilmesi

pRK5-EGFP-Tau plazmidini transfekte edilen veya edilmeyen PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR'nin hücre ölümü üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacı ile farklı kondüsyonlara ait hücreler kaldırılmış ve Anneksin-V/PI boyaması yapılmış, ardından hücre akış sitometresinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreleri popülasyonunu temsil eden kuadrantın sol alt bölgesindeki hücre oranı; kontrol grubunda % 98,7 ve 10 μ M EBR uygulanmasıyla % 98,9 iken, tau anlatımının arttırılması ile % 56,7' ye düştüğü, bununla birlikte erken apoptotik hücre popülasyonunu belirten kuadrantın sağ alt köşesindeki hücre oranının ise % 0'lardan

% 34,5'e, geç apoptotik hücreleri temsil eden kuadrantın sağ üst köşesindeki hücre oranının % 0' dan yüzde % 5,8'e, nekrotik hücreleri temsil eden kuadrantın sağ üst köşesindeki hücre oranının ise % 1,6'dan % 3,1'e yükseldiği gösterilmiştir. Tau anlatımı arttırılan hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile canlı hücre popülasyonunun tekrar yüzde % 96'ya yükseldiği ve erken-geç apoptotik hücre oranlarının % 0'a gerilediği, ancak nekrotik hücre popülasyonu oranında önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu sonuca göre 10 μ M EBR uygulamasının sağlıklı hücrelere toksik gelmediği ve tau anlatımı artılmış hücrelerde olası nörokuruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir.



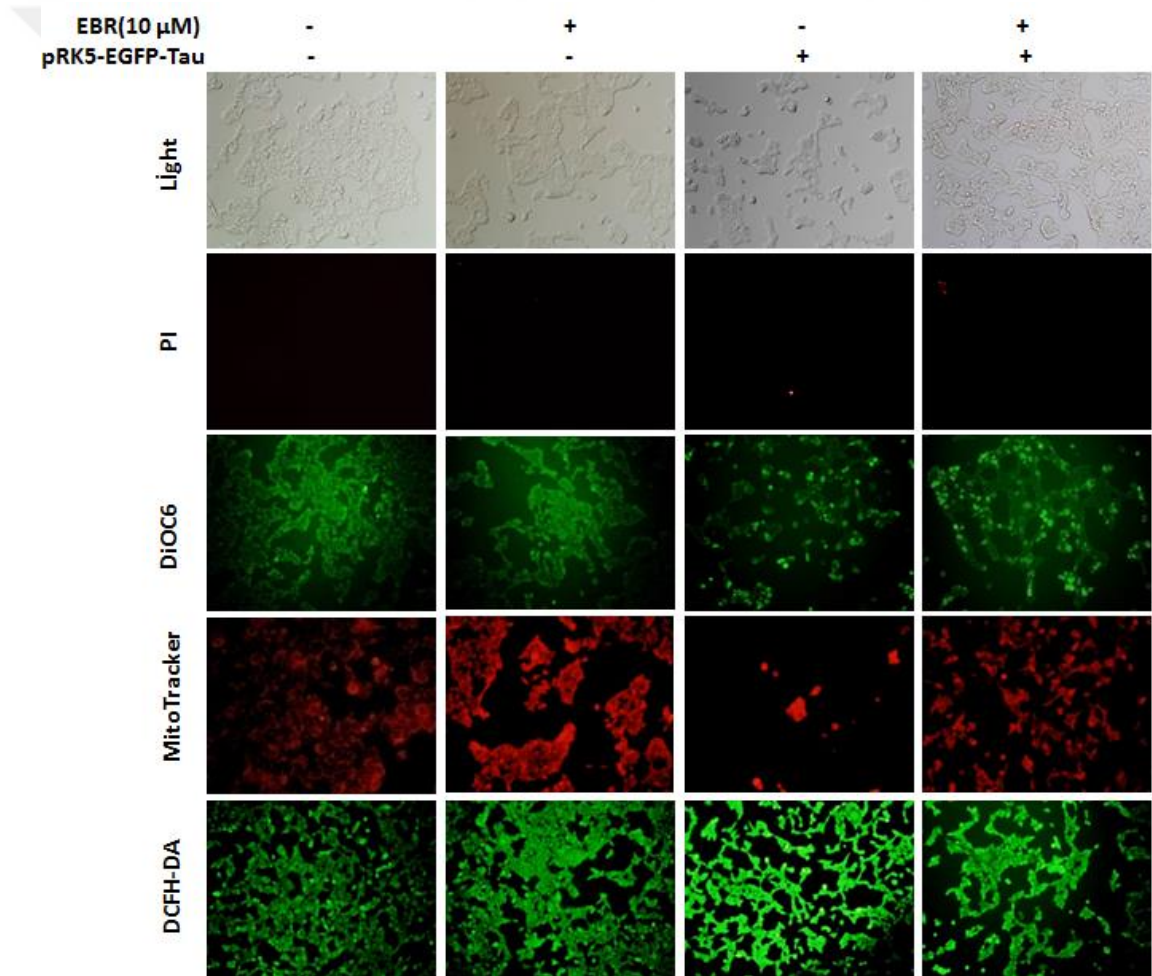
Şekil 4. 9 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin hücre ölümüne etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile gösterilmesi. Deneyde 10 μ M EBR kullanılmıştır. Hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür.

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR'nin hücre ölümü, mitokondri membran potansiyeli ve ROS üretimi üzerindeki etkisi çeşitli boyamalar ile floresan mikroskobunda gösterilmiştir. Işık mikroskobu görüntülerinde; tau anlatımı arttırılmış PC12 hücre yoğunluğunun azaldığı, diğer uygulamalarda kontrol grubu ile benzer hücre yoğunluğu olduğu belirlenmiştir. DiOC6 ve Mitotracker boyamaları; tau anlatımının arttırılması ile kontrol grubuna göre önemli oranda azalan mitokondri membran potansiyelinin, 10 μ M EBR uygulamasıyla tekrar arttığını göstermiştir. Yalnızca 10 μ M EBR uygulanması durumunda ise mitokondri membran potansiyelinde kontrol grubuna göre düşük oranda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.10).

Floresan mikroskobunda DCFH-DA boyaması ile tau anlatımının arttırılmasının kontrol grubuna göre önemli oranda artan hücresel ROS miktarının, 10 μ M EBR uygulanması ile tekrar azaldığını göstermiştir. Yalnızca 10 μ M EBR uygulaması

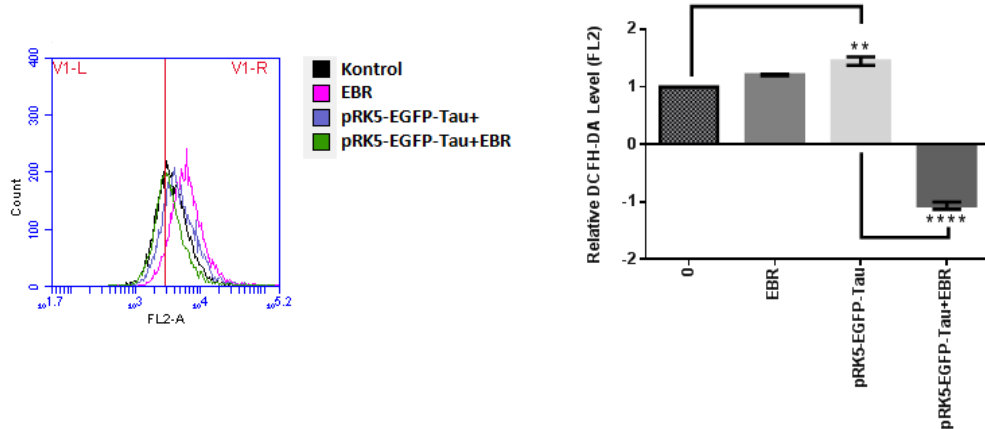
durumunda ise hücresel ROS miktarının arttığı gözlenmiştir. PI boyaması ile nekrotik veya geç apoptotik hücre miktarının 10 μ M EBR uygulanması ile düşük oranda, tau anlatımının arttırılması ve beraberinde 10 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre daha fazla oranda arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.10).

Sonuç olarak fluorensan mikroskobu görüntüleri ile sağlıklı hücrelere 10 μ M EBR uygulamasının tau anlatımının arttırılmasına toksisitesinin düşük olduğu, tau anlatımı arttırılmış hücrelere 10 μ M EBR uygulanmasının mitokondri membran potansiyelinin geri kazanımı ve hücresel ROS miktarının düşürülmesinde oldukça etkili olduğu gözlenmiştir



Şekil 4. 10 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin hücre ölümü ile ilgili bileşenler üzerindeki etkisinin fluorensan mikroskobisi ile gösterilmesi. Deneyle 10 μ M EBR'nin etkileri DiOC6, Mitotracker, DCFH-DA ve PI boyamaları ile gösterilmiştir. Görüntüler en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücrel ROS üretimi üzerindeki etkisi DCFH-DA boyaması yapılarak hücre akış sitometresi ile sayısal olarak da gösterilmiştir. Sonuçta fluoresan mikroskobu görüntüleri ile paralel olarak ROS miktarının 10 μ M EBR uygulaması ve özellikle de tau anlatımının artırılmasının istatistiksel olarak anlamlı biçimde tetiklendiği, tau anlatımı arttırılan PC12 hücrelerine 10 μ M EBR uygulanmasıyla ise ROS miktarının istatistiksel açıdan daha anlamlı biçimde geri çekildiği gözlenmiştir (Şekil 4.11).

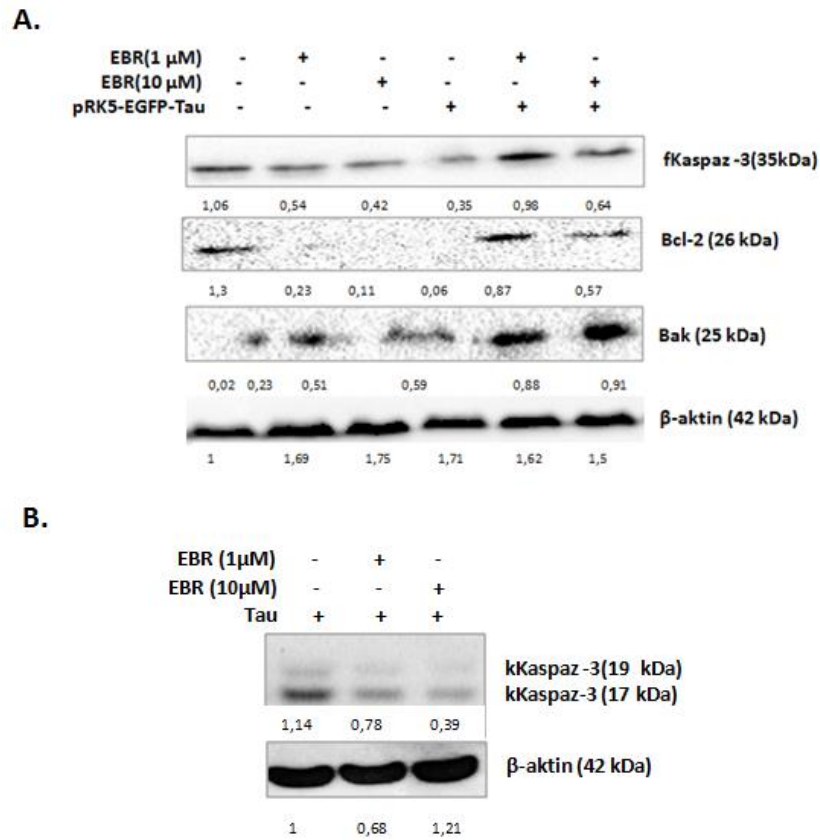


Şekil 4. 11 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR uygulamasının ROS üretimi üzerindeki etkisinin hücre akış sitometresi ile gösterilmesi. Denede 10 μ M EBR kullanılmıştır. Farklı renklerle ifade edilen kondüsyonlardaki PC12 hücreleri kaldırılmış, DCFH-DA ile boyanıp karanlıkta bekletilmiş ve ardından hücre akış sitometresinde BD C6 Biosciences programı kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler GraphPad Prism programı kullanılarak grafiğe dökülmüş ve istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. **p < 0,001; ****p < 0,00001.

4.2.5 Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR'nin Apoptoz ile İlişkili Proteinlerin Anlatımı Üzerindeki Etkisinin İmmunoblotlama ile Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak (1 ve 10 μ M) uygulanmasının apoptoz ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immünoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. Anti-apoptotik protein Bcl-2 anlatımının EBR'nin doza bağlı uygulanması ve tau anlatımının arttırılması ile belirgin biçimde azaldığı, tau anlatımı arttırılan hücrelere doza bağlı EBR uygulanması ile tekrar arttığı gözlenmiştir. Pro-apoptotik protein Bak'ın anlatımının diğer tüm kondüsyonlarda kontrol grubuna kıyasla arttığı, bu artışın tau anlatımı arttırılmış

hücrelerde en fazla olduğu gösterilmiştir. Taupati modeli hücrelere EBR'nin doza bağlı olarak birlikte uygulanması ile de Bak anlatımının arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.12, A). PC12 hücrelerinde, 1 ve 10 μM EBR uygulanmasıyla ve özellikle de tau anlatımının artırılması ile kontrol grubuna göre inaktif öncül kaspaz-3 (f-Kaspaz) seviyesinin belirgin biçimde azaldığı (Şekil 4.12, B), tau anlatımı artırılan hücrelerde artan aktif kesilmiş kaspaz 3 (kKaspaz3) seviyesinin bu hücrelere 1 ve özellikle de 10 μM EBR uygulanması ile belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.12, A).



Şekil 4. 12 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış hücrelerde EBR'nin doza bağlı olarak apoptoz ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immünoblotlama tekniği ile gösterilmesi. EBR'nin 1 ve 10 μM 'lık dozları kullanılmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. Bu sonuç birbirinden bağımsız en az 2 deneyi temsil etmektedir.

Daha önce gerçekleştirilen EBR'nin doza bağlı olarak taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerindeki etkinliği ile ilgili deneylerde, 10 μM EBR'nin taupati modelinde hücre sağkalımını en etkin şekilde arttıran doz olduğu ve β -Katenin'in nükleusa göçünde en etkili doz olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle

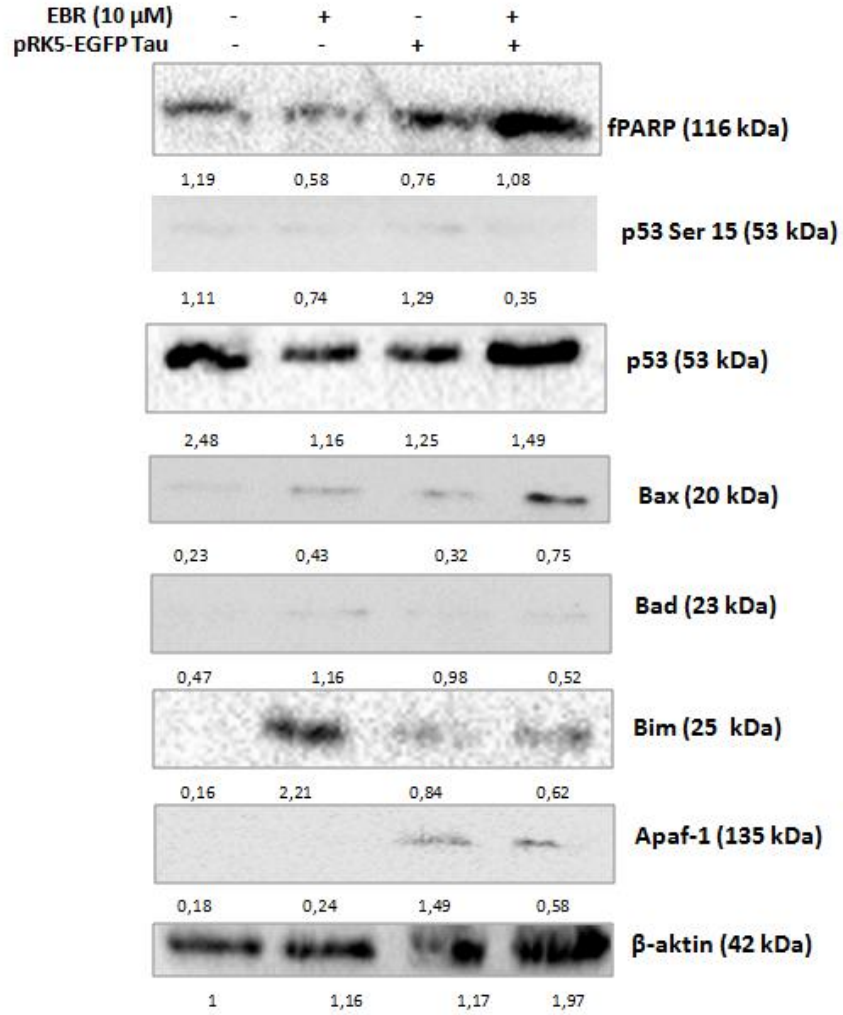
ilerleyen deneylerde doza bağı EBR uygulamaları 1 ve 10 μM üzerinden devam etmiştir, ancak terapötik potansiyelinin en fazla olduğu düşünölen EBR dozu olan 10 μM uygulamasının, doza bağı EBR uygulamasının protein anlatımları üzerindeki etkisinin kontrolünde tekrar niteliğinde veya taranan sinyal yolaklarındaki diğer pek çok proteinin taupati modellerindeki anlatımına EBR'nin etkisi belirlenirken etkin doz olarak kullanılmıştır.

EBR'nin (10 μM), taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde diğer apoptoz ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Genomun gardıyanı olarak adlandırılan, Tf olarak ve protein kompleksleri oluşturarak işlev gören apoptozun düzenleyicilerinden p53'ün anlatımının 10 μM EBR uygulanması ve tau anlatımının arttırılması ile kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı, taupati modeli hücrelere 10 μM EBR uygulanması ile belirgin bir değışiklik olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte daha çok ER stres ile karakterize edilen p53'ün Ser 15 fosforilasyon seviyesinin doğal tip hücrelere 10 μM EBR uygulanması ile azaldığı, taupati modelinde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir değışiklik olmadığı, bu hücrelere EBR uygulanması ile ise belirgin şekilde düştüğü gözlenmiştir. Pro-apoptotik protein Bax'ın anlatımının 10 μM EBR uygulaması ve taupati modeli oluşturulması ile kontrol grubuna göre arttığı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelere 10 μM EBR uygulanmasının ise Bax anlatımını daha yüksek oranda arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Pro-apoptotik protein Bad'ın anlatımının taupati modeli hücrelerde ve doğal tip PC12 hücrelerine 10 μM EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre belirgin biçimde arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μM EBR uygulanması ile ise bu artışın belirgin şekilde geri çekildiği gösterilmiştir. Pro-apoptotik protein Bim'in 25 kDa'lık izoformunun anlatımının taupati modeli hücrelerde ve özellikle de doğal tip PC12 hücrelerine 10 μM EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre yüksek oranda arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μM EBR uygulanması ile bu artışın düşük oranda geri çekildiği gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Apoptozu tetikleyici proteinlerden Apaf-1'in anlatımının taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde kontrol grubuna göre yüksek oranda arttığı, bu hücrelere 10 μM EBR uygulanması ile bu artışın yüksek oranda geri çekildiği gösterilmiştir.

Apoptotik DNA kırıklarının onarımından sorumlu PARP'ın kesilimi apoptozun fiks olmasında önemli bir aşamadır. Aktif kesilmemiş PARP (fPARP) seviyesinin 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modeli oluşturulması ile kontrol grubuna göre belirgin biçimde azaldığı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile fPARP seviyesinin tekrar arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4. 13 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin pro-apoptotik proteinler ve apoptoz düzenleyicileri üzerindeki etkisinin immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

Bu bölümden çıkarılacak genel sonuç, EBR uygulaması ile taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde; artan hücresel stres bileşenlerinin geri çekildiği ve azalan hücre canlılığının tekrar arttığıdır.

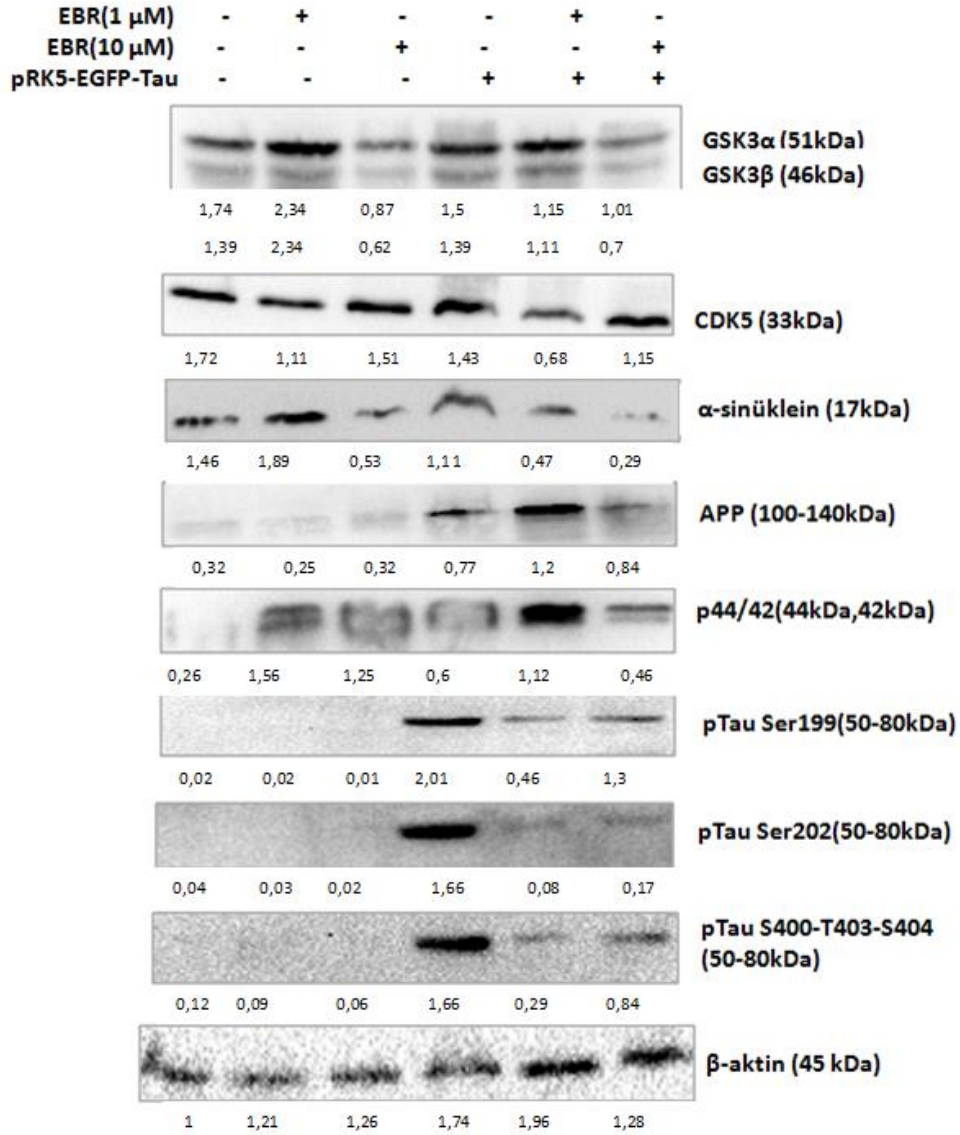
4.3 EBR'İN TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE ALZHEİMER HASTALIĞI BİYOBELİRTECİ PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

4.3.1 EBR'nin Doza Bağlı Olarak Alzheimer Hastalığı Biyobelirteci Proteinler Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde 1 ve 10 μ M EBR'nin çeşitli AH biyobelirteci proteinlerin anlatımı ve fosforilasyonu üzerindeki etkisi immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. Taupati modeli oluşturulmamış PC12 hücrelerinde GSK3 α ve GSK3 β anlatımlarının 1 μ M EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre arttığı, bununla birlikte 10 μ M EBR uygulanmasıyla kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Tau anlatımının artırılması ile kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmayan GSK3 α ve GSK3 β anlatımlarının, bu hücrelere 1 μ M ve özellikle de 10 μ M EBR uygulaması ile azaldığı gözlenmiştir. Taupati modelinde GSK3 β anlatımının, GSK3 α anlatımına göre daha efektif bir şekilde geri çekildiği gözlenmiştir. CDK5 anlatımında taupati modelinde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı, bununla birlikte doğal tip ve taupati modeline 1 μ M EBR uygulanması ile önemli ölçüde geri çekildiği gösterilmiştir (Şekil 4.14).

Alfa-syn anlatımının taupati oluşturulmamış hücrelerde 1 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre arttığı, 10 μ M EBR uygulaması ile ise belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Taupati modeli oluşturulması ile α -syn anlatımında kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı, ancak bu hücrelere 1 μ M ve özellikle de 10 μ M EBR uygulanmasıyla önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Taupati modeli oluşturulan hücrelerde kontrol grubuna göre artan total APP seviyesinin, bu hücrelere özellikle 1 μ M EBR uygulanması ile daha fazla arttığı, 10 μ M EBR uygulanması ile ise önemli bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. p44/42 anlatımının doza bağlı EBR uygulanması ve tau anlatımının artırılması ile kontrol grubuna göre arttığı, taupati modeli hücrelere özellikle 1 μ M EBR uygulanması ile daha fazla arttığı, 10 μ M EBR uygulanması ile ise önemli bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde p-tau Ser 199, p-tau Ser 202 ve p-tau Ser 400-Thr 403-Ser404 seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı, bu hücrelere doza bağlı EBR uygulanması ile bu seviyelerin önemli ölçüde gerilediği gözlenmiştir. Taupati modelinde en fazla Ser 199 fosforilasyonunun arttığı, buna karşın doza bağlı

EBR uygulaması ile en fazla Ser 202 fosforilasyonunun geri çekildiği gösterilmiştir. Taupati modelinde 1 μ M EBR uygulamasının 10 μ M EBR'ye göre tau fosforilasyonlarını daha efektif bir şekilde geri çektiği gösterilmiştir (Şekil 4.14).

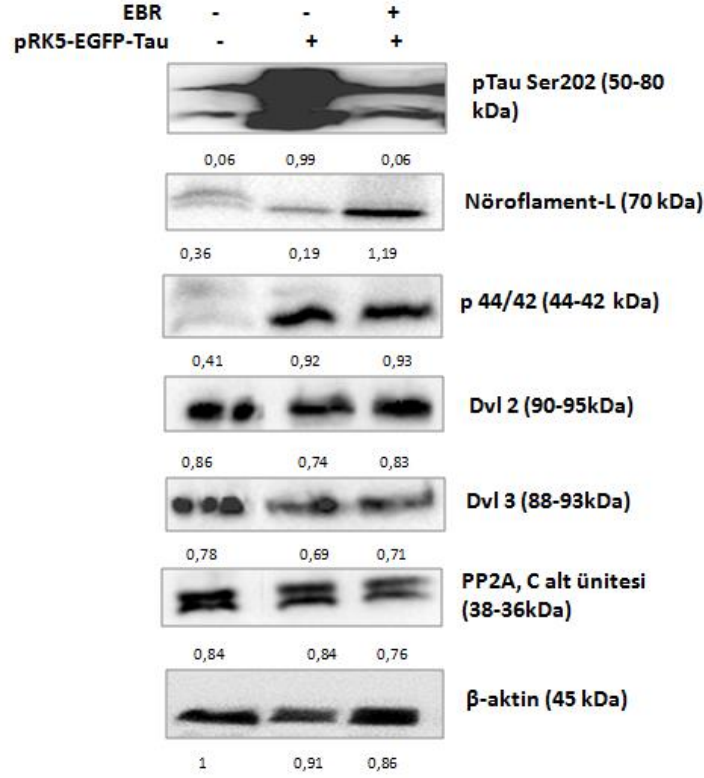


Şekil 4. 14 Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağlı olarak AH ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 1 ve 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kotrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 deneyi temsil etmektedir.

4.3.2 EBR'nin Terapötik Potansiyeli Yüksek Olduğu Düşünülen Dozunun Taupati Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde Alzheimer İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisininin Gösterilmesi

Tau anlatımı artırılmış hücrelerde tetiklenen tau Ser 202 fosforilasyonunun 10 μ M EBR uygulanması ile azaldığı gözlenmiştir. Tau anlatımının artırılması ile NF-L seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığı, bu hücelere 10 μ M EBR uygulanması ile NF-L seviyesinin artarak kontrol seviyesinin de üzerine çıktığı gözlenmiştir. Tau kinazlarından olan, aynı zamanda hücre sağkalımında önemli rol oynayan p44/42 nin anlatımı taupati modelinde artmış, ancak bu hücelere 10 μ M EBR uygulanmasıyla anlatımda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

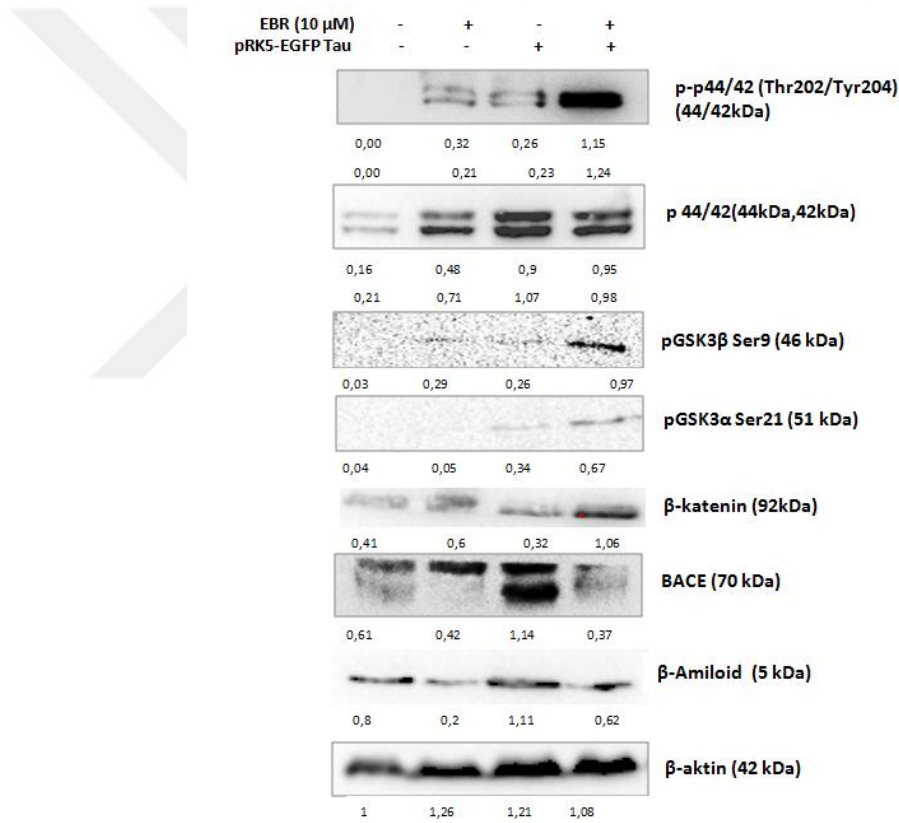
Tau fosfatazlarından PP2A'nın katalitik alt ünitesinin (C-alt ünitesi) anlatımında, taupati modelinde ya da bu hücelere 10 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna veya birbirlerine kıyasla önemli bir değişiklik olmamıştır. Tau kinazlarından olan GSK3 α ve GSK3 β 'nin etkileşim içerisinde olduğu pek çok hücrel sinyal yolağı bulunmaktadır. GSK3 aktivitesi ile ilişkili olan Wnt sinyal yolağı, β -katenin Tf'nin nuklear göçünü düzenlemektedir. Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde veya bu hücelere 10 μ M EBR uygulanması ile, Wnt sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında aktive olarak GSK3'ün inhibe olmasını sağlayan Dishevelled 2 (Dvl2) ya da Dishevelled 3 (Dvl3)'ün anlatımında kontrol grubuna ve birbirlerine kıyasla önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15 EBR'nin AH biyobelirteci proteinlerin anlatımı üzerindeki etkisinin immünoyblotlama ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmış olup bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR'nin AH ilişkili kinazlar, proteazlar ve bazı proteinler üzerindeki etkisi immünoyblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. AMPK α ve AKT tarafından gerçekleştirilen tau kinazlarından GSK3 β 'nin Ser9 inhibe edici fosforilasyonu seviyesinin; 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde düşük oranda arttığı, ancak taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile total GSK3 β anlatımı düşmesine karşın Ser9 fosforilasyonunun daha fazla arttığı gösterilmiştir. Tau kinazlarından olan ancak MSS'de GSK3 β kadar etkin rol oynamayan GSK3 α 'nın Ser21 inhibe edici fosforilasyonunun; taupati modelinde kontrol grubuna göre arttığı, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile total GSK3 α anlatımı düşmesine karşın GSK3 α Ser21 fosforilasyonunun daha fazla tetiklendiği gözlenmiştir. APP kesiliminden sorumlu total BACE anlatımının; taupati modelinde kontrole göre belirgin şekilde arttığı, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile belirgin şekilde geri çekildiği gösterilmiştir. Buna paralel olarak amiloid beta seviyesinin 10 μ M EBR uygulaması ile azaldığı, taupati modelinde arttığı, ancak bu hücrelere 10 μ M EBR uygulaması ile geri çekildiği gösterilmiştir (Şekil4.16). Tau kinazlarından

p44/42'nin anlatımı; 10 μ M EBR uygulamasıyla kontrol grubuna göre artmış, taupati modelinde ise bu artış daha yüksek oranda gözlenmiş, ancak bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile önemli bir değişiklik olmamıştır. p44/42'nin aktive edici fosforilasyonları Thr 202/Tyr 204'ün; 10 μ M EBR uygulaması veya taupati modelinde kontrol grubuna göre arttığı, ayrıca taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile bu artışın oldukça yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Wnt sinyali aktif olmadığından GSK3 tarafından fosforile edilerek UPS ile yıkımı teşvik edilen β -katenin'in seviyesinin; 10 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre arttığı, taupati modelinde düştüğü, ancak bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile belirgin şekilde tekrar arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.16).

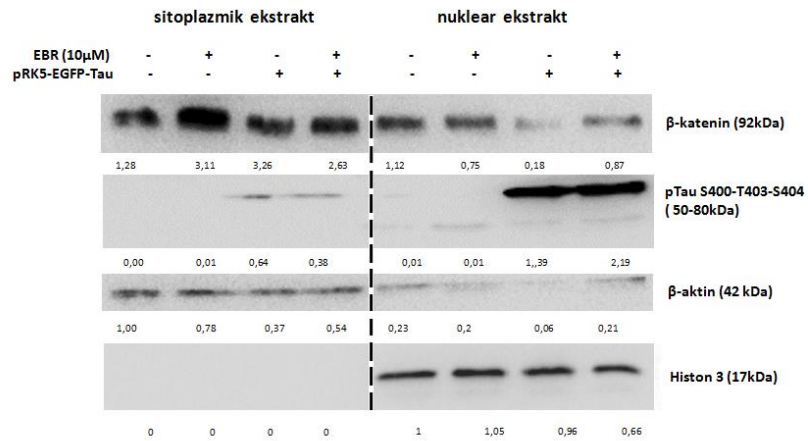


Şekil 4. 16 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin AH ilişkili kinazlar, ve proteazlar üzerindeki etkisinin immünoyoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 deneyi temsil etmektedir.

NPC'lerde nöral gelişim ile farklılaşmada, post-mitotik nöronlarda ise hücre sağkalımı için önemli olan β -Katenin'in nuklear göçüne 10 μ M EBR uygulamasının etkisi, taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinden nuklear/sitoplazmik izolasyonla elde edilen ekstraktların immünoyoblotlama analizi

yapılması ile gösterilmiştir. Sitoplazmik ekstraktta kontrol grubuna göre β -katenin seviyesi; taupati modeli ve özellikle de 10 μ M EBR uygulamasıyla artmış, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile azalmıştır. Nüklear ekstraktta kontrol grubuna kıyasla β -katenin göçü taupati modeli oluşturulması ile belirgin şekilde azalmış, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ise yeniden artmıştır (Şekil 4.17).

Nüklear tau'nun DNA'nın stabilize ederek nörokoruyucu rolü olduğu belirlenmiştir. Hiperfosforilasyon gibi etmenler ile mikrotübüllerden serbestlenen sitoplazmik tau'nun nüklear por kompleksi ve nükleusta yanlış lokalizasyonunun ise NH gelişiminde önemli olduğu ifade edilmektedir (Lester ve Parker 2018). Bu bağlamda taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde 10 μ M EBR'nin nüklear tau Ser 404/ Thr 403/Ser 404 fosforilasyonu üzerindeki etkisi, ilgili kondüsyonlara sahip hücrelerden nüklear/sitoplazmik izolasyonla elde edilen ekstraktlar ile immunoblotlama analizi yapılması ile gösterilmiştir. Taupati modeli oluşturulmamış kontrol grubunda nüklear ekstraktta oldukça düşük miktarda p-tau (Ser 400/Thr403/Ser404) varlığı gözlenirken sitoplazmik ekstraktta gözlenmemiştir. Taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde nüklear ekstraktta kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek oranda p-tau gözlenmiştir. Bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile sitoplazmik ekstraktta azalan p-tau miktarında nüklear ekstraktta önemli bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4. 17 EBR 'nin taupati modeli oluşturulmuş PC2 hücrelerinde β -katenin'in nüklear göçüne ve nükleusta konumlanan p-tau seviyesi üzerindeki etkisinin nüklear-sitoplazmik protein izolasyonu ve immunoblotlama ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR kullanılmıştır. Yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ekstraktta β -aktin, nüklear ekstraktta H3 kullanılmıştır.

Bu bölümden çıkarılabilecek genel sonuçlar; EBR'nin AH patolojisini tetikleyen elemanlar üzerinde genel anlamda geri dönüşümü sağladığı, GSK3 inhibisyonunu arttırarak β -katenin'in nuklear gücünü teşvik etmesi aracılığı ile hücre sağkalımını tetiklediği ve EBR'nin olası nörokoruyucu etkisinin Wnt sinyal yolağından bağımsız olduğudur.

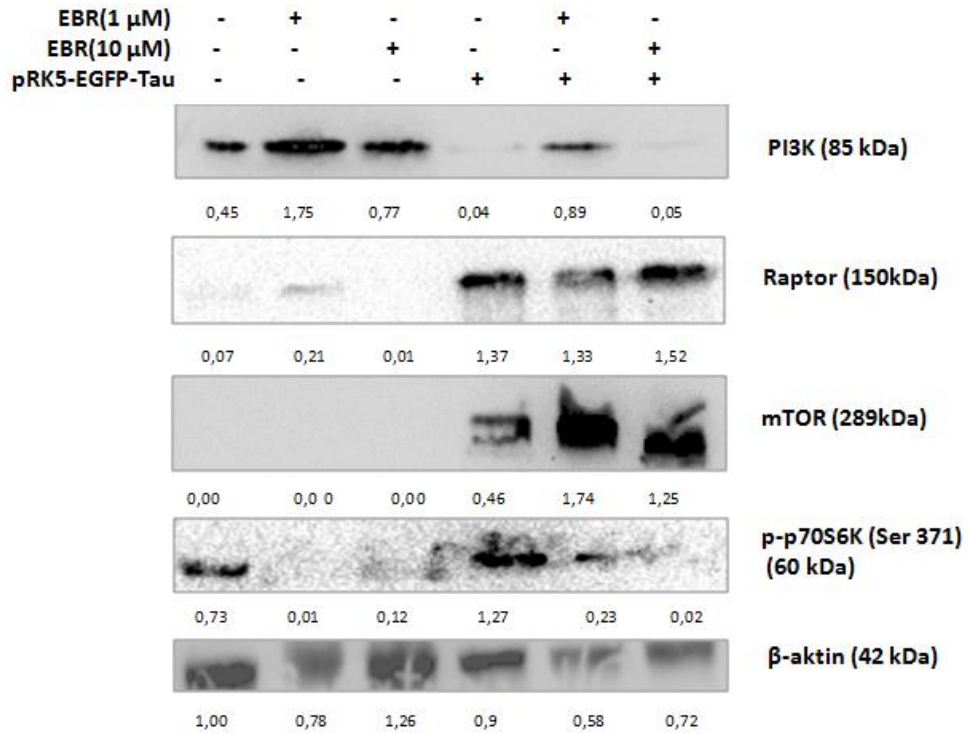
4.4 TAUPATI MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR'NİN FOSFOTİDİL İNOSİTOL 3 KİNAZ/PROTEİN KİNAZ B/RAPAMİSİNİN MEKANİSTİK HEDEFİ SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

GSK3 aktivitesi ile ilişkili olan Wnt sinyal yolağı bileşenleri Dsh 2 ve Dsh3'ün anlatımının taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR uygulanması ile ilişkili olmadığı daha önce gösterilmiştir. Bu nedenle EBR'nin taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde, GSK'ün ilişkili olduğu büyük hücresel sağkalım yolağı olan PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerindeki etkileri belirlenmek istenmiştir.

4.4.1 Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde Doza Bağlı EBR Uygulamasının PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde lipid kinaz PI3K'in düzenleyici alt ünitesi p85, mTORC1'in elemanlarından mTOR ve Raptor anlatımları ile protein sentezinin düzenlenmesinde önemli bir kinaz olan p70S6K'nın GSK3 tarafından gerçekleştirilen aktive edici Ser 371 fosforilasyonu seviyesinin EBR'nin doza bağlı (1 ve 10 μ M) uygulanması ile değişimleri immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Ayrıca, aktif mTORC1 kompleksi tarafından PP2A'nin inhibe edilmesi ile bu fosforilasyon korunmaktadır. PI3K'in düzenleyici p85 alt ünitesinin anlatımı; EBR'nin doza bağlı uygulanması ile özellikle 1 μ M'da kontrol grubuna göre artmış, taupati modelinde ise kontrol grubuna göre azalmıştır. Taupati modeli hücrelere 1 μ M EBR uygulanması ile tekrar artan PI3K p85 anlatımında 10 μ M EBR uygulanması ile taupati modeline göre önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. mTORC1'in düzenleyici alt ünitesi Raptor'un anlatımının; 1 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre arttığı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde kontrol grubuna göre önemli oranda arttığı, bu hücrelere 1 ve özellikle 10

μM EBR uygulanması ile düşük oranda arttığı gösterilmiştir. mTORC1'in katalitik alt ünitesi mTOR'un anlatımı taupati modelinde kontrol grubuna göre yüksek oranda artmış, bu hücrelere 1 ve 10 μM EBR uygulanması ile ise daha fazla artmıştır. p70S6K'nın aktive edici Ser 371 fosforilasyonu seviyesinin EBR 'nin doza bağlı uygulanması ile kontrol grubuna göre düştüğü, taupati modelinde kontrol grubuna göre arttığı, bu hücrelere EBR'nin doza bağlı uygulanması ile ise düştüğü gösterilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4. 18 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde doza bağlı EBR uygulamasının GSK3 ilişkili PI3K/Akt/mTOR sağkalım yolağı üzerindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. Deneylerde 1 ve 10 μM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır.

4.4.2 Taupati Modeli Oluşturulmuş PC12 Hücrelerinde EBR Uygulamasının PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

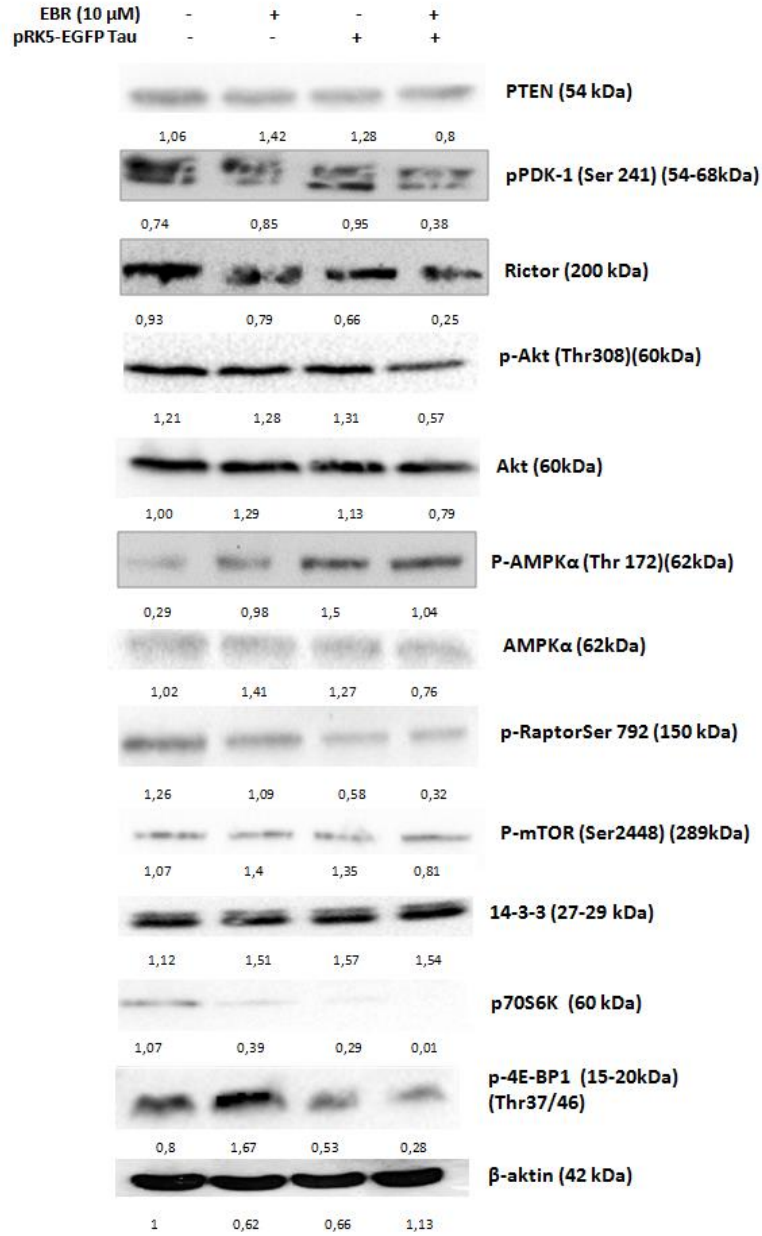
Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μM EBR'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki diğer proteinlerin anlatımı üzerindeki etkisi immünoblotlama ile gösterilmiştir. AKT ve p70S6K'nın aktive edici fosforilasyonlarını sağlayan PDK-1'in aktive edici Ser 241 fosforilasyonunun; 10 μM

uygulanması ve taupati modeli oluşturulması ile kontrol grubuna göre düşük oranda arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile de ilaç uygulanmayan gruba göre belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte PI3K tarafından gerçekleştirilen fosfotidil inositollerin fosforilasyonlarını geri çeken PTEN fosfataz anlatımının 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde kontrol grubuna kıyasla düşük oranda arttığı, taupati modeline 10 μ M uygulanması ile ise azaldığı ve kontrol grubunun gerisine düştüğü gösterilmiştir. AKT ve PKC'nin aktive edici fosforilasyonlarından sorumlu olan mTORC2 kompleksinin düzenleyicisi Rictor'un anlatımının; 10 μ M EBR uygulanması ve taupati modelinde kontrole göre azaldığı, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile de ilaç uygulanmayan gruba göre belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. PDK1 ve mTORC2 tarafından aktive edici Ser 473 fosforilasyonu gerçekleştirilen Akt'ın kendisini aktive ettiği otofosforilasyonu olan Thr 308 seviyesinde 10 μ M EBR uygulanması ve taupati modelinde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik gözlenmediği, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile ise belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte total Akt anlatımında 10 μ M EBR uygulanması ve taupati modelinde düşük oranda artış, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile ise daha belirgin şekilde azalma gözlenmiştir.

ATP'nin azalması, buna bağlı olarak AMP'nin artması gibi stres koşullarında aktive olan, otofajiyi tetikleyici, heterotrimerik yapıdaki AMPK'nın α alt ünitesinin Thr 172 aktive edici fosforilasyon seviyesinin kontrol grubundan itibaren sırasıyla 10 μ M EBR uygulanması ve taupati modeli oluşturulması ile belirgin şekilde arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ise azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte AMPK α 'nın total anlatımının 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde arttığı, ancak taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile azaldığı gösterilmiştir. Buna karşın mTORC1'in düzenleyicisi olan Raptor'un AMPK tarafından gerçekleştirilen inhibe edici Ser 792 fosforilasyonunun kontrol grubuna kıyasla; 10 μ M EBR uygulanması ve özellikle taupati modeli oluşturulması ile azaldığı, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile ise daha düşük oranda azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca mTORC1'in aktive edici fosforilasyonu Ser 2448 seviyesi 10 μ M EBR uygulanması ve taupati modelinde kontrol grubuna göre artmış, ancak taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile daha belirgin oranda azalmıştır (Şekil 4.19). mTORC1, PKC, FOXO 3 gibi proteinlerin inhibe edici fosforilasyonlarını fikse eden

fosfoserin bağlanma proteini 14-3-3'ün anlatımının; 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde arttığı, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmektedir. Doza bağlı EBR uygulanması ile kontrol ve taupati modeline göre aktive edici Ser 371 fosforilasyonu seviyesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilen p70S6K'nın total anlatımının ise 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı, taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile de daha düşük oranda azaldığı gösterilmiştir. mTORC1 tarafından inhibe edici Thr 37/46 fosforilasyonuna uğrayan ökaryotik translasyon başlama faktörü 4E-BP1'nin inhibe edici fosforilasyonunun kontrol grubuna göre; 10 μ M EBR uygulaması ile arttığı, taupati modelinde azaldığı, taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile de azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.19).





Şekil 4. 19 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β - aktin kullanılmıştır.

Bu bölümden çıkarılabilecek genel sonuçlar; taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerine EBR uygulamasının PI3K/ Akt/ mTOR yolağında inhibe edici etkisinin olabileceği, bununla birlikte doğal tip hücrelerde AMPK α aktivasyonunu sağladığıdır.

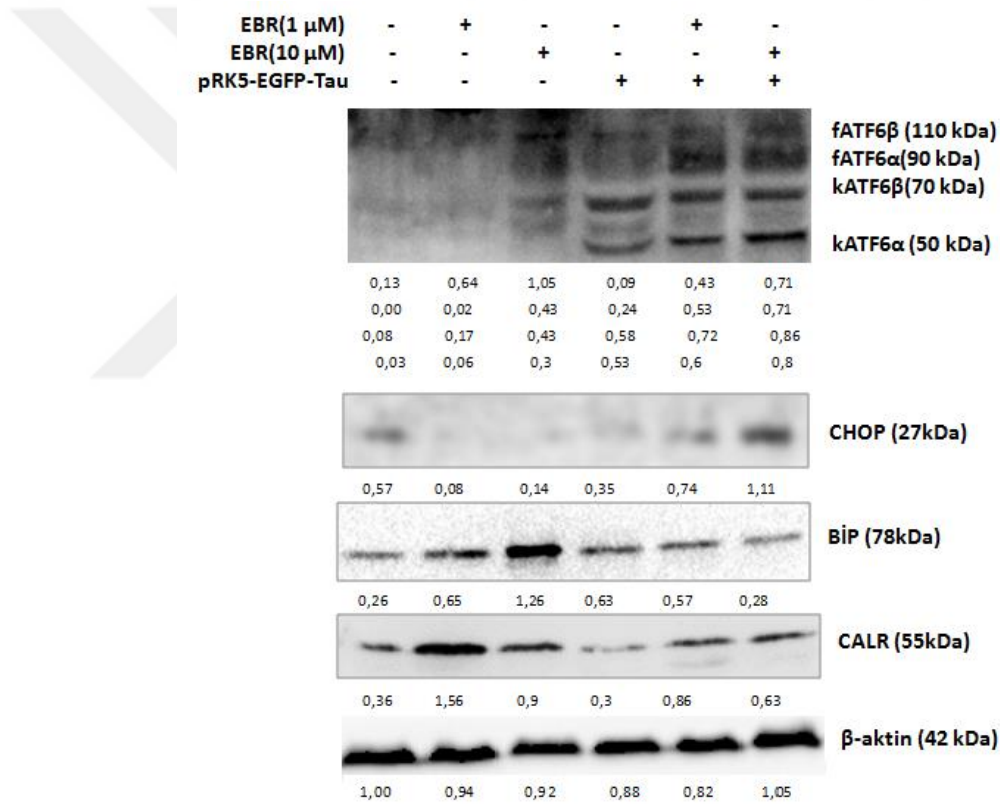
4.5 EBR 'NİN ER STRESİ VE MOLEKÜLER ŞAPERON SİSTEMLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

4.5.1 EBR'nin Doza Bağlı Olarak ER Stresi İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisinin İmmünoyblotlama ile Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağlı (1 ve 10 μM) olarak ER stres ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immünoyblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. ER stres sensör proteinlerinden olan ATF6'nın α ve β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. ER stres durumunda kesilmemiş (f); fATF6 α ve fATF6 β Golgide kesilerek aktif lösün fermuarı bağlanma motifi içeren Tf'ler (kATF6 α veya kATF6 β) olarak nukleusa göçmektedirler ve DNA'daki ER stres elementini (ERSE)'ne bağlanarak ER stres cevap genleri (ERSRG)'nin anlatımını kontrol etmektedir. Literatürdeki çalışmalarda kATF6 α 'nın hızla degrade olan güçlü bir aktivatör, kATF6 β 'nin ise yavaş yıkılan zayıf bir aktivatör olduğu gösterilmiştir. Tf kompleksinde kATF6 β 'nin kATF6 α 'nın inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Thuerauf ve ark, 2007). Kontrol ve 1 μM EBR'da düşük olan fATF6 α anlatımı ve kesiliminin 10 μM EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre yüksek oranda arttığı, 1 μM EBR uygulaması ile yalnızca fATF6 β anlatımı ve kesiliminin düşük oranda arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte 10 μM EBR uygulanması ile aynı zamanda fATF6 β anlatımı ve kesiliminin arttığı gözlenmiştir. Taupati modelinde kontrol grubuna göre fATF6 α anlatımının arttığı ve kesilime uğrayarak kATF6 α seviyesini belirgin şekilde arttırdığı, buna karşın fATF6 β seviyesinde önemli bir değişiklik olmadığı, ancak kesiliminin yüksek oranda arttığı, bu hücrelere 1 ve 10 μM EBR uygulanması ile ilaç uygulanmayan gruba göre fATF6 β anlatımlarının yüksek oranda, fATF6 α anlatımının ve kATF6 α/β seviyelerinin daha düşük oranda arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.20).

ER stres sensör proteinlerinden olan PERK'in aktivasyonu aracılığıyla ATF4 tarafından anlatımı tetiklenen CHOP nukleusa geçerek kronik ER stres ile ilişkili genlerin anlatımını sağlamaktadır. Doza bağlı EBR uygulanması ile yüksek oranda ve taupati modeli oluşturulması ile düşük oranda kontrol grubuna göre düşen CHOP anlatımının taupati modeli oluşturulmuş hücrelere; 1 μM EBR uygulanması ile yeniden arttığı ve kontrol seviyesini geçtiği, 10 μM EBR uygulanması ile ise kontrol grubunun iki katına ulaştığı gözlenmiştir. ER şaperon proteinlerinden BİP'in

anlatımının; doza bağlı EBR uygulamasıyla ve taupati modelinde kontrol grubuna göre arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μM EBR uygulanması ile ise kontrol seviyesine gerilediği gözlenmiştir. EBR'nin ER stres ilişkili antikanser etkinliği ile ilgili yapılan çalışmada LnCAP hücrelerine 30 μM EBR uygulanması ile anlatımı en anlamlı şekilde değiştiği gözlenen Ca^{+2} bağımlı çalışan ER şaperon proteini CALR'ün anlatımının; PC12 hücrelerine doza bağlı (1 ve 10 μM) olarak uygulanmasından özellikle de 1 μM EBR ile kontrol grubuna göre arttığı, taupati modelinde kontrol grubuna göre düşük oranda şekilde azaldığı, bu hücrelere 1 ve 10 μM EBR uygulanması ile yeniden artarak kontrol grubu seviyesinin üzerine çıktığı gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4. 20 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin doza bağlı olarak ER stresi ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. Deneylerde 1 ve 10 μM EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

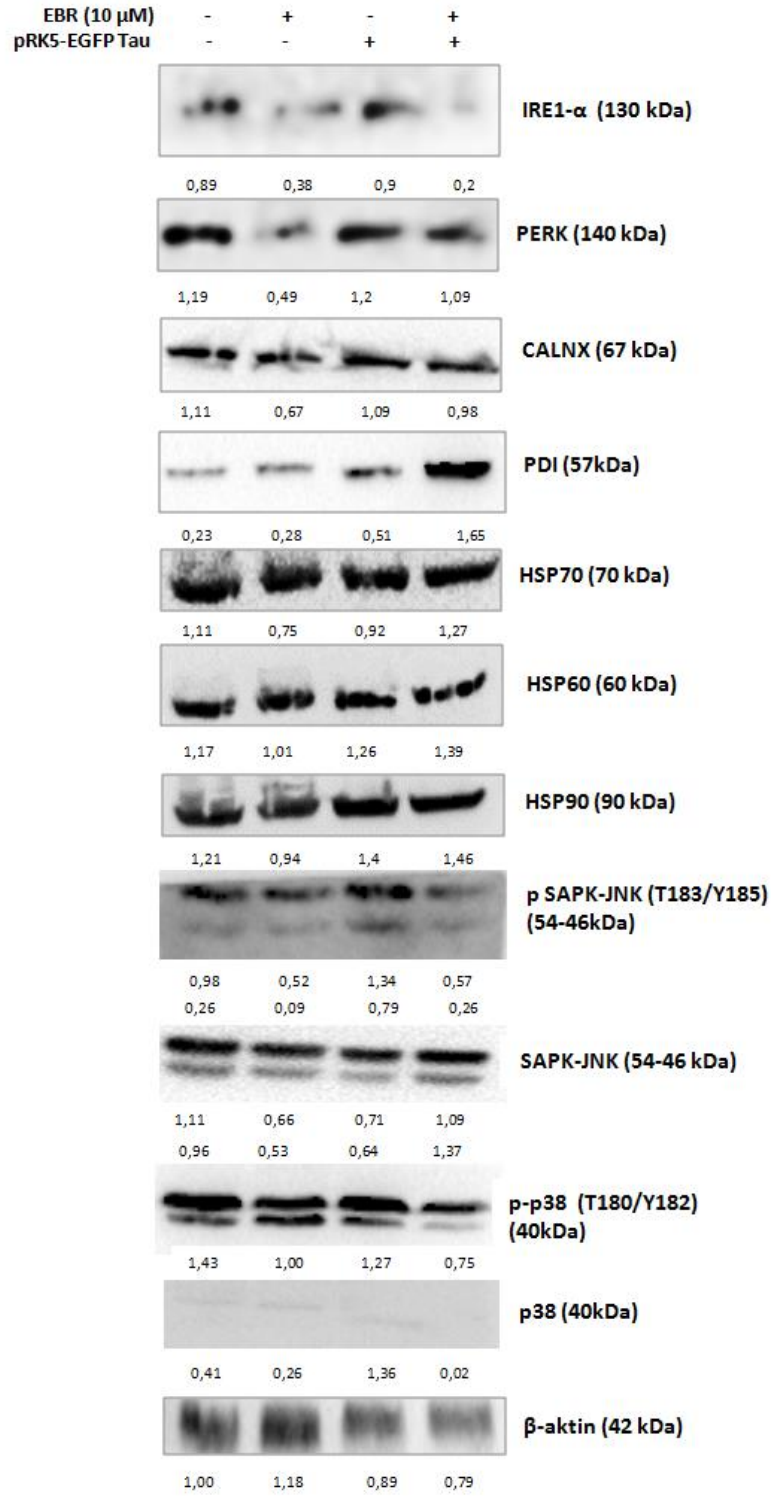
4.5.2 EBR Uygulamasının ER Stresi ve Moleküler Şaperonlar Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μM EBR'nin ER stresi ilişkili proteinler ve moleküler şaperonlar üzerindeki etkisi

immunoblotlama ile gösterilmiştir. ER stres sensör proteinlerinden olan IRE1 α 'nın anlatımının; 10 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre büyük oranda azaldığı, taupati modelinde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ilaç uygulanmayan hücrelere kıyasla büyük ölçüde azaldığı gözlenmiştir. ER stres sensör proteinlerinden olan PERK'in anlatımının; 10 μ M EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre büyük oranda azaldığı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ilaç uygulanmamış gruba göre oldukça düşük oranda azaldığı gösterilmiştir. Ca⁺² bağımlı çalışan ER şaperon proteinlerinden CALNX'in anlatımının kontrol grubuna göre 10 μ M EBR uygulaması ile belirgin şekilde azaldığı, taupati modelinde önemli bir değişiklik olmadığı, taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ise düşük oldukça düşük oranda azaldığı gözlenmiştir. ER şaperon proteinlerinden PDI'nın anlatımının kontrol grubundan sonra sırasıyla 10 μ M EBR uygulanması ile oldukça düşük oranda arttığı, taupati modeli oluşturulması ile belirgin şekilde arttığı, 10 μ M EBR uygulanması ile ise oldukça yüksek oranda arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.21).

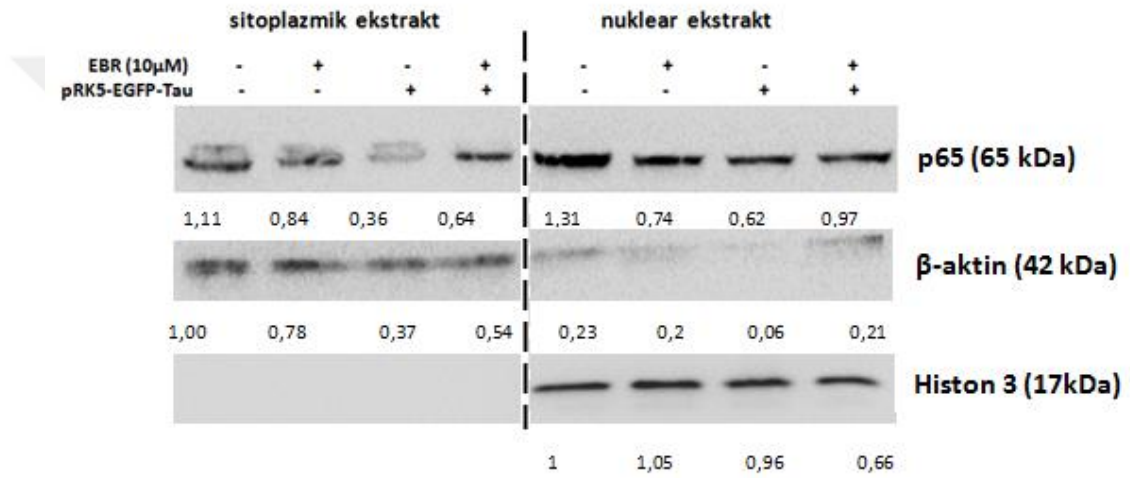
ER stres ile ilişkili olarak ERAD sisteminde UPS'de ya da sitoplazmada, biriken proteinlerin UPS, CMA ve makrotofaji ile yıkımında önemli rol oynayan HSP90 şaperon sistemine ait proteinlerin anlatımı da immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. NH gelişiminde pozitif etkili olduğu düşünülen HSP90 anlatımının 10 μ M EBR uygulaması ile azaldığı, taupati modelinde kontrol grubuna kıyasla arttığı, ancak bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. NH gelişiminde negatif etkisi olduğu düşünülen HSP70 anlatımının ise 10 μ M EBR uygulanması ve taupati modelinde kontrol grubuna göre azaldığı, ancak taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ilaç uygulanmamış gruba kıyasla artarak kontrol seviyesinin üzerine çıktığı gösterilmiştir. Daha çok mitokondride bulunan ve protein birikimini engelleyen HSP60 anlatımında yapılan uygulamalar ile önemli bir değişiklik gözlenmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte taupati modelinde düşük oranda anlatımı artmış, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile de bu artış devam etmiştir (Şekil 4.21).

UPR 'da özellikle IRE1 α aktivasyonu ile tetiklenen p38 ve SAPK/JNK 'nin anlatımları ve aktive edici fosforilasyonlarında gösterilmiştir. Buna göre SAPK anlatımının 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı, buna karşın taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulaması ile yeniden arttığı gözlenmiştir. SAPK'nin aktive edici fosforilasyonunun kontrol grubuna göre; 10 μ M EBR uygulaması ile anlatımı ile uyumlu olacak şekilde azaldığı, ancak taupati modelinde anlatımı ile zıt şekilde belirgin şekilde arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile de anlatımına zıt şekilde oldukça belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. JNK'nın anlatımı ise SAPK'ye benzer şekilde 10 μ M EBR uygulaması ve taupati modelinde kontrol grubuna göre azalmış, bununla birlikte taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile belirgin şekilde artarak kontrol seviyesinde oldukça üzerinde çıktığı gözlenmiştir. Buna karşın JNK'nın aktive edici fosforilasyonunun 10 μ M EBR uygulaması ile anlatımı ile uyumlu olarak azaldığı, ancak taupati modelinde anlatımı ile zıt şekilde oldukça belirgin şekilde tetiklendiği, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile ise anlatımına zıt şekilde azalarak kontrol seviyesine çekildiği gösterilmiştir. p38'in anlatımının 10 μ M EBR uygulaması ile kontrol grubuna göre azaldığı, taupati modelinde ise belirgin şekilde arttığı, ancak taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile oldukça belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. p38'in aktive edici fosforilasyonunun 10 μ M EBR uygulanması ile anlatımı ile uyumlu bir şekilde azaldığı, buna karşın taupati modelinde anlatımına zıt şekilde önemli bir değişiklik olmadığı, ancak bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile anlatımına göre daha düşük oranda azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21 Taupati modeli PC12 hücrelerinde EBR'nin ER stresi ve moleküler şaperon sistemleri üzerindeki etkisinin immünoiblottama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β - aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

mTORC2, Akt, TNFR sinyal yolları haricinde UPR cevabında da aktive olan NFκB'nin aktif Tf rolü oynayan p65 alt ünitesinin taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μM EBR uygulanmasında ER stresi ile ilişkili olarak nuklear göçü, nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu sonrası elde edilen ekstraktların immünoblotlama analizi ile gösterilmiştir. 10 μM EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre nuklear göçü azalan NFκB p65'in, taupati modelinde sitoplazmadan büyük ölçüde nukleusa göçtüğü, bu hücelere 10 μM EBR uygulanması ile ise nuklear göçün azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4. 22 Taupati modeli PC12 hücrelerinde EBR'nin ER stres ile ilişkili olarak NFκB p65'in nuklear göçüne olan etkisinin nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu ve immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μM EBR kullanılmıştır. Yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ekstraktta β-aktin, nuklear ekstraktta H3 kullanılmıştır.

Bu bölümden çıkarılabilecek genel sonuçlar; taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde ER stresinin tetiklendiği, bu hücelere EBR uygulanması ile ER stresin özellikle erken evresinde aktive olan bileşenlerinin geri çekildiği ancak UPR'ı gösteren bazı bileşenlerin halen gözlendiğidir.

4.6 EBR'İN TAUPATI MODELİ PC12 HÜCRELERİNDE OTOFAJİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

4.6.1 EBR'nin Taupati Modeli PC12 Hücrelerinde Otofaji ile İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkisinin İmmünoyblotlama ile Gösterilmesi

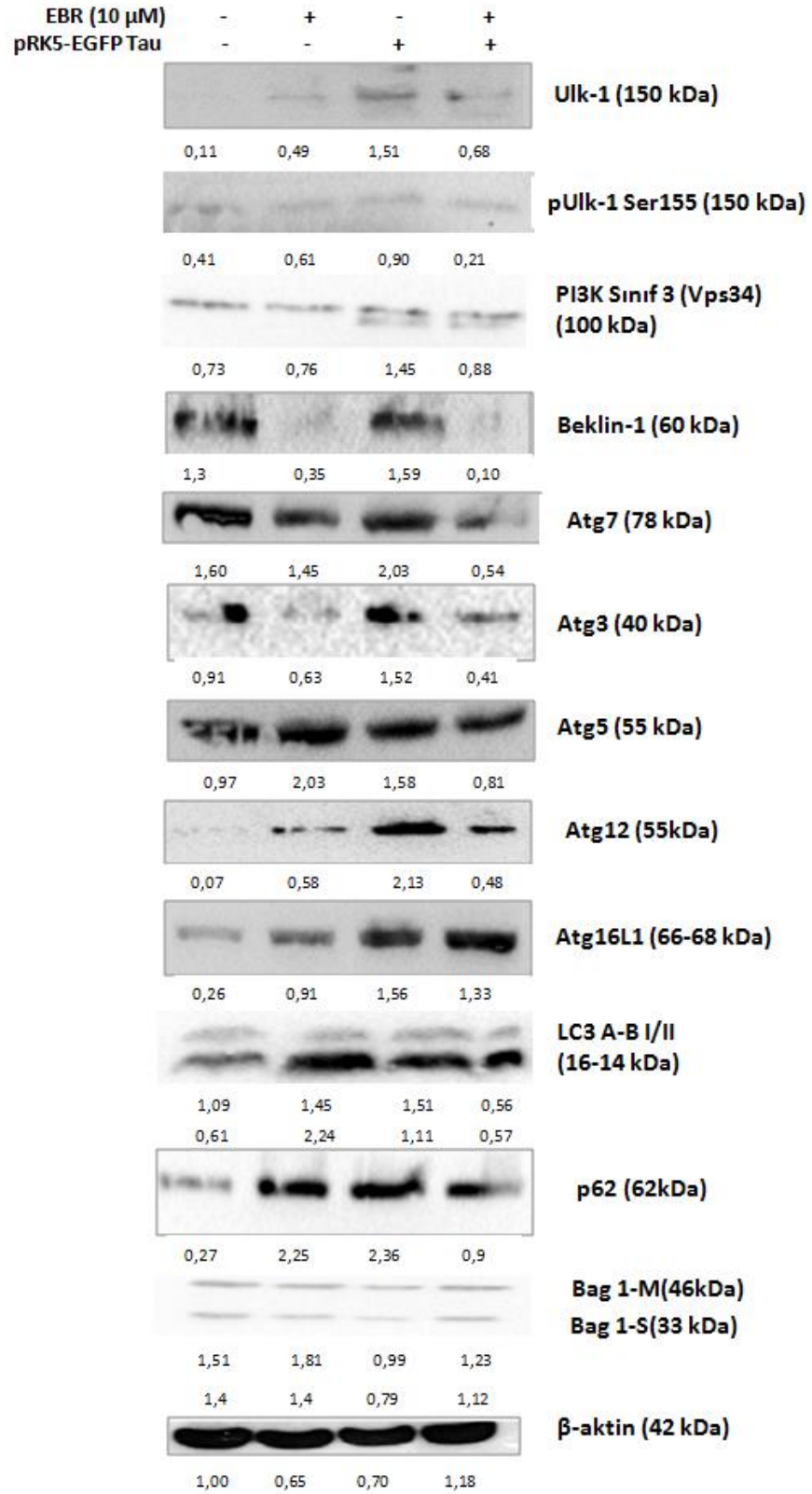
10 µM EBR uygulamasının taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış hücrelerde otofaji ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immünoyblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Otofajinin tetiklenmesinde önemli rol oynayan ULK1 Ser/Thr kinaz'ın anlatımının; 10 µM EBR uygulanması ile kontrol grubuna kıyasla arttığı, taupati modelinde bu artışın daha fazla olduğu, taupati modeli hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile tekrar azaldığı gösterilmiştir. ULK1'in AMPK tarafından uğradığı aktive edici Ser 555 fosforilasyonu seviyesinin; ULK1 anlatımı düşük olmakla birlikte kontrol grubunda düşük olmadığı, 10 µM EBR uygulanması ile anlatımına göre düşük oranda arttığı, taupati modelinde arttığı ancak ULK1 anlatımının yüksek olmasına rağmen anlatımına göre düşük oranda yükseldiği, bu hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile ise anlatımına göre azalarak kontrol grubunun gerisine düştüğü gösterilmiştir. Otofajiyi tetikleyen ULK1 kompleksi tarafından fosforile edilerek PAS'ta birikerek otofajik vesikülün çekirdeklenmesini sağlayan Vps34 kompleksinde bulunan; PI3K sınıf 3 ailesinden Vps34'ün anlatımının 10 µM EBR uygulanması ile önemli bir değişiklik olmadığı, taupati modelinde belirgin şekilde arttığı, bu hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile de yaklaşık kontrol grubu seviyesine geri çekildiği, Beklin1'in anlatımının ise 10 µM EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı, taupati modelinde kontrol grubuna göre düşük oranda arttığı, ancak bu hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile belirgin şekilde azalarak kontrol grubu seviyesinin gerisine düştüğü gösterilmiştir (Şekil 4.23).

Vps34 tarafından baş grupları fosforile edilen çekirdeklenen otofagozom membranındaki fosfotidil inositollerde biriken Ub-benzeri konjugasyon sistemi üyelerinden olan ve LC3-I'in Ub benzeri modifikasyonunu sağlayan enzimlerden ATG7'nin anlatımının; 10 µM EBR uygulanması ile kontrol grubuna göre düşük oranda azaldığı, taupati modelinde kontrol grubuna göre belirgin biçimde arttığı, bu hücrelere 10 µM uygulanması ile ise belirgin biçimde azalarak kontrol grubunun gerisine düştüğü gösterilmiştir. LC3-I'in Ub benzeri modifikasyonun sağlayan enzimlerden ATG3'ün anlatımının ise; 10 µM EBR uygulanması ile kontrol grubuna

göre belirgin biçimde azaldığı, taupati modelinde kontrol grubuna göre belirgin biçimde arttığı, bu hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile ise belirgin bir şekilde azalarak kontrol grubunun gerisine düştüğü gösterilmiştir (Şekil 4.23).

LC3-I'in lipidasyonunu sağlayan Ub-benzeri konjugasyon sistemi üyelerinden ATG5'in anlatımının 10 µM EBR uygulaması ve taupati modelinde belirgin biçimde arttığı, taupati modeli hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile ise kontrol grubunun gerisine düştüğü; ATG12'nin anlatımının ise 10 µM EBR uygulanması ve özellikle de taupati modelinde kontrol grubuna göre belirgin biçimde arttığı, taupati modeli hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile tekrar azaldığı gösterilmiştir. ATG5 ve ATG12'nin LC3-I ile etkileşimini sağlayan ATG16L1'in anlatımının ise kontrol grubuna göre sırasıyla 10 µM EBR uygulanması ve özellikle taupati modeli oluşturulması ile belirgin biçimde arttığı, taupati modeli hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile ise düşük oranda azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.23).

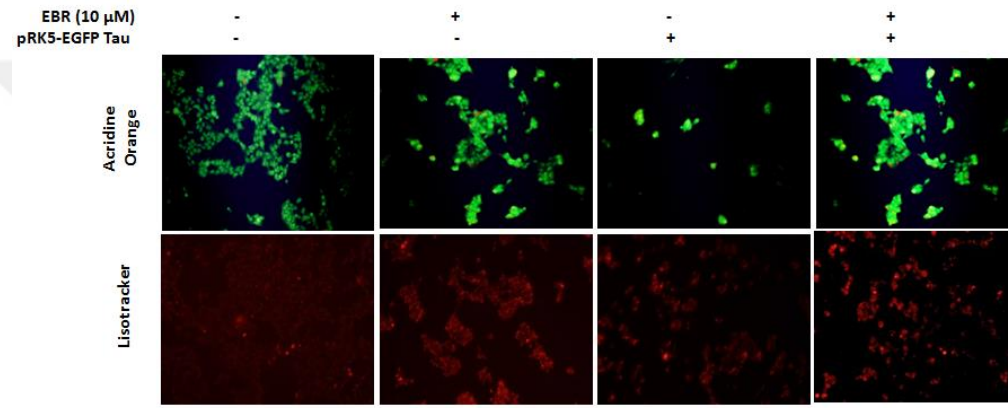
ATG5/12 ve ATG3/ATG7 konjugasyon sistemleri ile modifiye edilen LC3A/B-I'in LC3 A/B-II'yi oluşturması, otofagozom membranının tamamlanmasını ifade etmektedir. 10 µM EBR uygulanması ile yüksek oranda, taupati modelinde düşük oranda ve taupati modeli hücrelere 10 µM EBR uygulanması ile yüksek oranda LC3A/B-II:LC3A/B-I oranının kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. TRAF6'nun K63-bağlantılı poli-Ub ile NFκB'nin aktivasyonunu ve seçici otofajide Ub'lenerek işaretlenen kargonun özgül otofaji reseptörü aracılığı ile otogafozom membranına bağlanmasını sağlayan Ub bağlanma proteini p62'nin seviyesinin azalması, otofagolizozomlarda kargonun yıkıldığını göstermektedir. 10 µM EBR uygulanması ve özellikle de taupati modelinde kontrol grubuna kıyasla anlatımının belirgin şekilde arttığı gözlenen p62 seviyesinin taupati modeline 10 µM EBR uygulanması ile belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Tau'nun CMA' da yıkılmasını engelleyerek proteozom sisteminde yıkılmasını tetiklediği belirtilen Bag1'in orta (M) ve küçük (S) izoformlarının anlatımlarında; 10 µM EBR uygulaması ile önemli bir değişiklik olmadığı, taupati modelinde belirgin şekilde azaldığı, buna karşın taupati modeline 10 µM EBR uygulanması ile tekrar belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin otofaji ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoiblottama yöntemi ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β - aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

4.6.2 EBR'nin Taupati Modeli PC12 Hücrelerinde Otofajiye Olan Etkisinin Fluoresan Boyamalar ile Gösterilmesi

Taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR'nin otofaji üzerindeki etkisinin mikroskopik olarak gösterilebilmesi için Lysotracker ve Acridine Orange boyaları kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre kontrol grubunda hücre yoğunluğuna göre düşük gözlenen lizozomal aktivitesi yüksek hücre sayısının; 10 μ M EBR uygulanması ile arttığı, taupati modelinde kontrol grubuna göre arttığı, taupati modeli hücrelere 10 μ m EBR uygulanması ile ise en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4. 24 Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR'nin otofaji üzerindeki etkisinin fluoresan boyamaları ile gösterilmesi. Deneylerde 10 μ M EBR uygulanmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

Bu bölümden çıkarılacak genel sonuçlar; yalnızca EBR uygulamasının otofajiyi tetiklediği, ayrıca taupati modelinde de otofajinin tetiklendiği, ancak bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması durumunda lizozomal aktivitenin daha fazla olduğudur.

5 TARTIŞMA

NH'ler çoğunlukla proteinopati sınıfı hastalıklardır. Protein agregasyonları genellikle; çeşitli mutasyonlar veya SNP'ler aracılı amino asit değişiklikleri nedeniyle proteinlerin katlanma sürecinde kararlılığın sağlanabileceği düşük enerji seviyesine inerken ara bir enerji seviyesinde kalmaları sonucu oluşmaktadır. Bununla birlikte üç boyutlu yapılarını kazanmış proteinlerde de çeşitli post-translasyonel modifikasyonların gerçekleşmesi suda çözünmeyen protein agregatlarının oluşmasına yol açabilmektedir. Tüm bunlar göze alındığında protein agregasyonları; birikim gösteren proteinin kendi gen düzeyindeki anormalliklerin yanı sıra, hücrede bu proteinlerin düzenlenmesinde rol oynayan diğer yapılardaki anormal işlevsel özelliklerin oluşması nedeniyle de gerçekleşebilmektedir. Demansın en sık gözlenen çeşidi olan ve beyinin temporo-parietal bölgesini etkileyen AH'nin patolojisinde diğer NH'ler gibi hücre içerisinde tau ve/veya farklı olarak hücre dışarısında biriken A β protein agregatları önemlidir (Bertram ve Tanzi 2005; Erkinen ve ark, 2018).

Hücre ölümü çok hücreli organizmaların gelişimi, homeostasisi ve immün düzenlenmesi açısından önemli bir süreçtir. Hücre ölümünün düzenlenememesi pek çok patolojik süreç ile ilişkilidir. Çeşitli mutasyonlar, oksidatif hasar veya post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle yanlış katlanmış proteinlerin HSP'ler gibi şaperon proteinler tarafından doğal yapılarını kazanmaları ya da UPS veya otofaji hücrel dönüşüm sistemleri tarafından degrade edilmeleri gerekmektedir. Bu aşamaların yetersiz kalması durumunda hücre içerisinde veya dışında oluşan protein agregatları kaynaklı toksisiteler ya da bu proteinlerin doğal yapılarının kendi görevlerini yapabilmelerinin sınırlanması nedeniyle bozulan homeostasis sonucu hücre ölümünün fazla oranda gerçekleşmesi söz konusudur. Bu durum NH'lerin gelişiminin genel şemasıdır. NH çeşitlerinden olan çoklu skleroz' unda dahil olduğu otoimmün hastalıklarda immün sistem elemanlarının vücudun sağlıklı hücrelerine karşı gerçekleştirdikleri ölüm mekanizmaları söz konusudur. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile birlikte AH ve PH gibi proteinopatilerinde nöroinflamasyon ile ilişkili

olarak otoimmün hastalık kategorisinde değerlendirilmesi söz konusudur (Fulda ve ark., 2010; Gorman, 2008; Sardi ve ark, 2011).

AH genellikle sporadik, nadiren ise ailesel kökenli bir hastalıktır. Gelişiminde APP, PSEN1/2 ve APOE'de dahil yaklaşık 20 genin direkt risk faktörü olduğu, ayrıca yapılan GWAS çalışmaları ile daha pek çok gendeki polimorfizmlerin de AH patogenezinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. AH gelişimi ile ilgili ileri sürülen başlıca hipotezler; kolinerjik hipotez, amiloid teorisi, tau teorisi, mitokondriyal hipotez, oksidatif stres hipotezi, glutamat nörotoksitesi hipotezi, metal dengesizliği hipotezi, inflamatuvar hipotez, mikroorganizma infeksiyon hipotezi, vaskular hipotez ve metabolik hipotezdir (Bertram ve Tanzi 2005; Khanahmadi ve ark, 2015; Mendiola-Precoma ve ark, 2016).

MSS'nin immun sistem elemanları olan astrositlerden APOE aracılığı ile taşınan kolesterol ve fosfolipidler, nöronların yüzeyindeki APOE reseptörleri tarafından tanınarak endosite edilmektedir. Ayrıca bu reseptörlerden bazılarının sinyal iletiminden sorumlu oldukları bilinmektedir. Hayvansal steroid türevlerinden olan kolesterolün beyindeki homeostatisinin bozulmasının; AH, hungtington hastalığı, PH, Niemann-Pick tip C ve Smith-Lemli Opitz sendromu da dahil olmak üzere kronik NH'lere yol açabileceği gösterilmiştir. Örneğin; 24-OHC ve 27-OHC'nin AH biyobelirteci olarak kullanılmasının yanı sıra 22R-OHC seviyelerinin AH'li hastaların beyinlerinde azaldığı gösterilmiştir (Vance, 2012; Zarrouk ve ark, 2017).

Tau, MAPT geninden sentezlenen farklı izoformları ve pek çok farklı rolü olduğu bulunan bir mikrotübül bağlanma proteindir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda nuklear yerleşimli tau'nun DNA üzerindeki küçük oluklara bağlanan bir DNA bağlanma proteini olduğu keşfedilmiştir. Tau'nun RNA ile elektrostatik etkileşim kurması nedeniyle hücresel RNA bütünlüğünün korunmasına yardım ettiği ve bu etkileşimin tau birikimini tetikleyebileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Maina ve ark., 2016). MAPT üzerinde saptanan 80'den fazla mutasyonun ailesel erken başlangıçlı AH gelişiminde rolü olmadığı, ancak MAPT geninin AH gelişimi için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. P301L gibi ailesel MAPT mutasyonları, patolojisinin birincil olarak tau birikimi ile tetiklendiği FTDP-17, PSP ve CBD gibi birincil taupatiler olarak adlandırılan hastalıklara neden olabilmekle birlikte

taupatiler de çoğunlukla sporadik olarak gelişmektedir. Patolojisinde birincil etmenin A β birikimi olduğu belirtildiğinden AH ikincil taupati olarak adlandırılmaktadır Çünkü AH'de gözlenen NFT'lerin içeriğinde tau bulunduğu bilinmektedir Hiperfosforilasyon, asetilasyon, Ub veya kesilim gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonların sonucunda mikrotübüllerden serbestlenen tau'nun dentritlerde ve sinaptik alanlarda yanlış lokalizasyonu veya birikimi çeşitli işlev kayıplarına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Matarin ve ark, 2015; Wang ve Mandelkow 2016).

AH'de gözlenen A β oligomerleri; IR, NGFR, PrPc, mGluR5, EphA4, EphB2, NMDAR ve Frizzled gibi olası sinaptik reseptörlere, lipid sallarına veya iyon kanallarına bağlanarak tau, α -syn ve NF'yi fosforile edenler de dahil olmak üzere çeşitli kinazların ya da Kaspaz 3 ve Kapainler gibi proteazların anormal aktivasyonuna neden olabilmektedir. Ayrıca A β oligomerlerinin inflamasyonu tetikleyerek, direkt etkileşim veya UPS ya da otofajinin inhibe olması yoluyla da diğer protein birikimlerini tetikleyebileceği gösterilmiştir. Sonuçta lewy cisimcikleri ve NFT'ler gibi protein agregatları oluşmaktadır. GSK3, CDK-5, p44/42, p38, JNK gibi tau kinazlarının artan aktivitelerinin tau'nun anormal fosforilasyonu ile yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu kinazların hücrede önemli sinyal yollarında, otofaji ve UPS'de, ER stresinde, hücre devri, hücre büyümesi, hücre sağkalımı ve hücrenin stres cevabı gibi önemli işlevleri bulunmaktadır (Marsh ve Blurton-Jones 2012; Miller ve ark, 2014; Tenreiro ve ark, 2014; Wray ve Noble 2009)

AH ile ilgili farmakolojik veya farmakolojik olmayan pek çok önleyici ya da tedavisel yaklaşım bulunmaktadır. Örneğin egzersiz, mental güçlülük, enerji kısıtlaması ve sosyalleşme hayat tarzı ile ilgili önleyici unsurlar olarak nitelendirilmektedir. Diyet; flavanoidler, probiyotikler, vitamin D/E/C, folat, beta-kompleksler, luteolin ve düşük miktarda kırmızı şarap alımının da AH'ye karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmektedir. Hastalığa karşı farmakolojik yaklaşımlar ise; semptomik ve etiyolojiye bağlı yaklaşımlar olarak ikiye ayrılabilir. Semptomik yaklaşımlar faz çalışmaları devam eden; AChE inhibitörleri, NMDA antagonistleri, muskarinik ve nikotinik Ach reseptör antagonistleri, 5-HT₆ Serotonin reseptörü inhibitörleri ve histamin reseptörü (H₃) antagonistleri olarak belirtilmektedir. Etiyolojiye bağlı yaklaşımlar ise; sekretaz inhibitörleri, A β bağlayıcıları ve A β

agregasyon inhibitörleri (örneğin antikorlar), tau terapileri, intranasal insülin tedavisi, LDL'yi hedefleyen statinler, tip-II diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar, anti-inflamatuvar ilaçlar olarak belirtilmektedir (Frezza ve ark, 2018; Ghanemi, 2015; Mendiola-Precoma ve ark, 2016). AH tedavisinde yeni bir yaklaşım ise mitokondri enerji metabolizmasının hedeflenmesidir (Hroudová ve ark, 2016). Cummings ve ark. (2017)'nin derleme çalışmasına göre 2017 yılında halihazırda AH ile ilgili faz-III çalışmaları devam eden 28 ajanın; % 32'si nörotransmitterler, % 21'i anti-amiloid immunoterapi, % 18'i anti-amiloid ve BACE inhibitörleri, % 14'ü anti-amiloid agregasyon, % 11'i metabolik ve % 4'ü anti-tau ilişkilidir (Cummings ve ark., 2017). A β ile ilgili bir strateji de oligomerlerin bağlandığı düşünülen reseptörlerin hedeflenmesidir (Beraldo ve ark, 2016; Izzo ve ark, 2014).

Taupatilerde ve AH'de tau'yu hedefleyen olası stratejiler; siRNA veya miRNA kullanımı ile tau sentezinin inhibe edilmesi, kinaz inhibitörleri ve fosfataz aktivatörlerinin kullanımı, bazı şaperonların inhibe edilmesi, tau spesifik antikorlar ve agregasyon inhibitörlerinin, proteozom ya da otofaji tetikleyicilerinin ve mikrotübül stabilizatörlerinin kullanımınıdır. Tau kinaz inhibitörlerinin kullanımı stratejisi genellikle GSK3, CDK5 ve MARK kinazlarını hedeflemektedir (Bulic ve ark, 2010; Wang ve Mandelkow 2016; Wischik ve ark, 2014). Bununla birlikte yapılan çeşitli çalışmalar melatonin'in Ser/Thr fosfataz aktivitesini düzenleyerek NH'ler için terapötik bir yaklaşım olabileceğini öngörmektedir (Arribas ve ark, 2018).

Klinik öncesi çalışmaları devam eden LiCl ve Sodyum Valproat, potansiyel GSK3 inhibitörlerindedir. ROSC ise bir başka tau kinazı olan CDK5'i hedeflemektedir (Desai ve Chand 2009). Bununla birlikte Hu ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada A β oligomerleri ile AH modeli oluşturulan farelerde potansiyel GSK3 inhibitörleri LiCl ve özellikle de SB216763'ün kullanımının nörokoyucu etkileri gözlenmiş, bununla birlikte kontrol grubu hayvanlarda LiCl veya SB216763'ün tek başına kullanımlarının nörodejeneratif belirteçlerin ve bilişsel bozuklukları tetiklediği gösterilmiştir (Hu ve ark, 2009). Bununla birlikte LiCl ile ROSC'in GSK3 ve CDK5'in yanı sıra diğer pek çok kinaz ve önemli işlevdeki enzimleri inhibe ettiği literatürdeki pek çok çalışmada gösterilmiştir (Freland ve Beaulieu, 2012). Bu

nedenle AH ve taupatilerde; toksisitesi düşük, BBB'den geçebilen yeni potansiyel bileşenlerin GSK3 inhibitörü olarak kullanımı önem kazanmaktadır.

EBR ; BR sınıfından, yapısal olarak hayvansal steroid hormonlarımıza benzeyen bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Laboratuvarlarımızda yapılan pek çok çalışmada EBR'nin anti-tümör etkisi gösterilmiş olmakla birlikte literatürdeki az sayıdaki çalışmalarda da BR türevlerinin ve özellikle EBR'nin nörokoruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Carange ve ark, 2011; Koppula ve ark, 2012). Laboratuvarlarımızda yapılan Utku Özbey (2016) yüksek lisans tez çalışması kapsamında doğal tip ve p53 nakavt HCT116 kolon kanseri hücrelerinde 72 saat 30 µM EBR uygulamasının kontrol grubuna göre GSK3β Ser9 fosforilasyonunu anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir. Benzer şekilde Shafag Nahmadova (2016) yüksek lisans tez çalışmasında doğal tip SK-N-AS hücrelerinde 24 saat, 1 µM ve 10 µM EBR uygulamalarının kontrol grubuna göre GSK3β Ser9 fosforilasyonlarını belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir. Ayrıca COST aksiyonu kapsamında laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda *in vivo* AH modeli *C.elengans* 'larda EBR'nin sağkalımı potansiyel GSK3 inhibitörü LiCI ya da potansiyel CDK5 inhibitörü ROSC'e göre anlamlı biçimde arttırdığı ve toksisitesinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Daha sonra laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda insan 2N4R tau geni içeren pRK-EGFP-Tau veya FTDP-17'yi temsil eden pRK-EGFP-Tau P301L vektörleri aktarılmış ya da aktarılmamış HEK293, SH-SY5Y ve PC12 hücrelerinde EBR'nin nörokoruyucu potansiyeli gösterilmiştir.

Yapılan literatür taraması sonucunda EBR'nin taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde nörokoyucu etkinliğini irdeleyen bir yayına rastlanmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında nöral-benzeri hücre hattı olan PC12'ye pRK-EGFP-Tau vektörleri aktarılması ile taupati modeli elde edilmesi, ardından EBR'nin uygun dozlarında olası nörokoyucu etkinliğinin hücre sağkalımı, ER stres ve otofaji ile ilişkili olarak gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle ilk olarak PC12 hücrelerinde doza bağlı EBR uygulanması ile yapılan MTT analizinde (Şekil 4.1) laboratuvarlarımızda yapılan diğer çalışmalarda kullanılan doğal tip nöral-benzeri hücre hatları HEK293, SK-N-AS ve SH-SY5Y ile benzer doza bağlı canlılık verileri elde edilmiştir.

AH'li bireylerde CSF tabanlı yapılan bir biyobelirteç çalışmasında; total tau'nun nörodejeratif etkinliğinin A β patolojisi varlığı ile paralellik gösterdiği, bununla birlikte NF-L'nin A β varlığı ile paralellik göstermediği belirlenmiştir (Mattsson ve ark, 2016). Ancak yapılan bazı çalışmalarda; NFT'ler ve senil plaklarda NF'lerin varlığına rastlanmıştır, AH'de NF anlatımının değiştiği belirlenmiş, senil plaklarda rastlanan NF-L'lerde yeni fosforilasyon bölgeleri keşfedilmiştir. Ayrıca p-tau ve p-NF birikimleri ile PTEN dağılımı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Liu, 2011). Ly ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, GSK3 β inhibisyonunun NF- κ B sinyali aracılığı ile BACE1 anlatımını ve buna bağlı olarak AH fenotipini baskıladığını *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermiştir (Ly ve ark, 2013). Bununla ilişkili olarak Parr ve ark (2015) yaptıkları çalışmada; Wnt sinyal yolağı aktivasyonu ile GSK3 inhibisyonunun β -katenin'in nuklear göçünü tetikleyerek BACE-1 anlatımını baskıladığını, GSK3 aktivasyonu sonucunda ise BACE-1 anlatımı ve aktivitesinin artarak APP'nin amiloidojenik kesilimini tetiklediğini göstermişlerdir (Parr ve ark, 2015).

Belirtilen literatür çalışmaları ile paralel olarak bu tez çalışması kapsamında yapılan EBR'nin doza bağlı (0-30 μ M) uygulanması ile gerçekleştirilen MTT analizinde (Şekil 4.1) hücre canlılığını görece düşük ve orta derecede anlamlı olarak azalttığı gösterilen 1 ve 10 μ M ile hücre canlılığını daha yüksek oranda anlamlı biçimde azalttığı gösterilen 20 μ M EBR dozları karşılaştırılmalı olarak kullanılarak doğal tip PC12 hücrelerinde yapılan immunoblotlama analizlerinde özellikle 10 μ M EBR uygulamasının; anlatımları fazla olması durumunda nörotoksositeye neden olan APP, CDK5, GSK3 α/β anlatımlarını azalttığı, nörotoksiteyi tetikleyen tau Ser 202 fosforilasyonunu azalttığı, aktivasyonu genellikle hücre sağkalımını baskılayıcı yönde olan GSK3 α inhibisyonunu arttırdığı, bütünlüğü önem ihtiva eden NF-L ve β -katenin'in seviyelerini arttırdığı ve sağkalımı tetikleyen β -katenin'in nuklear göçünü teşvik ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.2). Bununla birlikte 1 μ M EBR uygulamasının CDK5 anlatımını 10 μ M' a göre daha efektif bir şekilde geri çektiği ve BACE anlatımını da azalttığı gösterilmiştir. Buna karşın EBR'nin tek başına kullanımının özellikle 20 μ M'da ROS, DNA kırıkları ve hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.3). Benzer şekilde MTT analizlerinde de EBR' nin tek başına kullanımının doğal tip hücrelerde ölümü tetiklediği gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu durum LiCl vb. potansiyel GSK3 inhibitörlerinin yan etkilerini gösteren çalışmalar ile paralellik

gösterse de kullanılan doz önem arz etmektedir. Bu immunoblotlama sonuçları laboratuvarlarımızda yapılan ilgili diğer çalışmalarda EBR'nin uygulandığı nöron-benzeri doğal tip SK-N-AS ve HEK293 hücre hatlarından elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Ancak akış sitometresi analizlerinde EBR'nin tek başına kullanımının hücre devri fazları üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak anlamsız olduğunun (Şekil 4.6) ve hücre ölümünü tetiklemediğinin (Şekil 4.9) gösterilmesi, ayrıca 10 μ M EBR ve 10 μ M LiCl'ün zamana bağlı kullanıldığı hücre sağkalımı analizlerinde (Şekil 4.8) de ana stok DMSO oranı daha düşük olmasına karşın LiCl'ün toksik gelmesi, EBR kullanımının ise hücre sağkalımını etkilemediğinin gözlenmesi de düşük dozdaki EBR'nin sağlıklı hücreler üzerinde önemli bir etkinliği olmadığını ifade etmektedir. Deneyler arasındaki düşük doz EBR'nin sağlıklı hücreler üzerindeki etkinliğindeki farklılıkların, deney prosedürüne göre bağlanış hücre yoğunluklarının farklı olmasından ileri geliyor olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çoğu çalışma ekstrasellüler A β 'nin tau birikimini tetiklediğini gösterse de, Takahashi ve ark.(2015); 4R1N/3R1N tau ve APP transfekte edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin ekstrasellüler tau fibrilleri ile muamele edilmesi sonucu intrasellüler tau birikimin arttığını, APP'nin ekstrasellüler domainlerinin ortadan kaldırılması ile bu birikimin azaldığını göstermişlerdir (Takahashi ve ark, 2015). Bu durumda APP'nin ekstrasellüler tau'nun hücre içine alınmasında önemli olduğu sonucuna ulaşılmış ve bunun hücreler arası tau iletiminde önemli olduğu belirtilmiştir. Thompson ve ark (2018)'nin yaptıkları çalışmada, birincil olarak prion patolojisi olan ikincil taupati sınıfındaki Creutzfeldt-Jakop hastalarının serumlarında tau ve NF-L konsantrasyonlarının yüksek oranda arttığı ve tau konsantrasyonundaki artışın hastalığın ilerlemesi ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Thompson ve ark, 2018).

Povellato ve ark. (2014), *Drosophila melanogaster* modellerinde yaptıkları çalışmada; tau' nun GSK3 β tarafından fosforilasyonunun *Drosophila melanogaster*'in görsel sistemi için toksik etki gösterdiği, buna karşın Ser404 fosforilasyonunun ise koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (Povellato ve ark., 2014). Glokom veya diğer adıyla göz tansiyonu, AH ile benzer olarak yaşla ilişkili NH'lerden birisidir. Chiasseu ve ark (2016), retinal gangliyon hücreleri (RGC) ile yaptıkları çalışmada, yaşla birlikte gelişen oküler hipertansiyonu ile retinal tau'nun; anlatımını arttırdığının, fosforilasyon seviyesinin değiştiğinin ve yanlış lokalizasyonunun tetiklediğinin,

böylelikle RGC ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Bu bağlamda tau, RGC kaybı ile glokom ve ilişkili hastalıklarda yeni bir hedef haline gelmiştir (Chiasseu ve ark, 2016). Stamer ve ark (2002) yaptıkları çalışmada; birincil kortikal nöronlar, RGC ve nöroblastoma hücrelerinde tau anlatımının arttırılmasının mikrotübül motor proteini olan kinesine bağımlı olarak organel, NF ya da APP içerikli vesiküllerin akson ve dentritlere taşınımını inhibe ederek hücre gövdesinde birikmelerini tetiklediği, peroksizom taşınımının engellenmesi ile de oksidatif stresi tetiklediği gösterilmiştir (Stamer ve ark, 2002).

Badiola ve ark. (2011) sinükleopati modeli insan nöroglıyoma ve primer nöronal kültür hücrelerinde insan 2N4R tau anlatımının arttırılmasının α -syn birikimi ve toksisitesini arttırdığı gösterilmiştir (Badiola ve ark, 2011). Rao ve ark (2012) yaptıkları çalışmada dairesel dikroizm, etidyum bromür bağlanması ve termal denatürasyon tekniklerini kullanarak spesifik DNA bölgelerine bağlanan patolojik tau ya da α -syn'in gen ekspresyonlarını değiştirerek ya da gen anlatımlarını baskılayarak nöronal ölümü tetikleyebileceklerini göstermişlerdir (Rao ve ark, 2012). Castillo-Carranza ve ark (2018), E .coli'den izole edilen rekombinant 2N4R doğal tip tau ve α -syn ile yaptıkları agregasyon çalışmaları, aynı zamanda da PH ve PSP'li insanların beyinlerinden alınanan örnekler ile yaptıkları çalışmalar ile α -syn oligomerlerinin toksik tau suşlarının birikimini tetiklediklerini göstermişlerdir (Castillo-Carranzave ark., 2018). Oikawa ve ark. (2016); in vitro tau düzeneği, dot blot analizi ve in vitro olarak SH-SY5Y hücreleri ile yaptıkları deneylerde α -syn'in tau birikimini tetiklediğini ve mikrotübül iletimini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Oikawa ve ark, 2016). Sengupta ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, PH'li ve DLB'li bireylerin beyinlerinden α -syn-tau-hibrid oligomerlerini izole etmişlerdir (Sengupta ve ark, 2015).

Hoover ve ark. (2010), insan 4R0N tau 'nundoğal tip veya P301L mutant formlarını in vitro nöral kültür hücrelerine transfekte ederek veya bu genlerin anlatımını yapan fareler üreterek yaptıkları çalışmada özellikle P301L patolojik tau'nun; dendritik ağlardaki yanlış lokalizasyonu ile sinaptik fonksiyon bozukluklarını tetiklediğini, AMPA ve NMDA'in sinaptik anlatımlarına ket vurduğunu, taupati modeli oluşturulmuş farelerde ise Water Morris Maze ve elektrofizyoloji deneyleri ile bilişsel bozuklukların tetiklendiğini göstermişlerdir (Hoover ve ark, 2010). Cook ve

ark (2015) yaptıkları çalışmada; Adeno-ilişkili virüs serotip-1 aracılığı ile insan P301L-tau genini transfekte ettikleri fare modellerinde anormal fosforile ve Proteinaz-K'ya dirençli tau agregatlarının beraberinde nöral ölümden bağımsız olarak nöropatolojik, inflamatuvar ve bilişsel bozukluklar gözlemişlerdir (Cook ve ark, 2015). Bu çalışmayı destekler nitelikteki bir başka çalışmada ise Di ve ark. (2016), yapay olarak mutasyonlar ile yönlendirdikleri anormal fosforile patolojik insan tau ile transfekte edilmiş nöroblastoma hücre hatları ve transgenik fare modellerinde; nöronal ölümün tetiklendiğini, sinaps sayılarının azaldığını, mikroglia sayısının arttığını ve bilişsel bozuklukların tetiklendiğini göstermişlerdir (Di ve ark, 2016).

Khandelwal ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada, insan doğal tip -4R ve P301L mutant-4R tau içeren lentiviral vektörler sıçan motor korteksine stereotaksik enjeksiyon ile aktarılmıştır. P301L aktarımı yapılan hücrelerde Thr 181 ve Ser 262 bölgelerini de içeren tau hiperfosforilasyonu ve anormal agregasyon, ayrıca her iki vektörün aktarımı ile de GSK3 aktivitesinde ve PLK2 anlatımında artış, PP aktivitesinde düşüş, mikroglial değişiklikler ile proinflamatuvar sitokinler olan IL6 ve TNF α 'nın yüksek anlatımı olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte her iki vektörün aktarımı ile de α -syn anlatımının tetiklendiği ve Ser129 fosforilasyonunun arttığı, ancak APP ya da ALS ve FTD ile karakterize edilen transaktivatör Tat bağımlı RNA düzenleyici element (TAR) DNA bağlanma proteini (TDP43)'ün anlatımlarının değişmediği gösterilmiştir (Khandelwal ve ark, 2012).

pRK-EGFP-Tau aktarımı yapılmış PC12 hücrelerinde immunoblotlama yöntemi ile nörotoksiteyi tetikleyen; total tau seviyesinin ve fosforilasyonlarının, APP, p44/42, amiloid beta, APP amiloidojenik kesilimini tetikleyen BACE (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ile Şekil 4.16) ve pro-apoptotik proteinler Bak, Bad ve Bim'in anlatımlarının arttığı, nöronal ölümü işaret eden kaspaz-3 kesiliminin ve Apaf-1 kompleksi oluşumunun tetiklendiği, bununla birlikte hücre sağkalımını tetikleyen Bcl-2 anlatımının ve fPARP seviyesinin ise azaldığı (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13) gösterilmiştir. İmmunoblotlama sonuçlarını destekler şekilde fluoresan boyama ve hücre akış sitometresi sonuçlarında da ROS seviyesinin arttığı, mitokondri membran potansiyelinin düştüğü, nekrotik ve özellikle de apoptotik hücre sayısının arttığı (Şekil 4.6, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11), MTT ve hücre sağkalımı analizleri ile de göreceli hücre canlılığının ve hücre sağkalımının belirgin şekilde azaldığı (Şekil

4.7, Şekil 4.8) gösterilmiştir. Ayrıca laboratuvarımızda yapılan diğer çalışmalarda pRK5-EGFP-Tau aktarımı yapılmış SH-SY5Y hücrelerinde ve pRK5-EGFP-Tau P301L aktarılmış PC12 hücrelerinde de nörodejenerasyon ilişkili protein anlatımları ya da fosforilasyonlarının ve hücre ölümünün arttığı gösterilmesi, yaptığımız tez çalışmasındaki immunoblotlama, floresan ve hücre akış sitometresi verileri, belirtilen literatürlerdeki *in vitro* ve *in vivo* taupati modeli oluşturma modellerinde elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir.

Literatürdeki bazı çalışmalara (Khandelwal ve ark, 2012) zıt şekilde bizim sonuçlarımızda tau anlatımının artırılması ile APP seviyesindeki artışın gözlenmesi, buna karşın α -syn anlatımında önemli bir değişiklik gözlenmemesinin kullanılan hücre hatlarının farklı olması ve deneylerin *in vivo* ya da *in vitro* olarak başlatılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca belirtilen çalışmada ve diğer çalışmalarda tau anlatımının artması ile GSK3 aktivitesi ile α -syn fosforilasyon seviyelerinin ya da birikiminin artması, ancak yaptığımız deney düzeneklerinde GSK3 aktivitesi veya α -syn birikimini direkt olarak belirleyememiş olmamız nedeni ile elde edilen bulguların literatür ile kıyaslanması zorlaşmaktadır. Bunlardan yola çıkarak tau plazmidi aktarımından 24 saat sonra hücrelerde düşük oranda GSK3 inhibe edici fosforilasyonlarının gözlenmesinin artan GSK 3 aktivitesine karşı bir negatif geri beslenme mekanizması olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Bu durumda tau anlatımının artırılması ile daha erken süreçte artan GSK3 α/β aktiviteleri ve düşük olan inhibe edici fosforilasyon seviyeleri ile tetiklenen tau fosforilasyonunun ve BACE anlatımını artırarak APP'nin amiloidojenik kesilimini tetikleyerek hücre ölümünü tetiklediği sonucuna ulaşılabilir. Ayrıca taupati modelinde total seviyesinin düşük oranda azaldığı gözlenen ancak fosforilasyon düzeyi ve birikimini gösteremediğimiz, özellikle mitokondri için yüksek toksisite gösteren α -syn'in tau seviyesinin artması ile olası lewy cisimciği oluşumunu teşvik etme kapasitesinin artması veya tau birikimi ile aktive olan kinazlar aracılığı ile hücresel bütünlüğünün bozulduğu düşünülen ve seviyesinin düştüğü gösterilen NF-L'ninde (Şekil 4.4, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) hücre ölümüne katkıda bulunması olasıdır.

Bretteville ve ark. (2012), fare beyin dilimleri ve insan 3R-tau geni transfekte edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde hipotermi ile tetikledikleri tau hiperfosforilasyonuna

potansiyel GSK3 inhibitörleri LiCl ve ATP ile yarışmacı olarak bağlanan N-(4-Metoksibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) üre (AR-A014418)'in ya da potansiyel CDK5 inhibitörü ROSC'in etkilerini incelemişleridir. Sonuçta LiCl kullanımı ile; PHF oluşumu ve bazı tau fosforilasyon bölgelerinin anlamlı şekilde geri çekildiği, buna karşın inhibe edici GSK3 β Ser9 fosforilasyonunun ise anlamlı biçimde arttığı gösterilmiştir. GSK3'e özgüllüğü daha yüksek olarak inhibe eden AR-A014418'de PHF ve tau-hiperfosforilasyonlarını daha anlamlı şekilde geri çekildiği, ROSC kullanımı ile ise anlamlı bir değişiklik gözlenmediği belirlenmiştir (Bretteville ve ark, 2012). Literatürdeki bazı çalışmalarda EBR'nin *in vitro* PH modeli PC12 hücrelerinde antioksidant enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek nöral ölümü azalttığı gösterilmiş ve nörokoruyucu işlevinde steroid B halkasının ve yan zincirinin önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Carange ve ark, 2011; Ismaili ve ark, 2012; Koppula ve ark, 2012).

Yaptığımız tez çalışması kapsamında taupati modeli oluşturulan PC12 hücrelerine 1 ve 10 μ M EBR uygulanması ile laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda taupati modeli oluşturulmuş veya oluşturulmamış HEK293 ya da SH-SY5Y hücrelerinde potansiyel GSK3 inhibitörü LiCl'nin toksisitesi düşük veya hücre sağkalımını tetikleyici etkisi gözlenen 1 ve 10 μ M dozları 24 saat uygulanarak karşılaştırılmalı olarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta EBR ve LiCl'ün tek başına uygulanmasının 24 saatte benzer toksisite gösterdiği, ancak taupati modelinde EBR uygulaması ile hücre ölümünün daha etkin bir şekilde azaltıldığı gösterilmiştir (Şekil 4.7). Bununla birlikte 10 μ M EBR ve LiCl'ün karşılaştırmalı olarak zamana bağlı (0-72 saat) uygulandığı hücre sağkalımını analizinde LiCl'ün tek başına uygulanmasının toksik geldiği, taupati modelinde LiCl uygulamasının hücre sağkalımını arttırdığı ancak 24 saatten sonra toksik gelerek hücre sağkalımını kontrol grubunun gerisine düşürdüğü, taupati modelinde EBR uygulamasının ise hücre sağkalımını arttırdığı ve tek başına uygulanmasının toksik gelmediği gösterilmiştir (Şekil 4.8). Bununla paralel olarak laboratuvarlarımızda pRK5-EGFP-Tau transfekte edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat 10 μ M EBR ile LiCl'ün karşılaştırmalı olarak uygulanması sonucu elde edilen hücre akış sitometresi ve floresan mikroskobu sonuçlarında LiCl'ün toksisitesi gösterilmiş ve benzer şekilde taupati modelinde oluşan hücresel stres ilişkili bileşenleri ve hücre sağkalımının EBR uygulanması ile daha etkin bir şekilde geri çekildiği gösterilmiştir. Ayrıca laboratuvarlarımızda yapılan

çalışmalarda AH modeli ve kontrol grubu *C.elegans*' lara EBR ile karşılaştırmalı olarak LiCl ve potansiyel CDK5 inhibitörü ROSC uygulanması ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumda LiCl ve ROSC'in aksine EBR'nin hedefini ya da hedeflerini daha seçici bir mekanizma ile etkilediği ve hücresel toksisitesinin bu nedenle daha düşük olduğu düşünülmektedir.

Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerine, 1 ve 10 μ M EBR uygulanması sonucu; p-tau, amiloid beta ve α -syn seviyeleri ile kaspaz 3 kesiliminin geri çekilmesi, Bcl-2 anlatımının artması, 1 μ M EBR uygulanması ile CDK5 anlatımının azalması, 10 μ M EBR uygulanması ile; Bim ve Bad anlatımlarının, PARP kesilimi ve Apaf1 kompleksi seviyelerinin, GSK3 α/β ve BACE anlatımının geri çekilmesi, buna bağlı olarak amiloid beta seviyelerinin geri çekilmesi, NF-L seviyesi ile GSK3 α/β 'nin inhibisyon seviyesinin artması, 10 ve 20 μ M EBR uygulanması ile total tau seviyesinin azalması gibi veriler EBR'nin olası nörokoruyucu etkisini göstermektedir (şekil4.5, şekil 4.12, şekil 4.13, şekil 4.14, şekil 4.15 ve şekil 4.16). GSK3 tarafından fosforile edildiğine dair bir literatüre rastlanmayan NF-L'nin taupati modelinde azalan seviyesinin 10 μ M EBR uygulanması ile artması, tau kinazlarından olan ve aynı zamanda hücre sağkalımında etkili olan p44/42 anlatımının 1 μ M EBR uygulanması ile, aktive edici fosforilasyonunun ise 10 μ M EBR uygulanması ile artması tartışılır bulgulardır. Çünkü doğal tip PC12 hücrelerinde yalnızca 2N4R tau izoformunun anlatımı yapan vektör transfekte edilmeden önce tek bir bantta tau anlatımı gözlenirken, aktarım sonrası çok sayıda bant gözlenmesi ve bu bantların sayısının EBR uygulanması ile artması, literatürde bahsediliği gibi p-tau seviyesinin azalması ile tau kesiliminin artmasını işaret etmektedir (şekil 4.5). Bununla birlikte NF-L seviyesindeki değişimler tau anlatımının artmasına bağlı olarak tetiklenen PKC gibi kinazlar ile ilişkili olabilir.

Genel literatür taramasına göre patolojik tau'nun nukleustaki yanlış lokalizasyonu NH gelişiminde önemlidir (Lester ve Parker, 2018). Ayrıca tau'nun nuklear gnn patolojik tau'nun yanlış lokalizasyonu dışında stres koşulları altında DNA'yı korumak için gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Sultan ve ark, 2011). Yaptığımız tez çalışmasında taupati modeli oluşturulan PC12 hücrelerinin nukleuslarında kontrol grubuna kıyasla önemli derecede tau Ser 400/Thr403/Ser404 fosforilasyonuna uğramış tau gösterilmiştir. Ancak bu hücrelere 10 μ M EBR

uygulanması ile nukleustaki p-tau Ser400/Thr403/Ser404 birikiminde bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 4.17). Bu nedenle 10 µM EBR uygulanması ile halen devam eden stres koşulları altında nukleusa göçen tau miktarının değişmemesi, literatürde GSK3 inhibitörlerinin nuklear tau üzerindeki etkilerine dair bir çalışmaya rastlanmadığından tartışmaya açık bir konudur. İlerleyen çalışmalarda farklı p-tau epitoplarının ve total tau seviyesinin nuklear varlığının incelenmesi bu açıdan önemlidir.

AH'li bireylerin beyinlerindeki nöronlarda A β , p-tau, oksidatif stres, DNA hasarı ve nöroinflamasyonun etkisiyle G0 evresinden çıkarak yeniden hücre devrine girildiğine dair veriler bulunmaktadır. Özellikle A β oligomerlerinin mitojenik yolları aktive etmesi ile G1/S kontrol noktasının aşılması ile tetiklenen DNA sentezinin yeniden gerçekleşmesi sonucunda anöploidinin veya mitotik hücre bölünmesinin durdurulması sonucunda nöronal ölümün tetiklendiği düşünülmektedir (Majd ve ark., 2015; Żekanowski ve Wojda 2009). Taupati modeli hücelere 1, 10 ve 20 µM EBR uygulanması ile gerçekleştirilen PI hücre akış sitometresi analizinde 1 µM EBR uygulamasının G1 oranı çok yüksek ve S oranı çok düşük senkronize olmayan bir hücre popülasyonuna neden olduğu, 10 ve 20 µM EBR uygulamalarının canlı hücre sayısını daha etkin bir şekilde arttırdığı ancak 20 µM EBR uygulaması ile senkronizasyonun kontrol grubundan uzak olduğu ve doğal tip hücelere tek başına uygulanmasının toksik geldiği gösterilmiştir (Şekil 4.6). Yapılan Anneksin V/PI analizinde ise taupati modelinde artan apoptotik hücre ölümünün 10 µM EBR uygulanması ile etkin bir şekilde geri çekilmesi, fluoresan mikroskobu analizlerinde taupati modelinde azalan mitokondri membran potansiyelinin 10 µM EBR uygulaması ile tekrar kazanılması ya da taupati modelinde artan ROS seviyesinin 10 µM EBR uygulanması ile geri çekildiğinin hücre akış sitometresi ve fluoresan mikroskobunda gösterilmesi, EBR'nin taupati modeli PC12 hücrelerinde etkin dozunun 10 µM olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte EBR'nin ROS üzerindeki etkisinin literatürdeki çalışmalarda gösterilen antioksidant enzimleri düzenlemesi, α -syn, amiloid beta ve p-tau aracılı mitokondri membran potansiyeli kaybının geri çekilmesi ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

MTT, sağkalım, fluoresan mikroskobu ve akış sitometresi analizlerinde taupati modelinde artan hücresel stres bileşenlerinin ve hücre ölümünün özellikle 10 µM

EBR uygulanması ile yüksek oranda geri çekildiğinin gösterilmesi, EBR uygulaması ile arttığı gösterilen p44/42 aktivitesinin tau fosforilasyonu lehine değil de hücre sağkalımını arttırmak lehine çalıştığını göstermektedir. Yaptığımız tez çalışmasında CDK5'in düzenleyecileri olan p39 ve p35 gibi proteinlerin anlatımları gösterilmemiş olsa da, akış sitometresi analizinde taupati modelinde 1 μ M EBR uygulanması ile G1 evresinde popülasyonun birikmesi, aynı zamanda immunoblotlama analizinde CDK5'in anlatımına 1 μ M EBR uygulamasının ket vurduğunun gösterilmesi, 1 μ M EBR uygulamasına bağlı olarak CDK5 anlatımının baskılanmasına, bununla birlikte taupati modelinde 10 μ M EBR uygulaması ile aktive edici fosforilasyon seviyesinin arttığı gösterilen p44/42 tarafından muhtemelen CDK5'in düzenleyecilerinin anlatımlarının tetiklenmesi bu hücre popülasyonunda gelişen senkronizasyonu açıklayabilir (Şekil 4.6; Şekil 4.14; Şekil 4.15). Buna karşın taupati modelinde ve özellikle de doğal tip PC12 hücrelerine ve taupati modeline 1 μ M EBR uygulanması ile p44/42 seviyesinin 10 μ M EBR uygulanan gruba göre yüksek olması tartışmalı verilerdir (Şekil 4.14). Çünkü taupati modeli ile p44/42 seviyesi hemen hemen aynı olmasına karşın 10 μ M EBR uygulanması ile p44/42'nin aktive edici fosforilasyonunun yüksek olması, taupati modeline 1 μ M EBR uygulanması sonucunda p44/42 anlatımının yüksek olmasına karşın aktivitesinin taupati modelinde olduğu gibi düşük olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca literatürdeki bazı kaynaklarda CDK5 aktivitesinin GSK3 β 'yı inhibe ettiğinin belirtilmesinin (Cheung ve Ip, 2012), 10 μ M EBR uygulamasına bağlı olarak artan GSK3 β anlatımının baskılanmasını veya inhibe edici fosforilasyonunun artmasını açıklıyor olabileceği düşünülmektedir. Taupati modeline 10 μ M EBR uygulaması ile p44/42 aktive edici fosforilasyonunun yüksek olmasına karşın seviyesinin düşük olması, yüksek aktiviteye bağlı olarak bir negatif geri besleme mekanizması olarak anlatımının baskılanmasını veya Ub'una bağlı olarak yıkımını gösteriyor olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte 1 μ M EBR uygulaması ile aynı zamanda bir tau kinazı olan p44/42 aktivitesinin daha düşük olduğunun düşünülmesi tau fosforilasyon seviyelerinin 10 μ M EBR uygulamasına kıyasla daha fazla geri çekildiğinin gözlenmesinin (Şekil 4.14) bu durumla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak EBR'nin dozlar arası bu etkinlik farkının daha doğru irdelenebilmesi için 1 μ M EBR uygulanmasında da p44/42'nin aktive edici fosforilasyonunun gösterilmesi amaçlanmaktadır.

CDK5 aktivitesinin GSK3 β 'yı baskılamasının yanında STAT3'ün fosforilasyonunu da tetikleyerek BACE1 anlatımını tetikleyerek APP'nin amiloidik kesilimini tetiklediği belirtilmiştir (Cheung ve Ip, 2012). Sonuçlarımıza göre doza bağlı EBR uygulamasında 1 μ M EBR uygulaması ile CDK5 anlatımının ve BACE anlatımının azalması da bu bilgiyi desteklemektedir. Buna karşın doğal tip ve taupati modeli PC12 hücrelerinde 1 μ M EBR uygulamasında APP seviyesini arttırması CDK5'in baskılanmasına bu sonucutaupati modelinde artmasına karşın 1 μ M EBR uygulanması ile daha fazla artmasının nedeninin; 1 μ M EBR uygulanması ile azalan CDK5 aktivitesine bağlı olarak BACE 1 seviyesinin de azalarak APP kesiliminin azaltması olduğu düşünülmektedir. Buna karşın taupati modelinde 10 μ M EBR uygulanması ile CDK5 aktivitesinin artması, buna karşın GSK3 inhibisyonunun da artması, beta-katenin'in nukleusa göçünü teşvik ederek BACE-1 anlatımını baskıladığı ve immünoblotlama analizlerine bakılarak APP'nin amiloidik olmayan kesilimini teşvik etmiş olabileceği düşünülmektedir. CDK5'in GSK3'ü baskılamasına karşın her ikisinde APP kesilimini teşvik ettiğine dair literatürde bilgi bulunmasına karşın, bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre 10 μ M EBR uygulamasında APP'nin total miktarının azalması ile taupatilere karşı koruyucu etki göstermesi ve beta-amiloid seviyesini azaltması nedeni ile GSK3 inhibisyonunun nörokoruyucu potansiyelinin daha yüksek olabileceği düşünülmektedir.

Taupati modelinde Wnt sinyal yolağı bileşenleri Dvl2/3' ün seviyelerinin düşük oranda azalması, ancak bu hücrelere 10 μ M ile Dvl2/3'ün anlatımlarında önemli bir değişiklik olmaması; tau anlatımının arttırılması ile GSK3 aktivitesindeki olası artışını açıklanabileceğini ve Wnt sinyal yolağında GSK3'ün üzerinde kalan bileşenlerin yapılan biyoinformatik öngörüler ile uyumlu olarak EBR'nin moleküler hedefi olmadığı sonucuna ulaşılabilir (Şekil 4.15). Bununla birlikte bu sonucun desteklenmesi için Wnt sinyal yolağının diğer bileşenlerin anlatımlarının da gösterilmesi gerekmektedir. NPC gelişimi ve farklılaşmasında önemli bir sinyal yolağı olan Wnt sinyal yolağının inaktivasyonu post-mitotik nöronlarda hücre ölümü ile, anormal aktivasyonu ise tümör gelişimi ile karakterize edilmektedir, ancak EBR'nin olası terapötik kullanımında hipokampal bölgedeki NPC'lerin EBR uygulamasından etkilenmemesi açısından bu sonuç önemlidir. Bununla birlikte GSK3'ün de dahil olduğu kompleks tarafından yıkımı tetiklenen total β -katenin'in

seviyesinin; taupati modelinde GSK3 anlatımının artması ile fosforilasyonu ve UPS'de yıkımının tetiklenmesine ile bağlantılı olarak düştüğü, 10 μ M EBR uygulaması sonucunda ise GSK3 α/β 'nin inhibe olması ile bağlantılı olarak olarak geri çekildiği düşünülmektedir (Şekil 4.16). Bununla birlikte nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu sonucuna göre taupati modelinde GSK3 aktivitesindeki olası artışa bağlı olarak β - katenin'in sitoplazmada tutulumunun artması sonucu nukleusa göçünün azaldığı, 10 μ M EBR uygulanması ile ise GSK3 inhibisyonuan bağlı olarak nuklear göçünün arttığı düşünülmektedir (Şekil 4.17). EBR uygulaması ile β - katenin'in nuklear göçünün tetiklenmesi ve bunun Wnt sinyal yolağının Dvl 2/3 gibi elemanlarından bağımsız olduğunun gösterilmesi nedeni ile ilerleyen çalışmalarda GSK3 ile etkileşen PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı bileşenleri üzerinde durulmuştur.

Oksidatif stres, mutasyonlar, SNP'ler, UPS ve ERAD'daki bozukluklar NH'leri tetikleyebildiği gibi onunla bağlantılı olarak ER stresinin de aktivasyonunu sağlayabilmektedir. Anormal tau fosforilasyonunda olduğu gibi NH'deki post-translasyonel modifikasyonlardaki bozukluklar sonucu oluşan protein agregatları ER stresi tetiklemekte, ardından ER stres, UPS ve otofaji tarafından protein agregatlarının temizlenmesi için nöronlara sağkalıma dair bir şans vermekte, ancak UPS veya otofajinin aktivasyonu ve işlemindeki bozukluklar sonucu kronik UPR 'ın gözlenmesi ya da otofajinin anormal şekilde teşvik edilmesi ancak sonuca ulaşamaması nörol ölümü tetiklemektedir (Cabral-Miranda ve Hetz 2017). Bununla birlikte NH'de çeşitli protein birikimlerinin ER homeostasisi ve UPR aktivasyonu üzerinde inhibe edici etki oluşturdukları bilinmektedir (Hetz veSaxena 2017). NH gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen UPS, otofaji ve ER stres' inde taupatiler ve AH'de yeni potansiyel hedefler olarak nitelendirilebilir. Bu nedenle bu tez çalışmasında EBR'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile ilişkili olarak ER stres, moleküler şaperon sistemleri ve otofaji üzerindeki etkileri gösterilmiştir.

Yaşlanma ve AH ile aktive olan UPR'ın; eIF2 α inhibisyonu aracılığı ile sinaptik fonksiyon bozukluklarını, XBP1 Tf ve aktive JNK aracılı APP sentezi ile A β birikimini, sonuçta da bilişsel bozuklukları tetiklediğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (Duran-Aniotz ve ark, 2014). Matthews-Roberson ve ark.(2008) kortikal nöronlar ile yaptıkları çalışmada; tau' nun kaspaz 3 tarafından Asp 421 kesiliminin nöronları ER stres teşvikli hücre ölümüne karşı duyarlı hale getirdiğini

göstermişlerdir (Matthews-Roberson ve ark, 2008). Timmins ve ark. (2009) nöral model olarak PC12 hücrelerini de kullandıkları çalışmada ER stres aracılı CaMKII aktivasyonunun; MAM aracılı Ca^{+2} akışı, JNK aracılı Fas reseptörü gen anlatımının arttırılması ve STAT1 aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Timmins ve ark,2009).

Bruch ve ark. (2017)'nin ikincil taupati sınıfındaki PSP'li bireylerin beyinlerinde, doğal tip insan -4R tau anlatımı arttırılmış ya da nörotoksin ajan annonasin ile maruz bırakılmış insan nöron kültürü ve P301S-tau transgenik farelerde yapılan çalışmalarında, PERK aktivatörü CCT020312 kullanımı veya PERK anlatımının arttırılmasının *in vitro* da tau fosforilasyonunu baskılayıp hücre sağkalımını tetiklediği, *in vivo* da ise PERK aktivatörünün kullanımının; dendritik ağların kaybının, tau patolojisinin ve nöron kaybının azaltılması ile hafıza ve lokomotor fonksiyonların iyileştirilmesini sağladığını göstermişlerdir (Bruch ve ark, 2017). Buna karşın PERK ve eIF2 α 'nın kronik yüksek aktivasyonu da hafızanın bozulması ve nöral ölüm ile karakterize edilmektedir. Bu bağlamda taupati fare modellerinde yapılan çeşitli çalışmalarda GSK2606414 gibi PERK inhibitörleri veya Trazodone, Dibenzoilmetan gibi eIF2 α inhibitörlerinin kullanımının tau fosforilasyonunu baskılayıcı ya da nörokoruyucu rolleri olduğu gösterilmiştir (Halliday ve ark, 2017; Hetz ve Saxena, 2017).

NH'ler de terapötik yaklaşımların bazılarının da ise ER stres şaperonları, protein antioksidantları ve E3 Ub ligaz görevi yapan HRD1 üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda HRD1 'in APP'ye prolince zengin bölgesinden bağlandığı ve onun degradasyonunun tetiklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte yapılan son çalışmalarda HRD1'in p-tau degradasyonunda da etkili olduğu gösterilmiştir. HRD1 anlatımının siRNA kullanımı ile susturulması sonucunda A β ₄₀₋₄₂ seviyelerinin anlamlı şekilde arttığı, bununla paralel olarak nöral ölümün tetiklendiği gösterilmiştir. Bu bağlamda AH'de HRD1 gibi E3 Ub ligazların tetiklenmesi, PH'de ise PDI ve BİP gibi moleküler şaperonların ya da gliserol, DMSO veya 4-fenil-butirat gibi kimyasal şaperonların, protein şaperonların nitrosilasyonunu engellemek için NO. inhibitörlerinin kullanımının protein birikimini ve ER stres teşvikli nöral ölümü engelleyebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Nomura ve ark, 2016).

Yaptığımız tez çalışması kapsamında doğal tip PC12 hücrelerine doza bağlı (1 ve 10 μ M) EBR uygulaması sonucu özellikle 10 μ M EBR uygulaması ile ER stres algılayıcı fATF6 α/β seviyelerinin ve zayıf aktivatör kATF6 β seviyelerinin kontrol grubuna göre artması, bununla birlikte doza bağlı EBR uygulaması sonucu diğer ER stres algılayıcı proteinler olan PERK ve IRE1 α 'nın ya da PERK aktivasyonu ile tetiklenen Tf olan CHOP'un anlatımının azalması, ER şaperon proteinleri PDI, Bip, CALR 'in anlatımlarının artması; Bak, Bax, Bad ve Bim anlatımları ile PARP kesiliminin artması, ancak Bcl-2 anlatımının düşmesi; buna karşın daha çok IRE1 α aktivitesi ile tetiklenen SAPK/JNK ile p38'in anlatımları ve buna bağlı olarak aktive edici fosforilasyon seviyelerinin ya da p65'in nukleusa göçünün azalması UPR'ın 10 μ M EBR uygulaması ile daha çok ATF6 üzerinden tetiklendiğini ancak daha sonra bu tetiklenmenin kATF6 β ile büyük oranda inhibe edilmeye başladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte 10 μ M EBR uygulaması ile kontrol grubuna göre IRE1 α ve PERK anlatımları ya da onların aktivasyonu ile ilişkili SAPK/JNK ile p38 fosforilasyonlarının ve seviyeleri ile CHOP seviyesinin düşmesi; 10 μ M EBR uygulaması sonucu IRE1 α ve PERK üzerinden de ER stresin tetiklendiğini, ancak zamanla bu atkivasyonların bir negatif geri bildirim mekanizması olarak IRE1 α ve PERK fosforile formlarının yıkılımı ile SAPK/JNK ve p38 'in fosforile formlarının yıkılımı ile seviyelerinin düşmüş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca EBR uygulaması ile kullandığımız doz düşük olsa da ER stresin tetiklenmesinde EBR ile ilgili literatür çalışmalarıyla uyumlu olacak şekilde CALR anlatımının büyük oranda artmasının etkisi olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22).

Taupati modeli PC12 hücrelerinde; fATF6 α/β 'nin yüksek oranda kesilerek kATF6 α/β oluşturması, IRE α ve PERK anlatımlarında kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmaması; buna karşın daha çok IRE1 α aktivitesi ile karakterize edilen aktive edici SAPK/JNK fosforilasyonları ve p38 anlatımının yüksek oranda artması, p53 anlatımı düşmesine karşın daha çok ER stres ile kategorize edilen Ser15 fosforilasyonunun yüksek olması, ER şaperon proteinleri anlatımlarından; CALR ve CALNX'in pek değişmemesine karşın daha çok amiloid plaklar ile eş lokalize olduğu belirtilen Bip'in yüksek oranda artması ve daha çok NFT ile eş lokalize olduğu belirtilen PDI' in anlatımının daha düşük oranda artması UPR'ın daha çok kATF6 α ve IRE1 üzerinden tetiklendiğini ancak daha sonra kATF6 β üzerinden bu

aktivasyonun geri çekilmeye çalışıldığını düşündürmektedir. Bununla birlikte UPR durumunda özellikle IRE1 α üzerinden aktive olan; hücre sağkalımını ve inflamasyonu tetikleyen Tf olan NF κ B p65 aktif alt ünitesinin taupati modelinde total seviyesi düşmüş görünmesine karşın büyük oranda nukleusa göçmesi, yine pRK5-EGFP-Tau transfekte edilmiş PC12 hücrelerinde yaptığımız diğer çalışmalarda taupati modelinde aktive edici Thr183/Tyr185 fosforilasyonuna uğramış SAPK/JNK'nın büyük oranda nukleusa göçtüğünün gösterilmesi taupati modelinde de ER stresin yüksek oranda tetiklenmiş olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte taupati modelinde aktive edici fosforilasyonları kontrol grubuna göre yüksek oranda tetiklenmiş olan SAPK/JNK'nın seviyesinin anlatımının kontrol grubuna göre düşmüş olmasının nedeni bir negatif geri besleme mekanizması olarak SAPK/JNK'nın yüksek oranda fosforile formunun Ub'lerenerek yıkılmış olabileceğini, buna karşın aktivasyonunun halen sürdüğü, p38'in ise anlatımının kontrol grubuna göre yüksek oranda artması ancak aktive edici fosforilasyonunda önemli bir değişiklik olmamasının benzer şekilde bir negatif geri besleme mekanizması olarak p38'in defosforilasyonunun tetiklenmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22).

Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerine doza bağlı (1 ve 10 μ M) EBR uygulaması ile; kATF6 α/β seviyelerinin ve fATF α/β anlatımlarının artması ATF6 üzerinden UPR 'ın tetiklenmeye çalışılmasının devam ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte 10 μ M EBR uygulanması ile IRE1 α anlatımının taupati modeline göre azalması, PERK anlatımında önemli bir değişiklik olmaması, ATF6 ve daha çok PERK aktivasyonu aracılığı ile anlatımı düzenlenen UPR ilişkili Tf CHOP'un anlatımının artması ise EBR'nin taupati modelinde PERK aracılı olarak da UPR'ı aktive ettiğini göstermektedir. Bunun yanında taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile IRE1 α seviyesinin düşmesinin, onun anormal fosforile formunun yıkımının tetiklenmesi ile ilişkili olabileceği, ayrıca 10 μ M EBR uygulanması ile, daha çok IRE1 α aracılığı ile aktive olan NF κ B' p65'in total anlatımının artmasına karşın nukleusa göçünün azalması, ayrıca daha çok IRE1 α tarafından aktive edilen SAPK/JNK'nın aktive edici fosforilasyonlarının anlatımları artmasına rağmen belirgin biçimde düşmesi ve p38 anlatımının düşmesi, Bim ve Bad seviyelerinin düşmesi verilerine göre IRE1 α aktivitesinin geri çekildiği sonucuna ulaşılabilir. SAPK/JNK'nın fosforilasyonları düşmesine karşın anlatımının artması, negatif geri

beslenme mekanizmasına bağılı olarak gerçekleřen yıkımın, fosforilasyonunun azalması ortadan kalktıđını dűşündürmektedir. Buna karřın p38'in anlatımının oldukça dűřmű olmasına rađmen aktive edici fosforilasyonunun senkronize řekilde dűřmemesi bir ER stres teřvikini veya p38'in yıkılmıř olabileceđini dűşündürmektedir. Bununla birlikte taupati modeline 24 saat, 10 μM EBR uygulanması sonucu CHOP ile birlikte ayrıca ER řaperonları PDI ve CALR'inde artması ER stresin halen tetiklediđini ve hatta PERK üzerindeki olası inhibisyonun ortadan kalkmıř olabileceđini gűstermektedir. Bu sonuç literatűrdeki PERK'in anlatımın arttırılması veya PERK aktivatűrlerinin kullanılması, ayrıca fosforile olmuř PERK ve eIF2α'nın ve PDI'nın NFT'ler ile birlikte konumlanması ile uyum gűstermektedir (řekil 4.12, řekil 4.13, řekil 4.20, řekil 4.21, řekil 4.22).

Patolojik tau'nun ERAD'ın inhibe ettiđi, α-syn'in de ER stres algılayıcılarının aktivasyonunu, ER řaperonlarını ve ER'den golgiye vesikűl tařınımını inhibe ettiđi bilinmektedir. Ayrıca taupati modelinde anlatımı arttıđı gűsterilen APP ve BACE'nin Aβ üretimini arttırması ile, ER Ca⁺² homeostasisinde Aβ ile bozulması olasıdır (Hetz ve Saxena 2017). Bu nedenle Ca⁺² ile alıřan CALR ve CALNX řaperonlarının aktivitesinin dűřmesi beklenmektedir. Bu nedenle EBR uygulaması taupati modelinde olası baskılanan PERK aracılı UPR'ın CALR aracılıđı ile aktivasyonunu tetikliyor olabileceđi dűřűnűlmektedir. Tűm sonuçlar ve literatűr verileri gűz űnűne alındıđında; taupati modelinde ER stresin tetiklendiđi, ancak UPR'ın gűrece baskılandıđı, EBR uygulaması ile ise UPR'ın bařlangıçta daha fazla tetiklendiđi, bu nedenle aktive olan kalpainlere bağılı olarak azalan tau fosforilasyonu seviyesinin yardımı ile tau kesiliminin arttıđı sonucuna ulařılabilir. Taupati modeline 10 μM EBR uygulanmasına bağılı olarak proapoptotik Bak, Bax ve p53 anlatımlarının artmasının da ER stres ile biriken CHOP Tf aracılıđıyla sađlanmış olabileceđi űngűrűlmektedir. Bununla birlikte taupati modeline 1 μM EBR uygulaması ile Bcl-2 anlatımının ve fKaspaz3 seviyelerinin daha çok yűkselmesinin, 10 μM EBR uygulaması ile bařlangıçta ER stresin daha gűclű bir řekilde tetiklenip Bcl-2 anlatımını baskılaması ve Kaspaz kesilimini tetiklemesi ile iliřkili olabileceđi dűřűnűlmektedir. Ancak kKaspaz3 seviyelerinin 1 μM EBR uygulaması ile daha yűksek olması, buna karřın fKaspaz3 seviyesinin de 10 μM EBR'ye gűre yűksek olması, 1 μM EBR uygulamasında fKaspaz3'űn anlatımının daha yűksek oranda tetiklenmesi ile iliřkili olabilir. Bununla birlikte p53'űn anlatımı artmasına rađmen

ER stres ilişkili Ser 15 fosforilasyonunun düşmesi 10 μ M EBR uygulanması ER stres teşvikinin zamanla geri çekildiğinin bir göstergesi olabilir. Ancak bu noktada hücre sağkalımı ve ölüm arasındaki karar mekanizması pro/anti-apoptotik proteinlerin fosforilasyon sevipleri ve diğer apoptoz düzenleyicilerinin etkileşimi ile de ilgilidir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.20, Şekil 4.21).

Nijholt ve ark. (2011), AH modeli SK-N-SH ve HEK293 hücrelerinde ya da AH'li bireylerin beyin dokularından aldıkları örnekler ile yaptıkları çalışmada UPR aktivasyonunun AH patolojisi durumunda temel olarak UPS aktivasyonunu değil de otofajik indüksiyonu sağladığını göstermişlerdir (Nijholt ve ark, 2011). Wang ve ark. (2009) fare N2A nöroblastoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada tau kesilimi, birikimi ve agregatların temizlenmesinde lizozomal işleminin ikili role sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna göre tau tekrar domainleri ilk olarak sitosolik proteazlar tarafından kesilerek F1 fragmenti oluşur, ardından bu fragment HSP70/CMA sistemi aracılığı ile lizozomal katepsin-L ile F2 veya F3 fragmentlerine kesilmekte, daha sonra ise bu fragmentler tau agregatlarını oluşturmaktadır (Wang ve ark, 2009). Bu agregatların temizlenmesi ise makrototofaji ile mümkün olmaktadır. M.Perez ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada 4R2N tau izoformu transfekte edilmiş HEK293 hücreleri, primer hipokampal kültür hücreleri ve tau anlatımı nakavt edilmiş ya da doğal tip tau anlatımı yapan farelerde yaptıkları çalışmada UPS, CMA ve makrototofajide önemli rol oynayan, aynı zaman da α -tubulinlerin deasetilasyonları aracılığı ile stabilizasyonunu sağlayan HDAC6 aktivitesinin tau tarafından inhibe edildiğini, buna bağlı olarakta UPS ve otofaji indüksiyonunun engellenebileceğini göstermişlerdir (Perez ve ark, 2009). Buna karşın HDAC6'nın otofagozom olgunlaşması ve onun lizozom ile füzyonunda rolü olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (Van Helleputte ve ark, 2014).

Yapılan çeşitli çalışmalarda patolojik tau'nun otofagolizozom yapısı oluşumunu engellediği, taupatiler veya sineükleopatilerde tau 'ya eşlik edebilen α -syn'in ise otofagozom oluşumu veya lizozomal yapı bozukluklarına, yine tau birikimine eşlik edebilen hungtingtin'in ise kargo tanınmasına engel olabileceği belirtilmiştir (Menzies ve ark, 2017). Örneğin Pacheco ve ark. (2009) Niemann-Pick tip-C fenotipli farelerde yaptıkları çalışmada tau hiperfosforilasyonunun basal otofajiyi inhibe ettiğini, ancak MAPT delesyonunun da benzer etkiye sahip olduğunu

göstermişlerdir (Pacheco ve ark, 2009). Ayrıca yapılan çalışmalarda otofaji sistemindeki bozukluklar ile biriken p-tau'nun UPS'yi de inhibe ettiği, sitoplazmada kesilen tau'nunda bu inhibisyonu arttırdığı gösterilmiştir (Chesser ve ark., 2013; Zhang ve ark, 2017). Ayrıca tau hiperfosforilasyonunun onun UPS veya otofaji ile yıkılmasını inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Wang ve Mandelkow, 2016).

Literatürden elde edilen verilere göre GSK3; mTORC1 aktivasyonunu tetikleyerek ve lizozomal asidifikasyonun inhibisyonuna bağlı olarak otofajinin inhibisyonuna yol açmaktadır. mTORC1 kompleksinin düzenleyicisi Raptor'un mTOR tarafında Ser 863 fosforilasyonu onun GSK3 tarafından Ser859 fosforilasyonunu teşvik etmekte, bu sayede mTORC1 aktive olarak ULK1 inhibe edici fosforilasyonunu sağlayarak otofajinin tetiklenmesini inhibe etmektedir. Ayrıca aktive GSK3 β Ser 134/138, aktive mTORC1 ise Ser122/142/211 fosforilasyonlarını tetikleyerek lizozom biyogenezinde rol alan transkripsiyon faktör E kutusu (TFEB)'nin nukleusa göçünü inhibe etmekte, sonuçta hem mTORC1 hem de GSK3 β aktivasyonu otofagolizozom aktivitesini engellemektedir (Azoulay-Alfaguter ve ark, 2015; Foster ve ark, 2010; Puertollano ve ark, 2018; Stretton ve ark, 2015). Buna paralel olarak taupati modeli farelerde TFEB'in tau temizlenmesinde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Polito ve ark, 2014).

Literatür verilerine göre otofajinin mTOR'dan bağımsız şekilde tetiklenebileceği öngörülmektedir. Buna paralel olarak taupati modeli farelerde yapılan çalışmalarda; mTOR bağımlı otofaji tetikleyici Rapamisin'in ve plazma membranında glukoz taşıyıcısını inhibe ederek mTOR'dan bağımsız olarak otofajiyi tetikleyen Trehaloz'un nörokoruyucu etkileri gösterilmiştir (Sarkar, 2013). Yapılan çeşitli çalışmalarda GSK3 inhibitörü LiCl'ün aynı zamanda otofajiyi tetikleyerek de tau, α -syn ve hungtingtin gibi protein agregatlarının temizlenmesinde rol oynadığı belirlenmiştir. Örneğin taupati modeli farelerde; p-tau ve LC3 floresan konjuge sistemleri ile LiCl uygulamasına bağlı olarak otofagozom yapısının oluşumunun teşvik edildiği gösterilmiştir. LiCl'ün otofajiyi teşvik etmesinin mTOR bağımlı yolda GSK3 β inhibisyonu ile, mTOR'dan bağımsız olarak ise inositol monofosfataz inhibisyonu aracılığı ile tetiklediği öne sürülmüştür (Azoulay-Alfaguter ve ark, 2015; Motoi ve ark, 2014). Buna karşın *in vitro* AH modeli oluşturulmuş mürin nöroblastoma, Çinli

hamster ovaryum hücreleri ve HEK293 hücreleri ile yapılan bir çalışmada; GSK3' e özgül iki inhibitörün kullanımının ya da GSK3 α/β anlatımının kısa susturucu RNA (siRNA) kullanımı ile baskılanmasının APP'nin otofajik yıkılımının tetiklediği, ancak GSK3'ün özgül olmayan inhibitör LiCl kullanımında APP yıkılımının anlamlı olmadığı gösterilmiştir. (Parr ve ark, 2012). Xu ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, anti-inflamatuvar ve anti-tümör etkileri gösterilen lipofilik karakterdeki Triptolid'in A β_{25-35} 'e maruz bırakılan PC12 hücrelerinde otofajiyi tetikleyerek nörokoruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir (Xu ve ark, 2015).

Hücre sağkalımı ve otofajinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına ait proteinlerin anlatımları ve fosforilasyon seviyeleri bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir. Kontrol grubunda yüksek olan PDK-1 Ser 241 fosforilasyonu onun otofosforilasyonu ile aktivasyonunu göstermektedir. Buna bağlı olarak da kontrol grubunda anlatımı ile uyumlu olarak yüksek olan GSK3 β ve PDK1 kaynaklı p70S6K aktive edici Ser 371 fosforilasyonunun, yüksek Bcl-2 anlatımı, düşük pro-apoptotik protein anlatımları, yüksek fPARP ve fKaspaz 3 seviyeleri, anlatımı düşük olmasına rağmen aktive edici Ser 2448 fosforilasyonu yüksek olan mTOR, aktive edici Thr 308 fosforilasyonu anlatımı ile uyumlu olan Akt, ayrıca PI3K p85 düzenleyici alt ünitesi ve mTORC2'nin düzenleyicisi Rictor'un anlatımının yüksek olması hücre sağkalımının ve protein sentezinin teşvikini, anlatımına göre düşük seviyede olan AMPK α aktive edici Thr 172 fosforilasyonunun mTORC1 kompleksi üzerinden ise otofajinin baskılanmasını göstermektedir. Buna karşın kontrol grubunda mTOR ve Raptor'un anlatımlarının düşük olması, özellikle de Raptor'un AMPK α tarafından gerçekleştirilen inhibe edici Ser 792 fosforilasyonunun yüksek olması otofajinin inhibe edilmesini zorlaştırmaktadır (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23)

Liu ve ark (2016) yaptıkları çalışmada AMPK α tarafından gerçekleştirilen ULK-1'in aktive edici Ser 155 fosforilasyonunun otofajiyi teşvikte önemli olmasına karşın, ULK-1'in otofosforilasyonu sonrası yıkımını tetiklediği, böylelikle otofagozom membranının oluşmaya başladığını belirtmişlerdir(Liu ve ark, 2016). Bu nedenle kontrol grubunda, ULK seviyesi düşük olmasına rağmen Ser155 fosforilasyonunun fazla olması düşük oranda otofajik indüksiyonu göstermektedir. Ayrıca kontrol

grubunda p62, ATG3, ATG12/ATG16L1 anlatımlarının düşük olması otofajik bir indüksiyon varsa bile otofagozom yapısının oluşmasını zorlaştıracakını göstermektedir. Bununla birlikte ULK-1 kompleksindeki diğer ATG'ler ve VPS34 anlatımlarının ya da fosforilasyonlarının gösterimi bu hipotezin tartışılması açısından önemlidir. Ayrıca kontrol grubunda LC3A/B-II varlığının gözlenmesi de düşük oranda otofagozom membranı oluşumunun olabileceğini göstermektedir, ancak bu durum hücrenin normal fizyolojik süreci için gereklidir. Hücresel bir stres koşulu altında otofajinin kontrol grubuna göre tetiklendiğini ise LC3A/B-II:LC3A/B-I oranının artması göstermektedir (Şekil 4.23). Ayrıca kontrol grubunda ER stres ve UPR cevabı gözlenmemesi, ER stres elemanları üzerinden de otofajinin tetiklenemeyeceğini göstermektedir (Cai ve ark, 2016). Burada mTOR'un farklı aktive ve inhibe edici fosforilasyonlarının da işlevsel olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte Acridine Orange ve LysoTracker fluoresan boyama analizlerinde kontrol grubunda hücre yoğunluğu yüksek olmasına karşın lizozomal aktivitenin düşük olduğunun gözlenmesi nedeni ile otofagolizozom oluşumunun da düşük olduğu sonucunu gösterebilir (Şekil 4.24).

Doğal tip PC12 hücrelerine 10 μ M EBR uygulaması ile kontrol grubuna göre; AMPK α aktivasyonunun artması, Rictor anlatımının azalması, PI3K yolağının negatif geri düzenleyicisi PTEN anlatımının artması, p70S6K'nın anlatımının ve aktivitesinin azalması, inhibe edici raptor fosforilasyonunun raptor anlatımı azalmasına karşın kontrol grubuna yakın seviyede olması, ATG 5/12/16L1'in ve p62 anlatımlarının artması, LC3A/B-II oranının LC3A/B-I e oranının kontrol grubuna göre en fazla artışın olduğu kondüsyon olması otofajinin tetiklendiğini, otofagozom yapısının oluştuğunu göstermektedir. Bununla birlikte ULK-1 fosforilasyonunun anlatım seviyesine göre yüksek olmaması literatürde belirtildiği gibi bir otofaji aktivasyonunu gösteriyor olabilir. Ayrıca ULK-1'i fosforile eden mTORC1 kompleksi üyelerinin anlatımlarının düşük olması, bunun yanında 10 μ M uygulaması ile ER stresinin tetiklenmesi ve fluoresan mikroskobu görüntülerinde de kontrol grubuna göre lizozom aktivitesi yüksek hücre sayısının fazla olması otofajinin tetiklendiğini ve sonuca ulaşabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte 1 μ M EBR uygulaması ile kontrol grubuna göre artan PI3K ve Raptor anlatımları otofajinin tetiklenmesini engelleyebilecek unsurlar olarak görülmektedir. 10 μ M EBR uygulaması ile mTOR anlatımı düşük olmasına karşın aktive edici fosforilasyonunun

yükselmesi mTOR'un aktivasyonundan sonra yıkıldığını gösteriyor olabilir. Bu durumun 14-3-3 anlatımının artışı ile de paralellik gösteriyor olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte 10 μ EBR uygulaması ile Akt ve onunla uyumlu olarak aktive edici fosforilasyonunun artmasının, 4E-BP1 inhibe edici fosforilasyonunun tetiklenmesinin; 10 μ M EBR'nin muhtemelen başlangıçtaki PI3K yolağında otofajiyi tetikleyecek şekilde inhibe edici etkisine karşı bir negatif geri besleme mekanizması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca otofaji ile ilişkili bazı proteinlerin anlatımının 10 μ M EBR uygulaması ile düşmesinin de otofajinin sonuçlanması ile ilişkili olarak bir negatif geri bildirim mekanizması olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23, Şekil 4.24).

Tez çalışması kapsamında taupati modelinde elde edilen sonuçlarda; kontrol grubuna göre; AMPK α 'nın anlatımına kıyasla aktive edici Thr 172 fosforilasyonunun daha fazla artması, PI3K düzenleyici alt ünitesi p85'in anlatımının yüksek oranda azalması, PTEN anlatımının artması, mTORC2'nin düzenleyicisi Rictor'un anlatımının azalması, inhibe edici 4E-BP1 fosforilasyonunun artması, p70S6K anlatımının azalması, PAS oluşumunu belirleyen ULK-1'in anlatımının taupati modelinde yüksek oranda artması, bununla birlikte AMPK α tarafından gerçekleştirilen ULK-1'in aktive edici Ser 155 fosforilasyonunun anlatımına göre daha düşük oranda artması, Vps 34 kompleksinden; PI3K sınıf 3 anlatımının yüksek oranda, beclin 1'in düşük oranda artması, tau 'nun seçici otofajisi için de önem arz eden Ub bağlanma proteini p62 seviyesinin artması, otofagozom yapısının tamamlanmasında önemli olan Ub konjugasyon sistemi elemanlarından ATG3/ATG7 ile ATG12/ATG16L1'in anlatımlarının artması, ve otofagozom membranının tamamlandığını gösteren LC3A/B-II seviyesinin LC3A/B-I' göre düşük oranda artmış olması otofajinin tetiklendiğini ancak otofagozom yapısının oluşumunun çok yüksek olmadığını düşünmektedir (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23).

Taupati modelinde ULK-1 anlatımı yüksek olmasına karşın aktive edici Ser 155 seviyesinin çok yüksek oranda artmaması, otofajik indüksiyonun sürekli olarak gerçekleştiğini gösterebilir, çünkü ULK-1'in otofosforilasyonu ile yıkımı sonucunda halen fosforile olmamış ULK-1 havuzu ve PAS oluşumunu tetikleyecek oranda p-ULK1 ortamda mevcut olduğunu göstermektedir. Buna karşın taupati modelinde kontrol grubuna göre; Raptor ve mTOR anlatımlarının artması ya da protein sentezini

tetikleyen p70S6K'nın ve anlatımı azalmasına rağmen aktive edici Ser 371 fosforilasyon seviyesinin artması, aktive edici PDK-1 ve Akt fosforilasyonları ve seviyelerinin düşük oranda artması taupati modelinde otofajinin tetiklenmiş olması ile ilgili tartışmalı bulgulardır. Bununla birlikte p70S6K'nin anlatımı düşük olmasına karşın fosforilasyonunun yüksek olması yıkılıyor olabileceğini gösteriyor olabilir, bu durum 14-3-3 anlatımında artması ile de paralel görünmektedir. mTOR anlatımı çok yüksek oranda artmış olmasına karşın aktive edici fosforilasyonu o derece yüksek oranda değişmemesi mTOR aktivitesinin düşük olması, raptor anlatımı çok yüksek oranda artmasına rağmen inhibe edici fosforilasyonunun düşük olmasının otofaji teşvikine karşı bir negatif geri besleme mekanizması olabileceği düşünülmektedir. p70S6K'yı fosforile eden enzimlerden PDK-1'in aktive edici fosforilasyonunun kontrol grubuna göre artması ve GSK3 β 'nin aktivitesinin taupati modelinde kontrol seviyesine göre arttığının düşünülmesi, p70S6K fosforilasyonunun yüksek olması durumu açıklamaktadır. Bu durum da otofajinin teşvikine karşı bir negatif geri besleme mekanizması olabilir. Literatürdeki verilerde artan GSK3 aktivitesinin mTORC1 aktivasyonunu, lizozom biyogenezini ve aktivasyonunun inhibe etmesi de otofajik teşvikin yeterince gerçekleşmemesini açıklamaktadır. Buna karşın Acridine Orange ve LysoTracker fluoresan görüntülerinde hücre yoğunluğu azalmış olmasına karşın kontrol grubuna göre büyük oranda olmasa da lizozomal aktivitenin arttığının gözlenmesi ile otofagolizozom oluşumunun da tetiklendiği düşünülmektedir (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23, Şekil 4.24).

Taupati modelinde ATF6 ve IRE1 α bağımlı tetiklenen UPR aracılığı ile CaMKK aktivasyonu sonucunda mTORC1 inhibisyonu aracılığı ile ULK1 aktivasyonu tetiklenmiş olabilir. Taupati modelinde ATF6 aracılı anlatımı ve özellikle de IRE1 α tarafından da kesilimi ile aktivasyonu sağlanan XBP1 Tf sayesinde Beklin-1 anlatımını tetiklenmiş olduğu düşünülmektedir. Ayrıca IRE1 α aracılığı ile aktive olan RIDD sistemi ile anti-apoptotik Bcl-2'nun anlatımı engellenmiş olabilir. Taupati modelinde aktif olan ATF6 ve IRE1 α aracılığıyla, XBP1 Tf'ü aracılı Ub-konjugasyon sistemi elemanlarının anlatımının tetiklenmiş olması olasıdır. Normal şartlarda Beklin-1'i tutarak inhibe eden, bununla birlikte taupati modelinde anlatımı düşük olduğu gözlenen Bcl-2'dan Beklin-1 'in serbestlenip otofagozom membranının oluşumunu tetiklemeye başlaması olasıdır (Cai ve ark, 2016). Ayrıca taupati

modelinde aktive edici fosforilasyonu ile nukleusa göçtüğünü laboratuvar çalışmalarında gösterdiğimiz SAPK/JNK'nın AP1'in fosforilasyonu sayesinde; tez çalışması kapsamında kontrol grubuna göre anlatımları arttığı gösterilen pro-apoptotik Bax, Bak ve Bim aracılı ile düşük olan Bcl-2 anlatımı sayesinde apoptotun tetiklenmiş olabileceği öngörülmektedir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.23)

Taupati modeli hücrelere 1 ve 10 μ M EBR uygulanması ile taupati modeline göre; mTOR anlatımının artması, Raptor anlatımlarının değişmemesi, 1 μ M EBR uygulanması ile yüksek oranda PI3K anlatımının artması ve inhibe edici Raptor fosforilasyonu seviyesinin azalması otofajinin tetiklenmesi açısından inhibe edici durumlardır. Bununla birlikte 10 μ M EBR uygulaması ile taupati modeline göre; ULK-1 anlatımının ve aktive edici fosforilasyonunun azalması otofajinin tetiklenmesinin; Vps 34, Beklin 1, Atg 3/7 ve Atg5/12/16 anlatımlarının azalması da 10 μ M EBR uygulamasından 24 saat sonra otofajik teşvikin düşük olduğunu göstermektedir. Buna karşın PDK-1 aktive edici fosforilasyonunun, rictor anlatımının, aktive edici p-akt seviyesinin, anlatımı artmasına karşın mTOR'un aktive edici Ser 2448 fosforilasyonunun, p70S6K anlatımı ile aktive edici fosforilasyonunun, ve 4E-BP1'in inhibe edici fosforilasyonunun azalması, AMPK α anlatımı düşmesine rağmen aktive edici fosforilasyonunun aynı oranda azalmaması, 14-3-3 seviyesinde belirgin bir değişiklik olmaması, LC3A-B-II/ LC3A-B -I oranının en fazla bu kondüsyonda olması, p62 yıkılımının gözlenmesi, fluoresan mikroskobu görüntülerinde hücre yoğunluğunun artmasına karşılık lizozomal aktivitenin arttığı gösterilmesi bu kondüsyonda erken evrede 10 μ M EBR uygulamasının ototfajiyi teşvik ettiğini, aynı zamanda da otofagolizozom aktivitesinin arttırdığını düşündürmektedir. Ayrıca laboratuvarlarımızda yapılan çalışmalarda pRK-EGFP-Tau transfekte edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde taupati modelinde otofajiyi tetikleyen proteinlerin anlatımı üzerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiş, bununla birlikte bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile lizozomal membran proteini Lamp-1'in yıkıldığı ve Acridine orange boyama ile lizozomal aktivitenin arttığı gösterilmiştir. Taupati modeline 10 μ M EBR uygulanması ile 24 saat sonunda düşen ototfajiyi teşvik edici protein anlatımı ve fosforilasyonlarının ise bir negatif geri besleme mekanizması olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23, Şekil 4.24).

MSS'de tau fosfataz aktivitesinin büyük çoğunluğunu yerine getirdiği bilinen PP2A katalitik alt biriminin anlatımının taupati modelinde değişmemesi, buna karşın PP2A aktivitesini düzenleyen mTORC1 aktivitesinin anlatımına göre çok yüksek olmadığının gösterilmesi taupati modelinde tau fosforilasyonunun artmasında PP2A aktivitesindeki azalmanında etkili olabileceğini göstermektedir. Buna karşın taupati modeline 10 µM EBR uygulanması ile PP2A anlatımının düşük oranda azalması, buna karşın mTORC1 aktivitesinde anlatımına göre düşük olduğunun belirlenmesi, 10 µM EBR'nin değişmemesi EBR'nin terapötik etkinliğinin tau fosfataz aktivitesi ile ilişkili bir hedefi olmadığını gösterebilir (Şekil 4.15, Şekil 4.18, Şekil 4.19). Yine de bu sonuca ulaşabilmek için aynı zamanda enzim kinetiği analizleri yapılması gerekmektedir.

Literatürde tau birikimi ile otofagolizom yapısının ve GSK3β aktivitesi ile lizozom aktivitesinin inhibe edildiği belirtilmektedir. EBR uygulaması ile azalan GSK3 aktivitesi sonucu p-tau miktarının azalması, total tau seviyesinin azalması, muhtemelen ER stres ve CMA aracılığı ile de tau kesiliminin tetiklenmesi ve GSK3 aktivitesinin azalmasına bağlı olarak otofagolizom aktivitesinin tetiklenebileceği öngörülebilir. Ancak bu hipotezin desteklenmesi için EBR'nin otofagolizom/lizozom füzyonu inhibitörleri ve otofagolizom asidifikasyonu inhibitörleri ile birlikte uygulanması daha kesin bir sonuca ulaşılmasını mümkün kılacaktır. Ayrıca hücrel şaperon sistemleri olan HSP90, HSP70 ve HSP60 anlatımlarında gerçekleştirilen uygulamalar ile nörokoruyucu mekanizması olduğu bilinen HSP70'in anlatımının taupati modelinde azalması ancak bu hücrelere 10 µM EBR uygulaması ile artması, NH gelişimini tetikleyici olduğu düşünülen HSP90 anlatımının taupati modelinde artması, mitokondride protein birikimini engelleyen HSP60 anlatımında taupati modeline 10 µM EBR uygulaması ile artması, EBR'nin olası nörokoruyucu etkinliğini göstermektedir. Taupati modeli PC12 hücrelerinde HSP70 inhibitörü Bag1'in izoformlarından Bag1-M ve Bag1-S'nin anlatımlarının taupati modelinde azalması, tau birikimini tetiklediği belirtilen CMA'nın aktive olabileceğini, bu hücrelere 10 µM EBR uygulaması ile artması ise tau proteininin proteozomal sistemde yıkılımını tetikleyebileceği öngörülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.23). HSP70 şaperon sisteminin anlatımının artması ile aracılığı ile patolojik tau'nun çözünür forma getirilmesi ve APP'nin plazma membranına verilmesi engellenerek tau ve Aβ toksisitesi azaltılmış, ayrıca kaspaz-3 kesiliminin azaltılması ile hücre

ölümünün geri çekilmesi tetiklenmiş olabilir. Ayrıca 10 μ M EBR uygulaması ile azalan IRE1 α aktivitesine bağılı olarak Bcl-2 anlatımının tetiklenmiş olabileceği, konjuge olmayan formunun Bcl-2'yi tutarak inhibe ettiği gösterilen ATG12 anlatımının düşmesine bağılı olarak Bcl-2'nun serbestlenerek hücre sağkalımını tetikleyici rolünü daha etkin bir şekilde oynayabildiği öngörülebilir. Bununla birlikte bir diğer olasılık da taupati modelinde eğer otofaji tamamlanamıyor ise RIPK'lar ve ROS aracılığı ile nekroptozisin tetiklenmiş olmasıdır.

EBR uygulaması ile doğal tip ve taupati modeli hücrelerde α alt ünitesinin anlatımı düşmesine karşın aktive edici fosforilasyon seviyesi aktive edici fosforilasyon seviyesi çok değişmediği gösterilen AMPK α aynı zamanda bir tau kinazıdır. Bu durum 10 μ M EBR uygulaması ile doğal tip hücrelerde tetiklendiği gösterilen AMPK aktivasyonunun taupati modelinde de söz konusu olabileceği, ancak bir negatif geri bildirim mekanizması olarak zamanla AMPK α yıkılımının tetiklendiğini gösteriyor olabilir. Bu durum AMPK α 'nın inhibisyonunu gerçekleştiren Akt 'ın taupati modeline 10 μ M EBR uygulaması ile inhibe olması ile de desteklenmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda AMPK'nın AH patolojisinde anormal aktivasyonunun gözlenmesi söz konusudur. Domise ve ark. (2016) farelerden elde ettikleri birincil nöral kültürde AMPK aktivasyonunun tau fosforilasyonunu tetiklediğini, inaktive edilmesinin ise hızlı bir şekilde tau fosforilasyonunu geri çektiği gösterilmiştir. AMPK'nın α alt ünitesini sentezlemeyen fare modellerin de tau fosforilasyonunun düştüğü gösterilmiştir. Buna paralel olarak da P301S taupati modeli farelerde de AMPK eksikliğinin tau patolojisini engellediği gösterilmiştir (Domise ve ark, 2016). Ancak yaptığımız tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda literatürdeki tau anlatımının dışsal olarak tetiklenmesi ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak GSK3 aktivitesinin artması, diğer literatür verileri ile uyumlu olarak otofajinin tetiklenmesi ancak lizozomal aktivitenin taupati modelinde yüksek olmaması, hücre sağkalımının tetiklenmesi için otofajinin daha güçlü teşvikini gerektirmektedir. Bununla birlikte 10 μ M EBR uygulaması ile taupati modelinde AMPK α aktivasyonunun tetiklenmesi hem otofajinin teşviki hem de GSK3'ün inhibisyonunu aracılığı ile tau hiperfosforilasyonunun geri çekilmesi ve lizozomal aktivitenin arttırılması açısından hücre sağkalımını tetikleyici bir rol oynadığını göstermektedir.

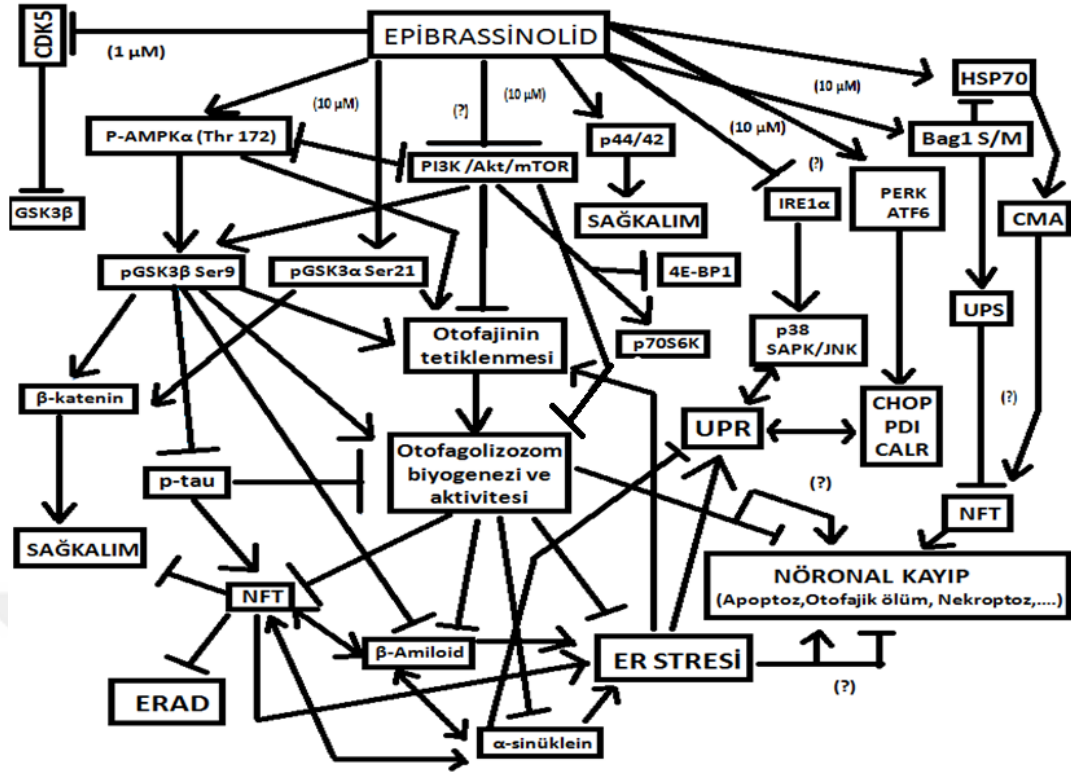
Steroid türevlerinin nörokoruyucu etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Örneğin 22R-OHC stabil analogu kaprosipinol ve türevlerinin A β toksisitesine karşı koruyucu mekanizmaları olduğu gösterilmiştir. Kaprosipinol'ün nörokoruyucu etkisininin; A β bağlayıcısı veya A β agregasyon inhibitörü olarak, A β plaklarının ortadan kaldırılmasını teşvik ederek ya da mitokondri üzerinde koruyucu işlev göstererek yaptığı öngörülmektedir (Papadopoulos ve Lecanu 2012). Kadınlarda AH gelişiminin fazla olmasında öne sürülen mekanizmalardan olan menapoz ile birlikte östrojen seviyesinin düşmesi, östrojen türevlerinin nörokoruyucu etkisini gösteren basit bir örnektir. Yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre seks steroid hormonları GSK3'ün inhibe edici fosforilasyonunu tetiklemekte, bununla birlikte GSK3 seks steroid hormonlarının aktive edici veya inhibe edici fosforilasyonlarını tetiklemektedir (Grisouard ve Mayer, 2009). Bununla birlikte P. Cardona-Gomez ve ark. (2004) fare hipokampuslarından aldıkları örnekler ile yaptıkları çalışmada östrojen türevi estradiyol'ün, ÖR/PI3K p85/AKT/GSK3/ β -katenin/tau kompleksi aracılığıyla; GSK3 inhibisyonunu ile tau defosforilasyonunu ve β -katenin nüklear göçünü tetikleyerek nörokoruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (Cardona-Gomez ve ark, 2004). Benzer bir çalışmada Goodenough ve ark. (2005), *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve fare hipokampusünden alınan örnekler ile yaptıkları çalışmada; östrojen türevi 17 β -estradiyol'ün ÖR aracılığı GSK3 β inhibisyonunun tetikleyerek tau hiperfosforilasyonu ve birikimini engellediği gösterilmiştir (Goodenough ve ark, 2005). Merot ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada ÖR α 'nın PC12 hücrelerinde nöral farklılaşmada önemli rol oynadığı ve nörokoruyucu işlev yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca östrojenin nörokoruyucu etkisi MAPK, PI3K ve PKC aktivasyonları ile bağdaştırılmaktadır (Mérot ve ark, 2005).

Yapılan çeşitli çalışmalarda androjenin; AR aracılığı ile A β katabolizmasını sağlayan neprilizin enziminin aktivitesinin düzenlenmesi ve aromataz enzimi ile β -estradiyol'e dönüştürülerek ÖR aracılı APP'nin amiloidik yıkımını baskılayarak nörokoruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte erkeklerde yaşlanma ile birlikte androjen seviyesinin azalması ve A β üretimini özgün reseptörüne bağlanarak tetiklediği düşünülen lüteinize edici hormon seviyesinin artması ile AH riskinin tetiklediği gösterilmiştir (Rosario ve Pike, 2008). Flavanoidler, östrojen benzeri etki gösteren fitoöstrojenlerdir. R.C.Y.Choi ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarda baikalein ve daidzein isimli iki flavanoidin; MCF7 meme kanseri hücrelerinde

ÖR'nin aktive edici fosforilasyonunu ve DNA'daki östrojen cevap elementinin aktivasyonunu sağladığını belirlemişler, daha sonra PC12 hücrelerinde A β teşvikli sitotoksiteyi engellediğini göstermişlerdir (R. C. Y. Choi ve ark, 2013).

Hormon replasman tedavilerinin NFT oluşumunu GSK3 β üzerinden baskıladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir, ancak bu tedavi bazı kanser çeşitlerinin riskini arttırmaktadır. Tibolon; östrojenik, androjenik ve progesteronejik etki gösterdiği tespit edilen yapay bir steroid türevidir. Neri -Gomez ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada hormon replasman tedavisinin kanser riskini azaltmak için yaşlı erkek farelerde Tibolon kullanımının uzun süreli etkisini göstermek istemişlerdir. Sonuçta Tibolon uygulaması ile farelerin hipokampusünden elde edilen örneklerde; hiperfosforile tau miktarının azaldığı, ancak PI3K ve GSK3 β 'nin aktive formlarının miktarının değişmediği, Akt anlatımı ve aktive edici fosforilasyonlarının azaldığı, CDK5 anlatımının düşük dozlarda arttığı, yüksek dozlarda azaldığı, buna karşın CDK5'in düzenleyicilerinden p35 formunun arttığı, CDK5'in hiperaktivasyonunu sağlayan p25 seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir (Neri-Gómez ve ark, 2017). Bu sonuçlar farklı dozlarda EBR uygulaması ile CDK 5, PI3K/ Akt/mTOR sinyal yolağı farklı şekilde etkilenmesi ve tau hiperfosforilasyonunun azalması açısından bizim bulgularımız ile benzerlik göstermekte, ancak bizim elde ettiğimiz sonuçlarda GSK3 inhibisyonunun gözlenmesi açısından farklılık göstermektedir.

EBR'nin etkinliğinin birincil taupati modeli oluşturulmuş *in vitro* modellerde incelenmesi ve moleküler yavaşma analizlerinin yapılmamış olması nedeni ile tam olarak hangi sınıfta bir taupati ve AH töröpötiği olabileceği şu noktada söylenememektedir. Bununla birlikte EBR'nin düşük dozlarında PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibitörü, AMPK α aktivatörü, bununla paralel olarak bir GSK3 inhibitörü olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca EBR uygulamasının ER stres ve otofaji yolakları üzerinde hücre sağkalımını tetikleyecek şekilde, GSK3 inaktivasyonu ve tau birikiminin engellenmesi ile de ilişkili olarak düzenleyici bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Buna göre; hücre içerisindeki bazı temel moleküler mekanizmaların birbirleri ile etkileşimleri, proteinopatilerin bu sinyal yolakları üzerindeki etkisi, ER stres ve otofajinin birbirleri ve hücre sağkalımı ile olası etkileşimleri ile yaptığımız çalışma sonucu EBR'nin taupati modeli oluşturulmuş hücrelerdeki olası moleküler hedefleri Şekil 5.1'de özetlenmiştir.



Şekil 5 1 EBR'nin taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerindeki etkinliğinin olası moleküler mekanizması.

Steroid yapısı gereği EBR'nin BBB'den geçişinin söz konusu olabileceği öngörülmektedir ve bu teori *in vivo* fare modellerinde desteklenecektir. Halihazırda daha yüksek dozlarının anti-kanser etkinliği ile ilgili pek çok yayın çıkarılan EBR'nin düşük dozlarının zamana bağlı olarak ilk 24 saat içerisinde bölünerek, daha sonra da hücre sağkalımının tetiklendiği gösterilen 48, 72 ve 96 saat uygulanması ile ilgili immunoblotlama analizleri ER stres, otofaji ve hücre sağkalımı arasındaki ince ayar mekanizmasına etkisi daha net bir şekilde gösterilir. Ayrıca nöral benzeri hücreler dışında birincil nöral kültür veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde EBR'nin nörokoyucu etkinliği daha doğru bir şekilde incelenebilir. Bununla birlikte *in vivo* C.elegans modellerinde gösterilen EBR'nin nörokoyucu etkinliği taupati veya AH modeli fareler gibi daha gelişmiş model organizmalarda incelenebilir. Bunun yanında farklı proteinopati modellerinde de GSK3 inhibitörü, PERK üzerinden ER stres aktivatörü veya otofajiyi tetikleyici etkinliği aracılığı ile nörokoyucu etkinlerinin irdelenmesi EBR'nin daha geniş bir yelpazede kullanımını mümkün kılabiliceği düşünülmektedir.

6 KAYNAKÇA

- Abdul, H. M., Furman, J. L., Sama, M. a, Mathis, D. M., & Norris, C. M. (2010). NFATs and Alzheimer's Disease. *Molecular and Cellular Pharmacology*. <https://doi.org/10.4255/mcpharmacol.10.02>
- Alafuzoff, I., & Hartikainen, P. (2017). Alpha-synucleinopathies. In *Handbook of Clinical Neurology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00024-9>
- An, W. L., Bjorkdahl, C., Liu, R., Cowburn, R. F., Winblad, B., & Pei, J. J. (2005). Mechanism of zinc-induced phosphorylation of p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase 3 β in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02948.x>
- An, Y., Zhang, C., He, S., Yao, C., Zhang, L., & Zhang, Q. (2008). Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer's disease. *Life Science Journal*.
- Anvekar, R. A., Ascioffa, J. J., Missert, D. J., & Chipuk, J. E. (2011). Born to be Alive: A Role for the BCL-2 Family in Melanoma Tumor Cell Survival, Apoptosis, and Treatment. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2011.00034>
- Arribas, R. L., Alejandro, R., Javier, E., & Ríos, C. de los. (2018). Modulation of serine/threonine phosphatases by melatonin: therapeutic approaches in neurodegenerative diseases. *British Journal of Pharmacology*, 175, 3220–3229. <https://doi.org/10.1111/bph.14365>
- ATCC. (2016). Cell Culture Guides. *ATCC Online*.
- Azoulay-Alfaguter, I., Elya, R., Avrahami, L., Katz, A., & Eldar-Finkelman, H. (2015). Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.390>
- Badiola, N., de Oliveira, R. M., Herrera, F., Guardia-Laguarta, C., Gonçalves, S. A., Pera, M., ... Lleó, A. (2011). Tau enhances α -synuclein aggregation and toxicity in cellular models of synucleinopathy. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026609>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Baranello, R. J., Bharani, K. L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D. K., Greig, N. H., ... Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation

- (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. <https://doi.org/10.2174/1567205012666141218140953>
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., ... Zhang, J. (2017). UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- Becraft, P. W. (2001). Plant steroids recognized at the cell surface. *Trends in Genetics*. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02165-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02165-X)
- Bedse, G., Di Domenico, F., Serviddio, G., & Cassano, T. (2015). Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: Current knowledge. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00204>
- Beraldo, F. H., Ostapchenko, V. G., Caetano, F. A., Guimaraes, A. L. S., Ferretti, G. D. S., Daude, N., ... Prado, M. A. M. (2016). Regulation of amyloid β oligomer binding to neurons and neurotoxicity by the prion protein-mGluR5 complex. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738286>
- Bermales, S., Soto, M. M., & McCullagh, E. (2012). Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: A role in neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00005>
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI24761>
- Boonyaratanakornkit, V., & Edwards, D. P. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Seminars in Reproductive Medicine*. <https://doi.org/10.1055/s-2007-973427>
- Bosco, D., Fava, A., Plastino, M., Montalcini, T., & Pujia, A. (2011). Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01318.x>
- Bretteville, A., Marcouiller, F., Julien, C., El Khoury, N. B., Petry, F. R., Poitras, I., ... Planel, E. (2012). Hypothermia-induced hyperphosphorylation: A new model to study tau kinase inhibitors. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep00480>
- Bretteville, A., Marcouiller, F., Julien, C., El Khoury, N. B., Petry, F. R., Poitras, I., ... Planel, E. (2012). Hypothermia-induced hyperphosphorylation: a new model to study tau kinase inhibitors. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep00480>
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.04.381>

- Bruch, J., Xu, H., Rösler, T. W., De Andrade, A., Kuhn, P., Lichtenthaler, S. F., ... Höglinger, G. U. (2017). PERK activation mitigates tau pathology *in vitro* and *in vivo*. *EMBO Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606664>
- Bulic, B., Pickhardt, M., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2010). Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.016>
- Cabral-Miranda, F., & Hetz, C. (2017). ER stress in neurodegenerative disease: from disease mechanisms to therapeutic interventions. *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases*. <https://doi.org/10.1515/ersc-2017-0002>
- Cai, Y., Arikath, J., Yang, L., Guo, M. L., Periyasamy, P., & Buch, S. (2016). Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders. *Autophagy*. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1121360>
- Cai, Z., Zhao, Y., & Zhao, B. (2012). Roles of Glycogen Synthase Kinase 3 in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*.
<https://doi.org/10.2174/156720512802455386>
- Carange, Julie; Longpre, Fanny; Daoust, Benoit; Martinoli, M.-G. (2011). 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of Toxicology*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/392859>
- Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L. M., & Wandosell, F. (2004). Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.10.008>
- Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Muñoz, M. J., Sengupta, U., Gerson, J. E., & Kaye, R. (2018). α -Synuclein Oligomers Induce a Unique Toxic Tau Strain. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.12.018>
- Castro-Alvarez, J. F., Uribe-Arias, A., Raigoza, D. M., & Cardona-Gómez, G. P. (2014). Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: A systems biology approach. *Frontiers in Aging Neuroscience*.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00232>
- Cataldo, J. K., Prochaska, J. J., & Glantz, S. A. (2010). Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's disease: An analysis controlling for tobacco industry affiliation. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1240>
- Chen, T., Tan, J., Wan, Z., Zou, Y., Afewerky, H. K., Zhang, Z., & Zhang, T. (2017). Effects of commonly used pesticides in China on the mitochondria and ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18122507>

- Chesser, A. S., Pritchard, S. M., & Johnson, G. V. W. (2013). Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00122>
- Cheung, Z. H., & Ip, N. Y. (2012). Cdk5: A multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.003>
- Chiasseu, M., Cueva Vargas, J. L., Destroismaisons, L., Vande Velde, C., Leclerc, N., & Di Polo, A. (2016). Tau Accumulation, Altered Phosphorylation, and Missorting Promote Neurodegeneration in Glaucoma. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3986-15.2016>
- Choi, A. M. K., Ryter, S. W., & Levine, B. (2013). Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>
- Choi, R. C. Y., Zhu, J. T. T., Yung, A. W. Y., Lee, P. S. C., Xu, S. L., Guo, A. J. Y., ... Tsim, K. W. K. (2013). Synergistic action of flavonoids, baicalein, and daidzein in estrogenic and neuroprotective effects: A development of potential health products and therapeutic drugs against alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2013/635694>
- Cook, C., Kang, S. S., Carlomagno, Y., Lin, W. L., Yue, M., Kurti, A., ... Fryer, J. D. (2015). Tau deposition drives neuropathological, inflammatory and behavioral abnormalities independently of neuronal loss in a novel mouse model. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv336>
- Cortés, N., Andrade, V., Guzmán-Martínez, L., Estrella, M., & Maccioni, R. B. (2018). Neuroimmune tau mechanisms: Their role in the progression of neuronal degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19040956>
- Crews, L., Tsigelny, I., Hashimoto, M., & Masliah, E. (2009). Role of synucleins in Alzheimer's disease. *Neurotoxicity Research*. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9073-6>
- Cummingsa, J., Garam, L., Travis, M., Aaron, R., & Kate, Z. (2017). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3, 367–384.
- D'Amelio, M., Sheng, M., & Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: Beyond apoptosis. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.004>
- Dale, J. M., & Garcia, M. L. (2012). Neurofilament Phosphorylation during Development and Disease: Which Came First, the Phosphorylation or the Accumulation? *Journal of Amino Acids*. <https://doi.org/10.1155/2012/382107>

- Dantuma, N. P., & Bott, L. C. (2014). The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00070>
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-204>
- Deka, B., & Singh, K. K. (2017). Multifaceted regulation of gene expression by the apoptosis- and splicing-associated protein complex and its components. *International Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18649>
- Deldicque, L. (2013). Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: Any contribution to sarcopenia? *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00236>
- Desai, A. K., & Chand, P. (2009). Tau-based therapies for Alzheimer's disease: wave of the future? *Primary Psychiatry*.
- Di, J., Cohen, L. S., Corbo, C. P., Phillips, G. R., El Idrissi, A., & Alonso, A. D. (2016). Abnormal tau induces cognitive impairment through two different mechanisms: Synaptic dysfunction and neuronal loss. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep20833>
- Domise, M., Didier, S., Marinangeli, C., Zhao, H., Chandakkar, P., Buée, L., ... Vingtdoux, V. (2016). AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep26758>
- Donatoa, Marzia Di; Bilancioa, Antonio; D'Amatoa, Loredana; Claudianib, P., & Olivieroa, Maria Antonietta; Baronec, Maria Vittoria; Auricchiob, Alberto; Appellad, Ettore ; Auricchioa, Antimo Migliaccioa Ferdinando; Castoriaa, G. (2015). Cross-talk between androgen receptor/filamin A and TrkA regulates neurite outgrowth in PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 26.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, & Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>
- Duran-Aniotz, C., Martínez, G., & Hetz, C. (2014). Memory loss in Alzheimer's disease: Are the alterations in the UPR network involved in the cognitive impairment? *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00008>
- Duthey, B. (2013). Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. In *A Public Health Approach to Innovation*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>

- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Fischer, P., Jungwirth, S., Zehetmayer, S., Weissgram, S., Hoenigschnabl, S., Gelpi, E., ... Tragl, K. H. (2007). Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000252358.03285.9d>
- Foster, K. G., Acosta-Jaquez, H. A., Romeo, Y., Ekim, B., Soliman, G. A., Carriere, A., ... Fingar, D. C. (2010). Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029637>
- Freland, L., & Beaulieu, J.-M. (2012). Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00014>
- Frezza, R. L., Lourenco, M. V., & de Felice, F. G. (2018). Challenges for Alzheimer's disease therapy: Insights from novel mechanisms beyond memory defects. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00037>
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>
- Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U., & Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S130514>
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., & Jiang, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>
- Gatica, D., Lahiri, V., & Klionsky, D. J. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0037-z>
- GeneCards. (2017). GeneCards HUMAN GENE DATABASE.
- Geschwind, M. D. (2015). Prion Diseases. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70192-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70192-7)
- Ghanemi, A. (2015). Alzheimer's disease therapies: Selected advances and future perspectives. *Alexandria Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2014.09.006>

- Goedert, M., Masuda-Suzukake, M., & Falcon, B. (2017). Like prions: The propagation of aggregated tau and α -synuclein in neurodegeneration. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/aww230>
- Goodenough, S., Schleusner, D., Pietrzik, C., Skutella, T., & Behl, C. (2005). Glycogen synthase kinase 3 β links neuroprotection by 17 β -estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.029>
- Gorelick, P. B. (2004). Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. In *Stroke*. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143318.70292.47>
- Gorman, A. M. (2008). Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: Recurring themes around protein handling: Apoptosis Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00402.x>
- Graner, M. W., Lillehei, K. O., & Katsanis, E. (2015). Endoplasmic Reticulum Chaperones and Their Roles in the Immunogenicity of Cancer Vaccines. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00379>
- Grisouard, J., & Mayer, D. (2009). Specific involvement of glycogen synthase kinase-3 in the function and activity of sex steroid hormone receptors reveals the complexity of their regulation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.08.002>
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726>
- Halliday, M., Radford, H., Zents, K. A. M., Molloy, C., Moreno, J. A., Verity, N. C., ... Mallucci, G. R. (2017). Repurposed drugs targeting eIF2 α -P-mediated translational repression prevent neurodegeneration in mice. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awx074>
- Hanger, D. P., & Wray, S. (2010). Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST0381016>
- Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in Biological Regulation*. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003>
- Hetz, C., & Saxena, S. (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.99>
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., ... Liao, D. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>

- Hroudová, J., Singh, N., Fišar, Z., & Ghosh, K. K. (2016). Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.084>
- Hu, S., Begum, A. N., Jones, M. R., Oh, M. S., Beech, W. K., Beech, B. H., ... Frautschy, S. A. (2009). GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.007>
- Hu, X., Wang, T., & Jin, F. (2016). Alzheimer's disease and gut microbiota. *Science China Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5083-9>
- Hur, E. M., & Zhou, F. Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2870>
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.03.010>
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., & Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer Research*. <https://doi.org/10.2174/156720510793611592>
- Ismaili, J., Boisvert, M., Longpré, F., Carange, J., Gall, C. Le, Martinoli, M. G., & Daoust, B. (2012). Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: Synthesis and structure-activity relationships. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.10.009>
- Izzo, N. J., Staniszewski, A., To, L., Fa, M., Teich, A. F., Saeed, F., ... Catalano, S. M. (2014). Alzheimer's therapeutics targeting amyloid beta 1-42 oligomers I: A beta 42 oligomer binding to specific neuronal receptors is displaced by drug candidates that improve cognitive deficits. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111898>
- Kaidanovich-Beilin, O., & Woodgett, J. R. (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00040>
- Kamat, P. K., Rai, S., Swarnkar, S., Shukla, R., Ali, S., Najmi, A. K., & Nath, C. (2013). Okadaic acid-induced Tau phosphorylation in rat brain: Role of NMDA receptor. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.075>
- Kawakami, F., & Ichikawa, T. (2015). The role of α -synuclein and LRRK2 in tau phosphorylation. *Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.1155/2015/734746>
- Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gatteringer, T., ... Kuhle, J. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>

- Khanahmadi, M., Farhud, D. D., & Malmir, M. (2015). Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article. *Iranian Journal of Public Health*.
- Khandelwal, P. J., Dumanis, S. B., Herman, A. M., Rebeck, G. W., & Moussa, C. E. H. (2012). Wild type and P301L mutant Tau promote neuro-inflammation and α -Synuclein accumulation in lentiviral gene delivery models. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.09.002>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., ... Bryant, S. H. (2016). The PubChem Project. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kirouac, L., Rajic, A. J., Cribbs, D. H., & Padmanabhan, J. (2017). Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Eneuro*. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0149-16.2017>
- Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Ikonomovic, M. D., Skoko, J., Lefterov, P. I., Isanski, B. A., ... Lazo, J. S. (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid β secretion. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300044200>
- Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Staufenbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J. C., ... Lazo, J. S. (2005). The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid β production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411420200>
- Koppula, S., Kumar, H., More, S. V., Kim, B. W., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2012). Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms130810608>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., ... Melino, G. (2009). Classification of Cell Death. *Cell Death & Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kvasnica, M., Oklestkova, J., Bazgier, V., Rarova, L., Berka, K., & Strnad, M. (2014). Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.04.007>
- Lackie, Rachel E.; Andrzej Maciejewski, Andrzej; Ostapchenko, V. G., Marques-Lopes, Jose; Choy, Wing-Yiu; Duennwald, Martin L.; Prado, V. F. and, & Prado, M. A. M. (2017). The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 11(254), 1–23.
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>

- Lee, J. K., & Kim, N. J. (2017). Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules22081287>
- Lee, M. J., Lee, J. H., & Rubinsztein, D. C. (2013). Tau degradation: The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.001>
- Lee, S., Pant, H. C., & Shea, T. B. (2014). Divergent and convergent roles for kinases and phosphatases in neurofilament dynamics. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.153346>
- Lee, Wen-Ching; Kan, Daphne; Chen, Yun Yu; Han, Shan-Kuo; Lu, Kuo-Shyan, and Chien, C.-L. (2012). Suppression of Extensive Neurofilament Phosphorylation Rescues a-Internexin/Peripherin-Overexpressing PC12 Cells from Neuronal Cell Death. *PLOS ONE*, 7(8).
- Lemus, L., & Goder, V. (2014). Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells3030824>
- Lester, E., & Parker, R. (2018). The Tau of Nuclear-Cytoplasmic Transport. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.026>
- Leyk, J., Goldbaum, O., Noack, M., & Richter-Landsberg, C. (2015). Inhibition of HDAC6 Modifies Tau Inclusion Body Formation and Impairs Autophagic Clearance. *Journal of Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0460-y>
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., ... Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>
- Li, X., & Jope, R. S. (2010). Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.105>
- Lim, S., Haque, M. M., Kim, D., Kim, D. J., & Kim, Y. K. (2014). Cell-based models to investigate Tau aggregation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.09.011>
- Liu, C. C., Lin, Y. C., Chen, Y. H., Chen, C. M., Pang, L. Y., Chen, H. A., ... Chen, R. H. (2016). Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.001>
- Liu, D., & Xu, Y. (2011). p53, Oxidative Stress, and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3644>

- Liu, Q. (2011). Neurofilamentopathy in Neurodegenerative Diseases. *The Open Neurology Journal*. <https://doi.org/10.2174/1874205X01105010058>
- Ly, P. T. T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., ... Song, W. (2013). Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI64516>
- Maina, M. B., Al-Hilaly, Y. K., & Serpell, L. C. (2016). Nuclear tau and its potential role in alzheimer's disease. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom6010009>
- Maiti, P., Manna, J., Veleri, S., & Frautschy, S. (2014). Molecular chaperone dysfunction in neurodegenerative diseases and effects of curcumin. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/495091>
- Majd, S., Power, J. H., & Grantham, H. J. M. (2015). Neuronal response in Alzheimer's and Parkinson's disease: The effect of toxic proteins on intracellular pathways. *BMC Neuroscience*. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0211-1>
- Malíková, J., Swaczynová, J., Kolář, Z., & Strnad, M. (2008). Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.028>
- Mariappan, M. M., Shetty, M., Sataranatarajan, K., Choudhury, G. G., & Kasinath, B. S. (2008). Glycogen synthase kinase 3 β is a novel regulator of high glucose- and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801756200>
- Marsh, S. E., & Blurton-Jones, M. (2012). Examining the mechanisms that link β -amyloid and α -synuclein pathologies. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/alzrt109>
- Masters. (2016). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Matarin, M., Salih, D. A., Yasvoina, M., Cummings, D. M., Guelfi, S., Liu, W., ... Edwards, F. A. (2015). A Genome-wide gene-expression analysis and database in transgenic mice during development of amyloid or tau pathology. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.041>
- Matthews-Roberson, T. A., Quintanilla, R. A., Ding, H., & Johnson, G. V. W. (2008). Immortalized cortical neurons expressing caspase-cleaved tau are sensitized to endoplasmic reticulum stress induced cell death. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.111>
- Mattsson, N., Insel, P. S., Palmqvist, S., Portelius, E., Zetterberg, H., Weiner, M., ... Hansson, O. (2016). Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament

light in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606540>

Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L., & Charvet, C. (2014). GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. *Journal of Cell Science*.
<https://doi.org/10.1242/jcs.138057>

Mendiola-Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K., & Garcia-Alcocer, G. (2016). Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2016/2589276>

Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., ... Rubinsztein, D. C. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>

Mérot, Yohann ; Ferrière, François; Debroas, Edith; Flouriot, Gilles ; Duval, D., & Christian, S. (2005). Estrogen receptor alpha mediates neuronal differentiation and neuroprotection in PC12 cells: critical role of the A/B domain of the receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 35, 257–267.
<https://doi.org/10.1677/jme.1.01826>

Metcalf, C., & Bienz, M. (2011). Inhibition of GSK3 by Wnt signalling - two contrasting models. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.091991>

Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., & Niewiadomska, G. (2014). Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/ijms15034671>

Miller, E. C., Teravskis, P. J., Dummer, B. W., Zhao, X., Haganir, R. L., & Liao, D. (2014). Tau phosphorylation and tau mislocalization mediate soluble A β oligomer-induced AMPA glutamate receptor signaling deficits. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.12507>

Motoi, Y., Shimada, K., Ishiguro, K., & Hattori, N. (2014). Lithium and autophagy. *ACS Chemical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1021/cn500056q>

Moussaud, S., Jones, D. R., Moussaud-Lamodière, E. L., Delenclos, M., Ross, O. A., & McLean, P. J. (2014). Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Molecular Neurodegeneration*.
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-43>

Müller, M., Lu, K., & Reichert, A. S. (2015). Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.024>

Neri-Gómez, T., Espinosa-Raya, J., Díaz-Cintra, S., Segura-Urbe, J., Orozco-Suárez, S., & Gallardo, J. M. (2017). Tibolone modulates neuronal plasticity through regulating Tau, GSK3 β /Akt/PI3K pathway and CDK5 p35/p25

complexes in the hippocampus of aged male mice. *Neural Regeneration Research.*, 12(4), 588–595.

- Nijholt, D. A. T., De Graaf, T. R., Van Haastert, E. S., Oliveira, A. O., Berkers, C. R., Zwart, R., ... Scheper, W. (2011). Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: Implications for Alzheimer's disease. *Cell Death and Differentiation*.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2010.176>
- Nisbet, R. M., Polanco, J. C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid- β . *Acta Neuropathologica*.
<https://doi.org/10.1007/s00401-014-1371-2>
- Nomura, J., Hosoi, T., Kaneko, M., Koichiro, O., Nishi, A., & Yasuyuki, N. (2016). Neuroprotection by Endoplasmic Reticulum Stress-Induced HRD1 and Chaperones: Possible Therapeutic Targets for Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Medical Sciences*, 4(14), 1–12. <https://doi.org/10.3390/medsci4030014>
- Norfolk volunteers needed to help power fight against dementia. (n.d.). Retrieved from <https://www.alzheimersresearchuk.org>
- O'Brien, R. J., Wong, P. C. (2016). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
- Obakan, P., Arisan, E. D., Calcabrini, A., Agostinelli, E., Bolkent, Ş., & Palavan-Unsal, N. (2014). Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1574-1>
- Obakan, P., Barrero, C., Coker-Gurkan, A., Arisan, E. D., Merali, S., & Palavan-Unsal, N. (2015). SILAC-based mass spectrometry analysis reveals that epibrassinolide induces apoptosis via activating endoplasmic reticulum stress in prostate cancer cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135788>
- Obakan-Yerlikaya, P., Arisan, E. D., Coker-Gurkan, A., Adacan, K., Ozbey, U., Somuncu, B., ... Palavan-Unsal, N. (2017). Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*.
<https://doi.org/10.1002/mc.22616>
- Oikawa, T., Nonaka, T., Terada, M., Tamaoka, A., Hisanaga, S. I., & Hasegawa, M. (2016). α -Synuclein fibrils exhibit gain of toxic function, promoting tau aggregation and inhibiting microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736355>
- Okamoto, K. (2014). Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201402054>

- Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Matsubara, K., & Nomura, Y. (2013). Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: The role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2013/239854>
- Pacheco, C. D., Elrick, M. J., & Lieberman, A. P. (2009). Tau normal function influences Niemann-Pick type C disease pathogenesis in mice and modulates autophagy in NPC1-deficient cells. *Autophagy*. <https://doi.org/10.4161/auto.5.4.8364>
- Pajaud, J., Kumar, S., Rauch, C., Morel, F., & Aninat, C. (2012). Regulation of Signal Transduction by Glutathione Transferases. *International Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1155/2012/137676>
- Papadopoulos, V., & Lecanu, L. (2012). Caprospinol: Discovery of a steroid drug candidate to treat Alzheimer's disease based on 22R-hydroxycholesterol structure and properties. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02167.x>
- Parr, C., Carzaniga, R., Gentleman, S. M., Van Leuven, F., Walter, J., & Sastre, M. (2012). Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Lysosomal Biogenesis and Autophagic Degradation of the Amyloid- Precursor Protein. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.00930-12>
- Parr, C.; Mirzaei, N.; Christian, M. and Sastre, M. (2015). Activation of the Wnt/ -catenin pathway represses the transcription of the - amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter. *The FASEB Journal*, 29, 623–635.
- Pei, J. J., Björkdahl, C., Zhang, H., Zhou, X., & Winblad, B. (2008). p70 S6 kinase and tau in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-14405>
- Perez, M., Santa-Maria, I., De Barreda, E. G., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J. R., ... Avila, J. (2009). Tau - An inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x>
- Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M., & Atkin, J. D. (2016). The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343402>
- Polito, V. A., Li, H., Martini-Stoica, H., Wang, B., Yang, L., Xu, Y., ... Zheng, H. (2014). Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303671>
- Povellato, G., Tuxworth, R. I., Hanger, D. P., & Tear, G. (2014). Modification of the Drosophila model of in vivo Tau toxicity reveals protective phosphorylation by GSK3 . *Biology Open*. <https://doi.org/10.1242/bio.20136692>

- Prasanthi, J. R. P., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., & Ghribi, O. (2009). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on β -amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-1>
- Proctor, C. J., & Gray, D. A. (2010). GSK3 and p53 - Is there a link in Alzheimer's disease? *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-7>
- Puertollano, R., Ferguson, S. M., Brugarolas, J., & Ballabio, A. (2018). The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/embj.201798804>
- Rao, K., Guerrero, E., Collen, T., Vasudevaraju, P., Hegde, M., & Britton, G. (2012). New evidence on α -synuclein and Tau binding to conformation and sequence specific GCFNx01 rich DNA: Relevance to neurological disorders. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.94811>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Riederer, B. M., Leuba, G., Vernay, A., & Riederer, I. M. (2011). The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010327>
- Rine, J. (2014). A future of the model organism model. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0768>
- Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>
- Rodolfo, C., Ciccocanti, F., Giacomo, G. Di, Piacentini, M., & Fimia, G. M. (2010). Proteomic analysis of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Expert Review of Proteomics*. <https://doi.org/10.1586/epr.10.43>
- Rosario, E. R., & Pike, C. J. (2008). Androgen regulation of β -amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.012>
- Rossi, G., Redaelli, V., Contiero, P., Fabiano, S., Tagliabue, G., Perego, P., ... Tagliavini, F. (2018). Tau mutations serve as a novel risk factor for cancer. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3175>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>

- Sardi, F., Fassina, L., Venturini, L., Inguscio, M., Guerriero, F., Rolfo, E., & Ricevuti, G. (2011). Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmunity Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.09.005>
- Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST20130134>
- Schäfer, M. K. E., Pfeiffer, A., Jaeckel, M., Pouya, A., Dolga, A. M., & Methner, A. (2014). Regulators of mitochondrial Ca²⁺homeostasis in cerebral ischemia. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1807-y>
- Schlachetzki, J. C. M., Saliba, S. W., & de Oliveira, A. C. P. (2013). Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1159>
- Sengupta, U., Guerrero-Muñoz, M. J., Castillo-Carranza, D. L., Lasagna-Reeves, C. A., Gerson, J. E., Paulucci-Holthauzen, A. A., ... Kayed, R. (2015). Pathological Interface between Oligomeric Alpha-Synuclein and Tau in Synucleinopathies. *Biological Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.019>
- Sevrioukova, I. F. (2011). Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3445>
- Shah, K., & Lahiri, D. K. (2014). Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.147553>
- Shukla, V., Skuntz, S., & Pant, H. C. (2012). Deregulated Cdk5 Activity Is Involved in Inducing Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.10.015>
- Snow, W. M., & Albeni, B. C. (2016). Neuronal Gene Targets of NF-κB and Their Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00118>
- Song, J. H. (2006). Human Astrocytes Are Resistant to Fas Ligand and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptosis. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010875>
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200108057>

- Stretton, C., Hoffmann, T. M., Munson, M. J., Prescott, A., Taylor, P. M., Ganley, I. G., & Hundal, H. S. (2015). GSK3-mediated raptor phosphorylation supports amino-acid-dependent mTORC1-directed signalling. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20150404>
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., ... Galas, M. C. (2011). Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., ... Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: Implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0077-5>
- Sweeney, S. E., & Firestein, G. S. (2007). Primer: Signal transduction in rheumatic disease - A clinician's guide. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0631>
- Taga, M., Mouton-Liger, F., Paquet, C., & Hugon, J. (2011). Modulation of oxidative stress and tau phosphorylation by the mTOR activator phosphatidic acid in SH-SY5Y cells. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.022>
- Tait, S. W. G., Ichim, G., & Green, D. R. (2014). Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>
- Takahashi, M., Miyata, H., Kametani, F., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S. ichi, & Hasegawa, M. (2015). Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1415-2>
- Tang, J., Han, Z., & Chai, J. (2016). Q&A: What are brassinosteroids and how do they act in plants. *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0340-8>
- Tenreiro, Sandra;Eckermann, Katrin; F.Outeiro, T. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Frontiers in Molecular Neuroscience Neuroscience*, 7(42).
- Thompson, A. G. B., Luk, C., Heslegrave, A. J., Zetterberg, H., Mead, S. H., Collinge, J., & Jackson, G. S. (2018). Neurofilament light chain and tau concentrations are markedly increased in the serum of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, and tau correlates with rate of disease progression. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317793>
- Thuerauf, D. J., Marcinko, M., Belmont, P. J., & Glembotski, C. C. (2007). Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 α and ATF6 β on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701213200>

- Timmins, J.M.; Ozcan, L.; Seimon, T.A.; Li, G.; Malagelada, C., Backs, J.; Backs, T.; Duby, R.B.; Olson, E. N., & Anderson, M.A. and Tabas, I. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*, 2925–2941.
- Van Helleputte, L., Benoy, V., & Van Den Bosch, L. (2014). The role of histone deacetylase 6 (HDAC6) in neurodegeneration. *Research and Reports in Biology*. <https://doi.org/10.2147/RRB.S35470>
- Vance, J. E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease Models & Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.010124>
- Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., ... Rey, F. E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13601-y>
- Vukašinovic, Nemanja; Russinova, E. (2018). BRexit: Possible Brassinosteroid Export and Transport Routes. *Trends in Plant Science*, *xx(yy)*, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.005>
- Wang, H., Tan, M. S., Lu, R. C., Yu, J. T., & Tan, L. (2014). Heat Shock Proteins at the Crossroads between Cancer and Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/239164>
- Wang, W. Y., Tan, M. S., Yu, J. T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>
- Wang, W.-L., Dai, R., Yan, H., Han, C., & Liu, L. (2015). Current situation of PC12 cell use in neuronal injury study. *International Journal of Biotechnology of Wellness Industries*.
- Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wang, Yipeng; Martinez-Vicente, Marta; Kruger, Ulrike; Kaushik, Susmita; Wong, E., & Mandelkow, Eva Maria; Cuervo, Ana Maria; Mandelkow, E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Human Molecular Genetics*, *18(21)*, 4153–4170.
- Weizmann Institute of Science. (2017). Genecards; RET.
- Westerink, R. H. S., & Ewing, A. G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. In *Acta Physiologica*. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01805.x>

- Wischik, C. M., Harrington, C. R., & Storey, J. M. D. (2014). Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.008>
- Wolf, A. B., Valla, J., Bu, G., Kim, J., Ladu, M. J., Reiman, E. M., & Caselli, R. J. (2013). Apolipoprotein E as a β -amyloid-independent factor in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/alzrt204>
- World Health Organization - Global Health Observatory. (2016). Top 10 causes of death. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4641>
- Wray, S., & Lewis, P. A. (2010). A tangled web - tau and sporadic Parkinson's disease. *Frontiers in Psychiatry*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2010.00150>
- Wray, S., & Noble, W. (2009). Linking Amyloid and Tau Pathology in Alzheimer's Disease: The Role of Membrane Cholesterol in A β -Mediated Tau Toxicity. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2234-09.2009>
- Xu, P., Li, Z., Wang, H., Zhang, X., & Yang, Z. (2015). Triptolide inhibited cytotoxicity of differentiated PC12 cells induced by amyloid-beta₂₅₋₃₅ via the autophagy Pathway. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142719>
- Yao, Z. X., Brown, R. C., Teper, G., Greeson, J., & Papadopoulos, V. (2002). 22R-hydroxycholesterol protects neuronal cells from β -amyloid-induced cytotoxicity by binding to β -amyloid peptide. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01202.x>
- Yates, B., Braschi, B., Gray, K. A., Seal, R. L., Tweedie, S., & Bruford, E. A. (2017). Genenames.org: The HGNC and VGNC resources in 2017. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1033>
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2012). Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.104729>
- Yuan, S. H., Hiramatsu, N., Liu, Q., Sun, X. V., Lenh, D., Chan, P., ... Lin, J. H. (2018). Tauopathy-associated PERK alleles are functional hypomorphs that increase neuronal vulnerability to ER stress. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy297>
- Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays In Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/EBC20170021>
- Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.004>
- Zarrouk, A., Debbabi, M., Bezine, M., Karym, E. M., Badreddine, A., Rouaud, O., ... Lizard, G. (2017). Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170505101426>

- Żekanowski, C., & Wojda, U. (2009). Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*.
- Zhang, Y. (2004). Estrogen and Androgen Protection of Human Neurons against Intracellular Amyloid 1-42 Toxicity through Heat Shock Protein 70. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0913-04.2004>
- Zhang, Y., Chen, X., Zhao, Y., Ponnusamy, M., & Liu, Y. (2017). The role of ubiquitin proteasomal system and autophagy-lysosome pathway in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0013>
- Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H., & Wang, X. (2016). Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00303>
- Zhu, J., Li, W., & Mao, Z. (2011). Cdk5: Mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage. *Mechanisms of Ageing and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.04.011>

7 EKLER

7.1 KULLANILAN CİHAZLAR

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler kullanılan cihazlar Tablo 7.1'de gösterilmiştir.

Tablo 7. 1 Kullanılan Cihazlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Santrüfjü	5417R	Eppendorf
Santrifjü (Büyük)	5810R	Eppendorf
Spin minispın plus	SN0708	LabNet
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5 µl-10 µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20 µl-200 µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200 µl-1000 µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu (-80 °C)	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Nanodrop		BO-GA
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell 150	Thermo
Fluoresan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6

Santrifüj	NF 200	Nüve
DRY BATH İNKÜBATÖR	010410-1109-0157	bioSan
Kuru Blok Isıtıcı		BO-GA
Dondurucu (-20 °C)		Arçelik

7.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI

Tez çalışması kapsamında hücre doku kültüründe kullanılan malzemeler Tablo 7.2'de gösterilmiştir.

Tablo 7. 2 Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25 santimetrekarelik hücre büyütme kapları	90026	TPP
75 santimetrekarelik hücre büyütme kapları	90076	TPP
Steril pipetler (5 ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10 ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0,22µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
RPMI 1640	PO4-18947	PAN BIOTECH
PC12 hücreleri		ATCC
Hemositometre		Neubauer

7.3 KULLANILAN KİMYASALLAR

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerde kullanılan kimyasallar Tablo 7.3'de gösterilmiştir.

Tablo 7. 3 Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
24-Epibrassinolid	BIE0244	APOLLO Scientific Limited
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
PVDF Membran (0,45 µm)	10600023	Amersham
PVDF Membran (0,20 µm)	10600021	Amersham
TEMED	A1148,0100	Applichem
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue	A3480	Applichem
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
DiOC6	2129966	Fluka
DCFH-DA	C6827	Invitrogen
PI	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Mitotracker	488317	Invitrogen
Lysotracker	L7528	Invitrogen
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
SDS	UN1 888	Applichem
PBS	BE17-51-5F	LONZA
Tris-HCL	648317	CALBIOCHEM
BSA	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
Akrilamid/Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem

MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Tween 20	S6740684 348	MERCK
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Ponceau Red	A1405	Appllichem
HCL	K438047117 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Çamaşır suyu		ACE
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Bakır sülfat	02791	MERCK
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Super Block T20	37536	Thermo
Acridine Orange		
Tripan mavisi		

7.4 KULLANILAN ANTİKORLAR

Tez çalışması kapsamında immunoblotlama yönteminde kullanılan antikolar ve kitlerin listesi Tablo 7.4'de gösterilmiştir.

Tablo 7. 4 Kullanılan antikoların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Phospo-GSK3 β (Ser9)	9336	Cell Signaling Technology
CDK5	2506	Cell Signaling Technology
Alzheimer's Disease Antibody Sampler Kit	9784	Cell Signaling Technology
HSP/Chaperone Antibody Sampler Kit	9965	Cell Signaling Technology
ER Stress Antibody Sampler Kit	9956	Cell Signaling Technology
Calreticulin	12238	Cell Signaling Technology
Wnt Signaling Antibody Sampler Kit	2915	Cell Signaling Technology
mTOR Regulation Antibody Sampler Kit	9864	Cell Signaling Technology

ULK1 Antibody Sampler Kit	8359	Cell Signaling Technology
mTOR Substrates Antibody Sampler Kit	9862	Cell Signaling Technology
mTOR Pathway Antibody Sampler Kit	9964	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt Pathway Antibody Sampler Kit	9916	Cell Signaling Technology
Pro-Apoptosis Bcl-2 Family Antibody Sampler Kit	9942	Cell Signaling Technology
Stress and Apoptosis Antibody Sampler Kit	8357	Cell Signaling Technology
Phospho-p53 Pathway Antibody Sampler Kit	9919	Cell Signaling Technology
NF- κ B Family Member Antibody Sampler Kit	4766	Cell Signaling Technology
MAPK Family Antibody Sampler Kit	9926	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr 202/Tyr204)	4370	Cell Signaling Technology
PI3 Kinase Antibody Sampler Kit	9655	Cell Signaling Technology
Auophagy Antibody Sampler Kit	4445	Cell Signaling Technology
Loading Control Antibody Sampler Kit	4670	Cell Signaling Technology

7.5 KULLANILAN KİTLER

Tez çalışması kapsamında plazmid izolasyonu, nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu ve Anneksin-V/PI akış sitometresi analizlerinde kullanılan kitler Tablo 7.5'de gösterilmiştir.

Tablo 7. 5 Kullanılan kitlerin listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Zymo PURE™ Plasmid Miniprep Kit	D4210	ZYMO RESEARCH
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent	78835	Thermo SCIENTIFIC
BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II Part A	51-6710AK	BD Biosciences