

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSKOVİTİN'İN GSK-3 $\beta$  TEMELLİ TAUPATİLERDEKİ ETKİSİNİN  
SİNİR HÜCRE MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BERKAY GÜRKAN**

**1409241007**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL**

**AĞUSTOS-2016**

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSKOVİTİN'İN GSK-3 $\beta$  TEMELLİ TAUPATİLERDEKİ ETKİSİNİN  
SİNİR HÜCRE MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BERKAY GÜRKAN**

**1409241007**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL**

**Diğer Jüri Üyeleri: Doç. Dr. E. Damla ARİSAN**

**Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz ARSLAN**

**AĞUSTOS-2016**

## ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve eğitimim süresinde değerli fikirlerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde çok büyük emeği geçen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Narçın Palavan ÜNSAL 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, başından sonuna kadar hep yanımda olan, değerli görüşlerini benimle paylaşan ve en önemlisi değerli zamanlarını bana ayıran Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA, Sayın Doç. Dr. Elif Damla ARISAN'a, Sayın Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a, Sayın Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ'e ve Sayın Araş. Gör. Özge BERRAK'a,

Hem akademik hem de özel hayatımda desteklerini hissettiğim, zor zamanlarımda yüzümü güldüren Ozan Ronay BEYAZIT 'a,

Tezim ve hayatım boyunca bana her anlamda destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili annem Namiye GÜRKAN, babam Süleyman GÜRKAN, babaannem Hatice GÜRKAN ve değerli aile üyelerimize, bu tezin hazırlanması sırasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİL LİSTESİ .....	V
TABLO LİSTESİ .....	X
ÖZET.....	XIV
SUMMARY.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR.....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	4
2.1.TAU PROTEİNİNİN YAPI VE İŞLEVİ.....	4
2.1.1.TAU YAPISI .....	7
2.1.2.TAU VE MİKROTÜBÜLLER.....	8
2.1.3. TAU LİFLERİNİN YAPISI .....	10
2.1.4. TAUPATİLER.....	12
2.2. APOPTOZ .....	14
2.2.1. APAPTOZUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI.....	14
2.2.2. EKSTRİNSİK YOLAK: MEMBRANDAKİ ÖLÜM RESEPTÖRLERİ ARACILIĞI İLE .....	16
2.2.3. MİTOKONDRİ ARACILI İNTRİNSİK YOLAK .....	18
2.2.4. EKSTRİNSİK VE İNTRİNSİK YOLLAR ARASINDAKİ KARŞILIKLI İLİŞKİLER .....	21
2.2.5. ALZHEİMER HASTALIĞI VE APOPTOZ.....	22
2.3. GSK-3β' NİN HÜCRE ÖLÜMÜ YOLLARINDAKİ ÇİFT İŞLEVLİ ROLÜ	24
2.3.1.GSK-3β' NİN TANIMI: .....	24

2.3.2. GSK-3 $\beta$ 'NİN APOPTOZU DÜZENLEMESİ.....	29
2.4. SINIR HÜCRE MODELİNDE GSK-3 $\beta$ TEMELLİ TAUPATİLERİN OLUŞUMU VE TEDAVİSİNDE TEMEL MOLEKÜLER MEKANİZMALAR.	34
2.4.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ.....	34
2.4.2. SİKLİNE BAĞIMLI KİNAZLAR (CDK'LAR).....	35
2.4.3. CDK'NİN REGÜLASYONU.....	37
2.4.4. SİKLİNLERLE İLİŞKİ.....	38
2.4.5.ROSKOVİTİN.....	38
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	41
3.1. KULLANILAN MALZEMELER.....	41
3.1.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	41
3.1.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI.....	41
3.1.3. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	41
3.1.4. KULLANILAN MOLEKÜLER BİYOLOJİ KİTLERİ.....	41
3.1.5. KULLANILAN TAMPONLAR, ÇÖZELTİLER VE İÇERİKLERİ.....	41
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE SAĞKALIM TAYİNİ.....	44
3.2.1. HÜCRELERİN YETİŞTİRİLMESİ.....	44
3.2.2. HÜCRELERİN KALDIRILMASI, SAYIMI VE PASAJLANMASI.....	44
3.2.3. HÜCRE CANLILIĞI TAYİNİ.....	44
3.2.4. HÜCRE SAĞKALIM TAYİNİ.....	45
3.2.5. SOFT AGAR İLE KOLONİ OLUŞUM TAYİNİ.....	45
3.2.6. KOLONİ OLUŞUM TAYİNİ.....	46
3.2.7. HÜCRELERİN DONDURULMASI VE ÇÖZDÜRÜLMESİ.....	46
3.3. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER.....	46
3.3.1. IŞIK MİKROSKOBU.....	46
3.3.2. FLUORESAN MİKROSKOBU.....	47
3.4. FLUOROMETRİK YÖNTEM.....	48
3.5. İMMUNOBLOTLAMA.....	49
3.5.1. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU.....	49
3.5.2. SİTOPLAZMİK VE NUKLEAR PROTEİN İZOLASYONU.....	49

3.5.3. BRADFORD PROTEİN MİKTAR TAYİNİ.....	50
3.5.4. PROTEİNLERİN SDS-PAGE'DE YÜRÜTÜLMESİ.....	50
3.5.5. MEMBRANA TRANSFER VE BLOKLAMA.....	50
3.5.6. BİRİNCİL VE İKİNCİL ANTİKOR İŞARETLEMELERİ.....	51
3.6. AKIM SİTOMETRİSİ.....	51
3.6.1. HÜCRELERİN HAZIRLANMASI.....	51
3.6.2. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN ANNEKSİN V VE PROPİDYUM İYODÜR BOYAMASI İLE AKIM SİTOMETRİSİNDE TAYİNİ.....	52
3.6.3. HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN AKIM SİTOMETRİSİ KULLANILARAK İNCELENMESİ.....	52
3.7. İSTATİKSEL ANALİZ .....	53
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>54</b>
4.1. ROSKOVİTİN'İN İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTI SK-N-AS'DA HÜCRE ÇOĞALMASINI İNHİBE ETMEKTEDİR.....	54
4.2. SK-N-AS NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE CDK İNHİBİTÖRÜ ROSKOVİTİN APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE NEDEN OLMAKTADIR ..	59
4.3. ROSKOVİTİN ALZHEİMER BELİRTEÇLERİNİ İNHİBE ETMEKTEDİR.....	64
4.4. ROSKOVİTİN KASPAZA BAĞIMLI APOPTOZU İNHİBE ETMEKTEDİR .....	67
4.5. ROSKOVİTİN PRO-APOPTOTİK ETKİNLİĞE SAHİP OLAN GSK-3 $\beta$ VE SUBSTRATI $\beta$ -KATENİNİ İNHİBE ETMEKTEDİR.....	68
4.6. SK-N-AS NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE NAC, CDK İNHİBİTÖRÜ ROSKOVİTİN'İN HÜCRE CANLILIĞINA YARATTIĞI ETKİYİ GERİ ÇEKMEKTEDİR .....	70
4.7. SK-N-AS HÜCRE HATTINDA ROSKOVİTİN'İN N-ASETİL-SİSTEİN (NAC) İLE EŞ ZAMANLI ETKİSİNİN SAPTANMASI .....	71
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>74</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>82</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>95</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1: Nörodejenerasyona sebep olan aday yolaklar. Bu aday yolaklar nöronların sağkalımı ile dejenerasyonu arasındaki dengeyi etkilemektedirler (Ramanan ve Saykin 2013). ..... 2
- Şekil 2: Tau'da yer alan domainler ve yapısal elementler. Üstte: Tau'nun NMR da elde edilen yapısı (Mukrasch ve Ark., 2009). Zincirlerin çoğu, sekonder yapısının ( $\alpha$  sarmal kırmızı,  $\beta$  iplik sarı, poliprolin sarmal yeşil) bir kaç kısa ve geçici elementleri ile ortaya konmuştur (Siyah çizgiler). Kırmızı kutu Tau kümesinden sorumlu iki heksapeptid motifinin bulunduğu bölgeyi göstermektedir. Orta: Alt bölümlerin domainleri gösterilmiştir (Gustke ve Ark., 1994). Karboksi uç mikrotübülle birleşmeyi kısmen teşvik eder ve amino uç mikrotübül yüzeyden kısmen yansır. N1, N2 ve R2 alternatif birleşmeye bağlı olarak yok olabilir. R1-R4 komşu domainler ile birlikte tekrarlanan domainleri sunar bu da mikrotübül etkileşim domainini göstermektedir. Altta: Etkileşim alanlarının ve diğer proteinlerin yaklaşık konumları gösterilmektedir. .... 5
- Şekil 3: Tau proteininin normal işlevi. Tau protein en uzun isoform durumunda mikrotübülleri dört tübülün bağlanma domainleri (mavi kutular) vasıtası ile stabilize ederler. Tau proteininin mikrotübüllere bağlanması kinaz ve fosfatazların aktivitesi ile dengelenir. Tau' nun fosforilasyonu (pembe küreler) mikrotübüllere bağlanma aktivitesini düzenler ve aksonal taşınmayı etkiler. Tau proteini mikrotübüller üzerinde kinezin tarafından vesiküllerin artı uca taşınmasını engelleyebilir (Kolarova ve Ark., 2012). ..... 9
- Şekil 4: Tau lifleri. Sol: Bükülmüş olarak görülen yaklaşık 80' nm aralarla 'Eşleşmiş sarmal yapılar'. Alzheimer beyin dokusundan izole edilmiştir (Oklar). Sağ: *in vitro*da Tau Liflerinin agregat oluşturmada önce tekrarlanan domainleri (Barghorn ve Ark., 2000). ..... 11
- Şekil 5: Tau'nun fizyolojik ve patolojik fosforilasyonu (Biernat ve Mandelkow 1999; Biernat ve Ark., 2002). ..... 13

Şekil 6: Kaspazlar apoptoz sırasında protein yıkımından sorumlu sistenil proteazlardır. A. Yukarıdaki şemada işlevlerine göre kaspazların kategorize edilmesi gösterilmektedir. Asıl işlevlerine bağlı olarak üç grup kaspaz bulunmaktadır. B. pro-kaspaz-6 aktivasyonu ile aktif kaspaz-6 oluşumu görülmektedir. Kaspaz-6 aktivasyonu ile pro-domain ile büyük alt unite (p20) ve büyük alt unite ile küçük alt unite (p10) arasında kırılmalar meydana gelir. C. APP de kaspaz benzeri kırılma şematik olarak gösterilmektedir. APP üzerinde üç kaspaz benzeri kırılma vardır. TM: Transmembran domain (Zhang 2013). ..... 16

Şekil 7: Apoptoza sebep olan moleküler yolaklar. Dış yolakda ligandın spesifik reseptöre bağlanması ile DISC kompleksi oluşur ve kaspaz 8 aktivasyonu gerçekleşir. İç yolakda mitokondrilerden Sitokrom C serbestlenmesi ile apoptozom oluşur ve kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz 8 ve 9 da hücre ölümüne sebep olan kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olur. Her iki yolak da BH3 proteini BID'in kırılması ile bağlantılıdır (Favaloro ve Ark., 2012). ..... 18

Şekil 8: Glikojen sentaz kinaz  $3\beta$ 'nin (GSK- $3\beta$ ) yapısı. GSK- $3\beta$  üç belirgin yapısal domain içeren 433 protein residüsünden oluşan bir proteindir. N uç domain (Gamblin ve Ark., ) ilk 134 residü içerir ve 7 strand- $\beta$  barrel oluşturur. N terminal domainden kısa bir bağlayıcı, 135 -151 residüleri N terminal domainini  $\alpha$ -heliks domainine bağlar (Mora çalan kırmızı).  $\alpha$ -heliks domaini 152 -342 residüden oluşmuştur. N terminal ve  $\alpha$ -heliks domaini arasında sıkışmış alan ATP bağlayıcı alandır. C terminal domain 343-433 residü içerir (Couchie ve Ark., ). Bu şekil GSK- $3\beta$ 'nin şerit şemasıdır. Ser-9'un fosforilasyonu enzimi inaktive eder buna karşın Tyr -216'nın fosforilasyonunu aktive eder. P53 ile uyumlu bölge ve temel domain bölgelerinin her ikisi de N-terminal domaininde yerleşim gösterirler (Jacobs ve Ark., 2012). ..... 26

Şekil 9: GSK- $3\beta$ 'nin düzenlenmesi. GSK- $3\beta$  hücre akibetini düzenleyen çeşitli sinyal yolaklarında rol oynayan çoklu fonksiyonu olan bir kinazdır. ZAK1 veya Fyn Tyr-216'yı fosforile edebilir ve GSK- $3\beta$ 'nin aktivitesi artar. GSK- $3\beta$ ,  $\beta$ -katenin gibi downstream hedeflerini fosforile edebilir ve ubikuitin-proteozom sisteminde yıkılabilir. Diğer taraftan Akt ve PKC, GSK- $3\beta$ 'nin enzimatik aktivitesini Ser9'u fosforile ederek azaltabilir. Bu nedenle GSK- $3\beta$  aktivitesinin inhibisyonu sitosolde  $\beta$ -katenin stabilizasyon ve birikmesine neden olur ve gen ekspresyonunu düzenlemede işlev görmek üzere nukleusa yönlendirir. GSK- $3\beta$  aynı zamanda D1 siklini fosforile ederek hücre döngüsünün düzenlenmesi ile de ilgilidir, bu da siklin D1 proteinin hızla proteolitik dönüşümünü sonuçlandırır (Jacobs ve Ark., 2012). GSK3 $\beta$



ifadesinin düzensiz olması diyabet, nöronal bozukluk, Alzheimer hastalığı, şizofreni, dopamin ile uyumlu davranışlar, bipolar bozukluk, Parkinson ve kanserin de içinde bulunduğu birçok patolojiye yol açmaktadır (Jacobs ve Ark., 2012).	27
Şekil 10: WNT sinyal yolağı. $\beta$ Katenin seviyelerinin düzenlenmesi ve Wnt sinyallerinde önemli bir evredir. $\beta$ Katenin GSK-3 $\beta$ ile fosforile edilir ve daha sonra da ubiquitin- proteozom sisteminde yıkılır. GSK-3 $\beta$ ' nin inhibisyonu $\beta$ kateninin sitozolde stabilizasyonuna ve birikimine neden olur böylelikle nukleusa girer ve gen ifadesini düzenler (Miller ve Moon 1996; Giles ve Ark., 2003).	28
Şekil 11: GSK-3 $\beta$ 'nın apoptoz sinyallerindeki rolü. Yukardaki şemada aktive olmuş GSK-3 $\beta$ 'nin apoptoz düzenlemedeki rolünü göstermektedir. Aktif GSK-3 $\beta$ , MDM2'nin p53'ü düzenlemesini engellemektedir, bu da DNA onarımına ve büyümenin durmasına yol açmaktadır, bazen de aktif kaspaz kaskatının aktivasyonu yolu ile Bax aracılı apoptozu teşvik eder. Aktif GSK-3 $\beta$ aynı zamanda IKK, I $\kappa$ B ve p65 aktive ederek NF $\kappa$ B' yi pozitif olarak regüle eder, böylece TNF-aracılı apoptozun engellenmesi ortaya çıkar. Bu etkiler TNF sinyal kaskatı yolu ile apoptozun başlamasını engeller (Jacobs ve Ark., 2012).	32
Şekil 12: Hücre siklusu.	35
Şekil 13: Roskovitin'in kimyasal yapısı (Dolečková ve Ark., 2013).	39
Şekil 14: SK-N-AS hücrelerinde roskovitin'in zamana bağlı hücre canlılığının doza bağlı olarak incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca (0-50 $\mu$ M) farklı konsantrasyonlarda roskovitin ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.****: p<0,0001.	55
Şekil 15: SK-N-AS hücrelerinde roskovitin'in koloni oluşumuna etkisinin incelenmesi. 5x10 <sup>3</sup> ve 7x10 <sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde SK-N-AS hücreleri petri kaplarına ekilmiş, 24 saat boyunca 1ve 10 $\mu$ M roskovitin uygulanmış 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 14 gün sonunda fikse edilip kristal viyole ile boyanmış ve ışık mikroskobunda görüntüleri alınmıştır. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.	56
Şekil 16: Roskovitin uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde soft agarda koloni oluşumunun incelenmesi. Soft agarda 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, 10 gün sonunda ışık	

mikroskobu altında incelenmiş ve koloni çapları ölçülmüştür. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. * p= 0,012. ....	57
Şekil 17: SK-N-AS hücrelerinde roskovitin hücre sağkalımı üzerine etkisinin belirlenmesi. Hücreler 24-96 saat boyunca 1 ve 10 µM roskovitin uygulanmış ve hücreler tripan mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında hemositometre ile sayılmıştır. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. ....	58
Şekil 18: Roskovitin ile tetiklenen hücre ölümünün SK-N-AS nöroblastoma hücrelerinde fluoresan probalar ile belirlenmesi. 1 ve 10 µM roskovitin SK-N-AS hücrelerine 24 saat boyunca uygulandı. 4nm DiOC6, 5mg/ml propidium iyodür ve 5 mg/ml DAPI ile boyanan hücreler fluoresan mikroskobunda incelendi (x20-x40). Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. ....	60
Şekil 19: Roskovitin'in 1 ve 10 µM uygulamasının pro ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üzerine etkileri immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonununundan sonra 25 µg protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır.....	62
Şekil 20: Roskovitin uygulanan SK-N-AS hücrelerinde doza bağlı hücre döngüsü evrelerindeki değişim akım sitometresi analizi ile araştırılması. Hücreler 24 saat boyunca roskovitin ile inkübe edildikten sonra etanol ile fikse edilip, PI boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre sayısı 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. * p= 0,012; **p=0,0087.....	63
Şekil 21: Roskovitin uygulanan SK-N-AS hücrelerinde Annexin V-PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi. Hücreler 24 saat boyunca roskovitin ile inkübe edildikten sonra Annexin V ve PI boyaması uygulanmış ve BD Bioscience Accuri C6 programı ile analiz edilmiştir. Erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik popülasyon yüzeleri 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. * p= 0,012.....	64
Şekil 22: Roskovitin uygulaması ile SK-N-AS hücre hattında Alzheimer ailesi proteinlerine etkisinin immunoblotlama ile belirlenmesi. Total protein izolasyonununundan sonra 25 µg protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra	

ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır. ....	66
Şekil 23: Roskovitin uygulamasının kaspaz kesilimi üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunundan sonra 25 µg protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrımlandırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır. (k: kesilmiş). ....	68
Şekil 24: Roskovitin uygulamasının GSK-3β ve substratlarından olan β-katenin yolağı üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunundan sonra 25 µg protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrımlandırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin ve Histon H3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır. ....	69
Şekil 25: Roskovitin uygulamasının SK-N-AS hücre hattında Ros oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi. 24 saat boyunca 1 ve 10 µM roskovitin uygulanmış hücreler DCFH-DA boya ile boyanmıştır. 15 dakika inkübasyon sonucunda hücreler akım sitometrisinde analiz edilmiştir. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır. **p=0,0087.....	70
Şekil 26: SK-N-AS hücrelerine 10 µM roskovitin ve 5 mM NAC uygulandı ve 24 saat boyunca inkübe edildi. Roskovitin 10 µM uygulanan hücrelerde tetiklenen apoptotik süreçte artan H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarının ROS oluşumuna etkisi DCFH-DA 100'nM boyama ile fluoresan mikroskobunda belirlenmesi. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır (20x). ....	71
Şekil 27: SK-N-AS hücrelerinde NAC'ın roskovitin ile kombine edilip bağıl hücre canlılığının incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca 10 µM roskovitin ve 5 mM NAC ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. **** p<0,0001.....	72
Şekil 28: NAC'ın 10 µM roskovitin uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde roskovitin toksik etkisinin geri döndürmesinin belirlenmesi. SK-N-AS hücreleri 24 saat boyunca 10 µM roskovitin ve 5 mM NAC uygulaması sonucunda DCFH-DA ajanı ile boyanmış, 15 dakika inkübasyon sonucunda örnekler akım sitometresinde incelenmiştir. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır *** p=0,0003, ns: non-spesifik. ....	73

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Tau proteininin isoformları (Goedert ve Ark., 1989).....	6
Tablo 2: Bcl-2 ailesi üyeleri (Pecorino, 2012).....	19
Tablo 3: GSK-3 $\beta$ 'nin apoptozu teşvik ettiği koşullar (Jacobs ve Ark., 2012).....	30
Tablo 4: Roskovitin'in SK-N-AS hücre hattında hücre sayısına etkisinin zaman ve doza bağlı olarak değişmesi. Değerler 3 farklı deneyin ortalamasıdır. * p= 0,012. ....	58
Tablo 5: Kullanılan cihazların listesi.....	95
Tablo 6: Hücre kültürü donanımları.....	96
Tablo 7: Kullanılan kimyasallar listesi.....	97
Tablo 8: Kullanılan moleküler biyoloji kitleri.....	98

## SEMBOL LİSTESİ

<b>A<math>\beta</math>:</b>	Amiloid Beta
<b>AD:</b>	Alzheimer Hastalığı
<b>ALS:</b>	Amonyotrofik Lateral Skleroz
<b>APP:</b>	Amiloid Öncü Proteini
<b>APS:</b>	Amonyum Persülfat
<b>ATG:</b>	Otofaji İlişkili Protein
<b>ATP:</b>	Adenozin Trifosfat
<b>BAX:</b>	Bcl-2 İlişkili X Proteini
<b>BCL-2:</b>	B-Hücre Lenfoma 2
<b>BSA:</b>	Sığır Serum Albumin
<b>BOS:</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>CBD:</b>	Kortikobazal Dejenerasyon
<b>CDK:</b>	Sikline Bağımlı Kinaz
<b>CDKI:</b>	Sikline Bağımlı Kinaz Inhibitörü
<b>CNS:</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>CREB:</b>	Camp-Response Element
<b>CSF:</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Karbondioksit
<b>CYC202:</b>	Roskovitin
<b>DAPI:</b>	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
<b>DCFH-DA:</b>	2',7'-Diklorofloresein-Diasetat
<b>DFMO:</b>	Difluorometilornitin
<b>DiOC<sub>6</sub>:</b>	3, 3'-Diheksiloksakarboxianin İyodür
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfoksit
<b>DNA:</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EDTA:</b>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>ERK:</b>	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
<b>FTDP-17:</b>	Frontotemporal Demans Parkinsonizm-17

<b>FTD:</b>	Frontotemporal Demans
<b>GSK-3<math>\beta</math>:</b>	Glikojen Sentaz Kinaz-3 Beta
<b>IAP:</b>	Apoptoz İnhibitör Proteinleri
<b>IGF-1:</b>	İnsulin Bağlantılı Büyüme Faktörü
<b>kDa:</b>	Kilo Dalton
<b>HIV:</b>	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
<b>MAP:</b>	Mikrotübül Uyumlu Protein
<b>MPF:</b>	M Fazı Teşvik Eden Faktör
<b>MT:</b>	Mikrotübül
<b>MTT:</b>	Metiltiazol Difeniltetrazolyum Bromür
<b>NAC:</b>	N-Asetil Sistein
<b>NF<math>\kappa</math>B:</b>	Nuklear Faktör Kappa B
<b>NFT:</b>	Nörofibriler Yumaklar
<b>NMR:</b>	Nukleer Manyetik Rezonans
<b>NSCLC:</b>	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
<b>PARP:</b>	Poli Adp Riboz Polimeraz
<b>PVDF:</b>	Polivinilidin Florür
<b>PBS:</b>	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>PI:</b>	Propidyum İyodür
<b>PI3K:</b>	Fosfotidilinositol-3 Fosfat kinaz
<b>PİD:</b>	Pelvik İnflamatuvar Hastalık
<b>PKC:</b>	Protein Kinaz C
<b>PHF:</b>	Eşleşmiş Spirial Filament
<b>PSP:</b>	Progressif Supranükleer Paralizi
<b>PNS:</b>	Periferel Sinir Sistemi
<b>ROS:</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>ROSC:</b>	Roskovitin
<b>SDS:</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE:</b>	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>TBS:</b>	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi

**TEMED:** Tetrametiletilendiamin  
**TNF:** Tumor Nekroz Faktörü  
 **$\Delta\psi_m$ :** Mitokondri membran potansiyeli



## ÖZET

Nörodejeneratif hastalıklar, beynin spesifik bölgelerindeki nöronların progresif ve geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize edilen bir grup patolojiyi içermektedir. Nörodejeneratif hastalıklar göreceli olarak sıklıkla görülmekte, medikal ve sosyal açıdan önemli problemler yaratmaktadır. Bu patolojiler esas olarak hayatın ileri dönemlerinde nörolojik olarak normal bireylerde ortaya çıkmaktadır. Alzheimer hastalığı da en sık rastlanılan nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Alzheimer hastalığında hipokampal ve kortikal nöronların kaybına bağlı kognitif (bilinç) fonksiyonlarda ve hafızada bozulma olmaktadır. Tau olgun nöronlarda bulunan mikrotübül uyumlu bir proteindir. Taupatiler, nörofibrillerde ya da gliafibrillar formlarında Tau proteinin patolojik birikimi ile uyumluluk gösteren nörodejeneratif hastalık grubuna verilen addır. Taunun hiperfosforile olması Tau'nun biyolojik aktivitesini baskılar ve sonuçta Tau kümelenmeleri meydana gelir. Bu çalışmanın amacı, sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan roskovitin glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) temelli taupatilerdeki etkisinin insan sinir hücre modelinde araştırılmasıdır. Roskovitinin nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS hücrelerindeki terapötik etkisi önce hücre sağ kalımı ve apoptotik parametrelerle araştırıldıktan sonra Taupati açısından roskovitinin rolünü anlayabilmek için Alzheimer belirteçleri parametre olarak kullanıldı. Araştırmanın en son aşamasında da roskovitin GSK-3 $\beta$  sinyal yolağı ve GSK-3 $\beta$  substratı olan  $\beta$ -kateninle ve ayrıca ROS oluşumu ile olan ilişkileri ortaya konmaya çalışıldı.

Bu çalışmada roskovitin uygulamasının hücre canlılığında azalmaya ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Roskovitinin 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarının hücre canlılığını sırasıyla % 20 ve 50 oranında azaltmıştır. Bu sonuçlara bakılarak SK-N-AS hücrelerinin CDK inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu ortaya konulmuş olmaktadır. 10  $\mu$ M roskovitin uygulamasında hücre sağ kalımının kayda değer bir şekilde azaldığı belirlendi. Ayrıca SK-N-AS hücrelerinde roskovitin uygulamasının koloni oluşumuna etkisi araştırıldı ve 10  $\mu$ M roskovitin uygulamasının koloni oluşumunu azalttığı bulundu, buna ilave olarak 1 ve 10  $\mu$ M



roskovitin uygulaması ile soft agar içinde oluşan kolonilerin çaplarında kayda değer azalma bulundu. Bütün bu veriler roskovitin hücre ölümünü teşvik ettiğini açıkça ortaya koymaktadır.

Araştırmanın bundan sonraki aşamasında roskovitin ile tetiklenen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik biyobelirteçler irdelendi ve SK-N-AS hücre hattında mitokondri membran potansiyelinde oluşan kaybın mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu tetiklediği saptandı. Ayrıca SK-N-AS hücre hatlarında 1 µM roskovitin uygulamasının Tau proteininin anlatımında azalmaya sebep olduğu belirlenirken, 10 µM roskovitin uygulamasında Tau protein ifadesinde kontrole oranla bir değişiklik saptanmadı. Ayrıca kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1 µM roskovitin uygulaması ile Alzheimer hastalığının belirteci Amiloid β peptidinde azalma belirlenirken, 10 µM roskovitin uygulamasında protein ifadesinde artış saptandı. Bir diğer Alzheimer biyobelirteci APP protein ifade düzeyi incelendiğinde 1 ve 10 µM roskovitin uygulamaları sonucunda kontrol hücrelerine oranla azalmaya sebep olduğu saptandı, buna karşın, 1 ve 10 µM roskovitin uygulamaları kontrol hücrelerine oranla nörofilament protein ifadesinde artışa neden oldu. Diğer Alzheimer biyobelirteçleri BACE ve α-sinukleine 1 ve 10 µM roskovitin uygulandığında, BACE protein ifade düzeyinde artış olduğu ve α-sinukleine ifadesinde ise değişiklik olmadığı belirlendi. Özetle Alzheimer'ın biyokimyasal belirteçlerinden olan Amiloid β ve Tau' nun 1 µM roskovitin uygulaması sonucu protein ifadelerindeki azalışa neden olarak apoptozu tetiklemektedir. Böylelikle anti- ve pro-apoptotik biyobelirteçlerin değişimi ile beraber roskovitin apoptoz üzerindeki teşvik edici etkisi onaylanmış olmaktadır. Ayrıca roskovitin, GSK-3β ve β-katenini inhibe ederek apoptozu teşvik ettiği de bu çalışmada belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında elde edilen bulgulara göre, nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS'da roskovitin apoptotik mekanizmayı tetiklediği açıkça ortaya konmuştur. Bu durumda roskovitin Taupatik değil de apoptotik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Roskovitin taupatilerdeki etkisinin CDK5 ve GSK-3β ilişkili sinyal yolları ile ilişkili olarak daha detaylı araştırmalar yapılması hedeflenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer, Nörodejenerasyon, Tau, Roskovitin, Apoptoz, GSK-3β, Reaktif Oksijen Türevleri

## SUMMARY

Neurodegenerative diseases are characterized by a group of pathology including progressive and irreversible loss of neurons at specific spaces in human brain. Neurodegenerative diseases are increasing relatively and create medical and social problems. These pathologies basically arise neurologically at old ages of normal people these pathologies are diverse and Alzheimer disease is the leading neurodegenerative disease. Alzheimer disease is cognitive and memory loss disorder related to the hippocampal and cortical neuron cells loss. Tau is microtubule-associated protein found mostly in mature neurons. Tauopathies are a class of neurodegenerative diseases associated with the pathological aggregation of Tau protein in neurofibrillary or gliofibrillary tangles in the human brain. Hyperphosphorylation of Tau suppresses the biological activity of Tau and causes formation of Tau aggregates. The aim of this study is to investigate the effect of CDK inhibitor roscovitine on GSK-3 $\beta$  based tauopathies in SK-N-AS neuroblastoma cell lines.

To detect the therapeutic effects of roscovitine, cell survival parameters and apoptotic markers were investigated in SK-N-AS neuroblastoma cell lines. Later we tried to reveal the role of roscovitine on Alzheimer markers. At the last step of this research we also searched to be able to show the roscovitine relation with GSK-3 $\beta$  signaling pathway and also GSK-3 $\beta$  substrate  $\beta$ -catenine and ROS formation.

Roscovitine decreased the cell viability and induced apoptosis in this study. Roscovitine at 1 and 10  $\mu$ M concentrations decreased the cell viability by 20 and 50 % respectively. Therefore we established the sensitivity of SK-N-AS cells against CDK inhibitors. 10  $\mu$ M roscovitine treatment resulted the significant decrease in cell viability and the colony formation. In addition 1 and 10  $\mu$ M roscovitine treatments decreased the colony diameters significantly. All these findings showed the apoptosis inducing effect of roscovitine in SK-N-AS cells.

Therefore we focused on the investigation of cell death type which is triggered by the treatment of roscovitine. We used apoptotic parameters by this purpose and we established that mitochondrial apoptotic pathway caused the cell death in SK-N-AS cells by the application of roscovitine. Besides we also observed the decrease in Tau protein expression with 1 mM roscovitine treatment compared to control samples, but not with 10  $\mu$ M roscovitine concentration. In addition, Alzheimer marker Amyloid  $\beta$  peptid expression level decreased by the treatment of 1  $\mu$ M roscovitine but not 10  $\mu$ M roscovitine. Another Alzheimer biomarker APP protein expression level decreased by 1 and 10  $\mu$ M roscovitine treatments compared to control cells. Conversely, 1 and 10  $\mu$ M roscovitine treatments caused the increase in neurofilament protein expression level. Another Alzheimer biomarker BACE protein expression level increased and  $\alpha$ -synuclein exhibited no changes compared to control cells at same experimental conditions.

In summary 1  $\mu$ M roscovitine treatment triggered the apoptosis by decreasing Alzheimer biomarkers Amyloid  $\beta$  and Tau expression levels at SK-N-AS cell line. Therefore we confirmed that roscovitine induces apoptosis by altering both anti- and pro- apoptotic proteins as well as Alzheimer biomarkers. Besides we also established that apoptosis induction due to roscovitine treatment was associated by the modulation of GSK-3 $\beta$  and its substrate  $\beta$ -catenine in SK-N-AS neuroblastoma cell line.

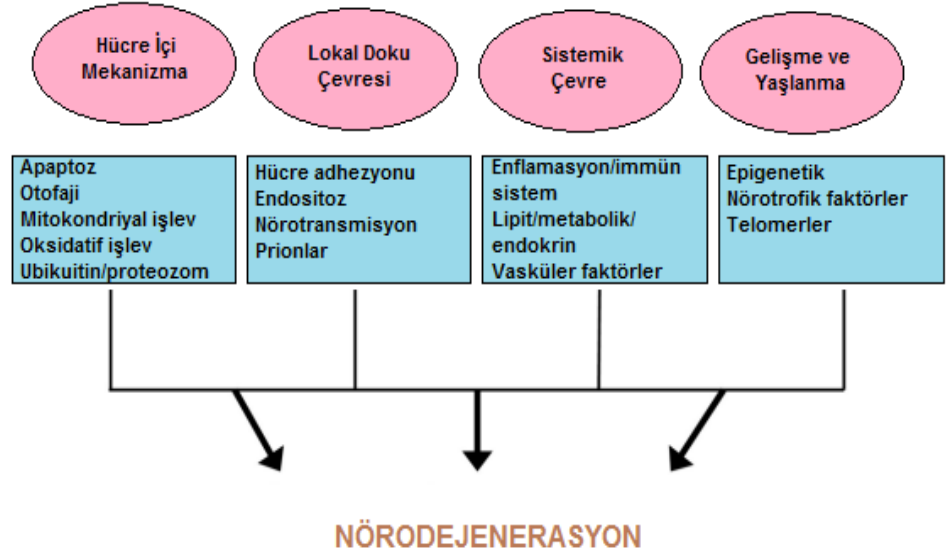
In conclusion, according to our findings obtained at this study, roscovitine induced the apoptotic mechanism in SK-N-AS neuroblastoma cell line. In this case roscovitine did not exert a significant effect on Alzheimer markers. It is necessary to repeat this experiment at *in vivo* conditions. Study on the roscovitine effect on tauopathies in relation with CDK5 and GSK-3 $\beta$  signaling pathway in detail was targeted in future experiments.

**Key Words:** Alzheimer, Neurodegeneration, Tau, Roscovitine, Apoptosis, GSK-3 $\beta$ , Reactive Oxygen Species

# 1. GİRİŞ

## 1.1. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir hücrelerinin ölümü ile meydana gelen ve buna bağlı olarak da sinir sistemi işlevlerinin kaybına sebep olan bir hastalık grubudur. Bu hastalıklardan en sık rastlanılanı Alzheimerdir, Parkinson hastalığı ikinci sırada görülmektedir. Huntington hastalığı, frontotemporal demanslar ve amyotropik lateral skleroz gibi daha az görülen ancak yine önemli sorunlar ortaya koyan daha pek çok hastalık, nörodejeneratif hastalıklar grubu içindedir. Ayrıca vasküler demans ve kognitif bozuklukların da yer aldığı bir başka grup hastalığa da nörodejeneratif süreçler eşlik edebilmektedir. Son yıllarda biyolojik yolaklar genom çalışmalarında odak noktaları oluşturdu. Pek çok araştırma aynı yolaktaki gen işlevlerinin nörodejeneratif hastalıklara duyarlılığı etkilediğini ortaya koydu (Ramanan ve Saykin 2013). Araştırmalar nörodejeneratif mekanizmalarla ilgili yeni yolaklar ve yeni aday hedefleri göstermektedir. Şekil 1'de nörodejenerasyon ve yaşlanma ile ilgili olan faktörler, hücre içi mekanizmalar, doku mikro çevresi, sistemik dolaşımla olan ilişkiler çok geniş bir şekilde gösterilmektedir.



**Şekil 1: Nörodejenerasyona sebep olan aday yollar. Bu aday yollar nöronların sağkalmı ile dejenerasyonu arasındaki dengeyi etkilemektedirler (Ramanan ve Saykin 2013).**

Tau proteini 1975 yılında Weingarten ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Hücre biyolojisi alanında çalışan bu bilim insanları araştırmalarıyla NOBEL ödülünü kazanmışlardır. Tau hücre biyologları için ilk karakterize edilmiş olan mikrotübül uyumlu proteinlerden (MAP) bir tanesidir. Marc Kirschner ve ekibi tübülün mikrotübül şeklinde yapılanmasını teşvik eden faktörü araştırırken tübülün bağlayan proteini (Tau:Tubulin binding protein) bulmuşlardır (Mandelkow ve Mandelkow 2012). Böylelikle hücre biyologları nöronlarda ve diğer hücrelerdeki mikrotübülleri stabilize edici olarak Tau'yu özellikle hücre farklılaşması ve polarizasyonu alanlarında araştırmaya odaklanmışlardır. Bu alandaki en önemli bulgulardan birisi Tau'nun biyokimyasal karakterizasyonudur Cleveland ve Ark., (1977). Drubin ve Kirschner (1986) nöronal farklılaşma sırasında tübülün boyunca up regülasyonu ve olgun nöronlarda esas olanın bu aksonal protein olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra Tau proteininin isoform karakterizasyonu ve klonlanması fare, inek ve insanda gösterilmiştir (Lee ve Ark., 1986).

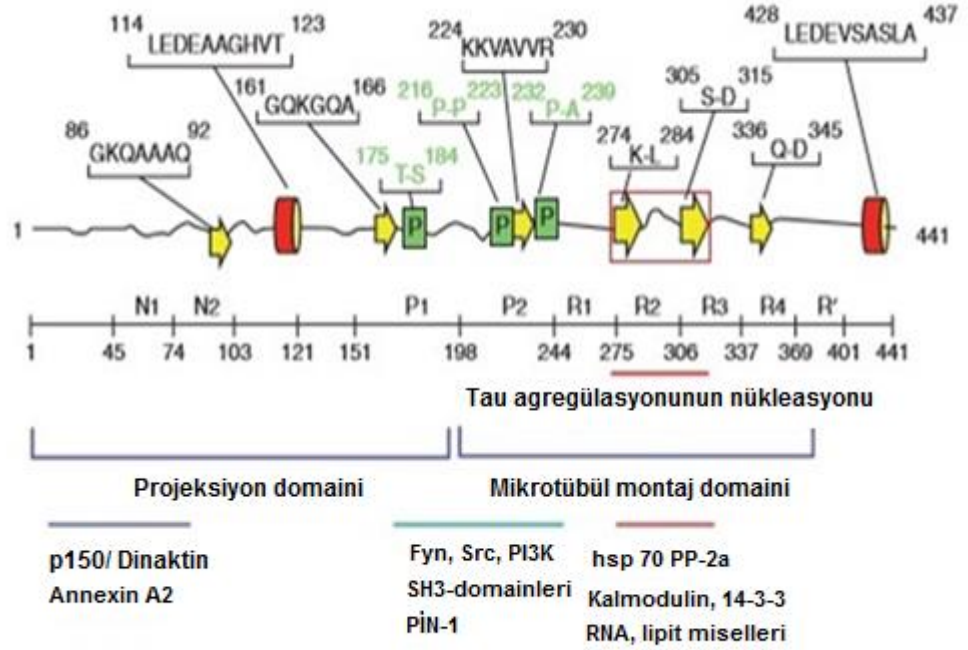
Tau araştırmalarının ikinci aşaması nörolojik araştırmalar sırasında AD hastalarının beyinlerinde anormal protein komponentlerinin birikiminin belirlenmesi sırasında ortaya çıkmıştır. Bu komponentlerden bir tanesi A $\beta$ , moleküler klonlama yolu ile ekstraselüler amiloid plakların kor proteini olarak belirlenmiştir (Kang ve Ark., 1987). Bu keşifler hücre biyologlarını ve sinir bilimcileri Tau'nun fizyolojik ve patolojik özelliklerini belirlemeye yönlendirmiştir. İnsan Tau'su ve onun "splicing isoformları" Goedert ve arkadaşları tarafından 1989 yılında belirlenmiş ve normal ve hastalıklı durumlara karşı Tau' ya özel antikorlar geliştirilmiştir. Tau'nun anormal post-translasyonel modifikasyonları yani fosforilasyon yerleri kinazlar, fosfotazlar belirlenmiştir. Daha sonra meydana gelen anormal Tau birikimlerin prensipleri saptanmıştır (Wischnik ve Ark., 1988).

Tau kümelenmesi ile ilgili araştırmalardan sonra Tau pek çok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Ailesel AD'da amyloid nc protein (APP) nin mutasyonuna bağlı olduğu açıklık kazandıktan sonra Tau patolojisi A $\beta$  patolojisi ile birlikte büyük önem ortaya koymuştur. Tau araştırmaları pek çok nörodejenaratif hastalığın Tau mutasyonlarının neden olduğu frontotemporal demanslar (Goedert ve Ark., 2012) A $\beta$  (yani PİD, PSP) birikimine bağımsız olduğunun belirlenmesi ile adeta bir patlama olmuştur. Bu veriler Tau'nun hastalığa neden olan bir ajan olduğunu ortaya koymuştur. Günümüzde AD'de Tau ve A $\beta$  arasında nasıl bir ilişkinin olduğu hala bir sır olmaya devam etmektedir. Tau bazlı araştırmalara terapi açısından bakıldığında farklı yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır (Schneider ve Mandelkow 2008). Terapilerde hiperfosforilasyonlara karşı kinaz inhibitörleri ya da fosfostaz enzimini teşvik ediciler, agregasyon inhibitörleri, miktotbl stabilitesini teşvik eden bileşikler (Tau işlev bozukluğunu dengelemek için) Tau bazlı immunoterapik yaklaşımlar ortaya çıkmıştır.

## **2. GENEL KISIMLAR**

### **2.1.TAU PROTEİNİNİN YAPI VE İŞLEVİ**

Tau proteini, sıcağa dayanıklı ve asit uygulamasında işlev kaybına uğramayan MAP ler adı verilen gruba dahildir (Cleveland ve Ark., 1977). Tau'da bulunan bu özellik sekonder yapının çok düşük düzeyde olması nedeniyledir. Gerçekte birçok biyofiziksel araştırma Tau'nun prototipik “doğal olarak katlanmamış protein” olduğunu ortaya koymuştur (Von Bergen ve Ark., 2000). Tau düzensiz protein olması sebebi ile son derece esnek ve değişken bir konformasyona sahiptir, bu nedenle de kristallografi analizlerine uygun değildir. Dolayısıyla nükleer manyetik rezonans spektroskopisi yöntemi Tau proteininin konformasyonu ve dinamiğini açıklayabilmek için en uygun yöntemdir.



**Şekil 2: Tau'da yer alan domainler ve yapısal elementler. Üstte: Tau'nun NMR da elde edilen yapısı (Mukrasch ve Ark., 2009). Zincirlerin çoğu, sekonder yapısının ( $\alpha$  sarmal kırmızı,  $\beta$  iplik sarı, poliprolin sarmal yeşil) bir kaç kısa ve geçici elementleri ile ortaya konmuştur (Siyah çizgiler). Kırmızı kutu Tau kümesinden sorumlu iki heksapeptid motifinin bulunduğu bölgeyi göstermektedir. Orta: Alt bölümlerin domainleri gösterilmiştir (Gustke ve Ark., 1994). Karboksi uç mikrotübülle birleşmeyi kısmen teşvik eder ve amino uç mikrotübül yüzeyden kısmen yansır. N1, N2 ve R2 alternatif birleşmeye bağlı olarak yok olabilir. R1-R4 komşu domainler ile birlikte tekrarlanan domainleri sunar bu da mikrotübül etkileşim domainini göstermektedir. Altta: Etkileşim alanlarının ve diğer proteinlerin yaklaşık konumları gösterilmektedir.**

Tau proteininin C-ucundaki 31 ya da 32 amino asitlere üç (3R) ya da dört (4R) tübülün bağlanma domain tekrarlarının (R: Repeat) varlığı ve çeşitliliğine bağlı olarak izoformları saptanmıştır. Bu isoformlar 352'den 441'e kadar değişen amino asit residüleri açısından büyüklükte farklılık gösterirler.



**Tablo 1: Tau proteininin isoformları (Goedert ve Ark., 1989).**

<b>Klon</b>	<b>Ekler/tekrarlar</b>	<b>Amino Asit Sayısı</b>	<b>MW (kDa)</b>
htau 40	2N4R	441	45.9
htau 39	2N3R	410	42.6
htau 34	1N4R	412	43.0
htau 37	1N3R	381	39.7
htau 24	0N4R	383	40.0
htau 23	0N4R	352	36.7
Büyük Tau	2N4R + ekson 4A	695	72.7

Merkezi sinir sistemi (CNS) üzerinde ilave minor Tau izoformları ve daha çok peripheral sinir sisteminde (PNS) oluşan “büyük Tau” isoformları vardır (Andreadis 2006). Diğer memeli (fare, sıçan, inek) Tau'larının organizasyonları daha çok amino terminal bölgesinde olmak üzere birkaç değişiklikler hariç benzerdir, örneğin fare Tau'sunda 11 residüsü daha kısadır ve insan Tau'sunda karboksil terminal yarı identiktir (Lee ve Ark., 1986). Tau MAP2 ve MAP4 ile birlikte benzer domain yapısı olan protein ailesi oluşturur. Karboksil terminal yarısında 31 residünün 5 tekrarı ve amino terminal yarısının değişken boyutu (MAP2 1858 residü) çoğunlukla nöronal dendritlerde, MAP4 1152 residüsü ise bir çok hücre tipinde yaygındır (Doll ve Ark., 1993).

Tau domainleri mikrotübül etkileşimleri ve amino asit özellikleri bazında belirlenmiştir (Şekil 2). *In vitro* koşullarda Y197 arkasındaki kesim iki fragment oluşturur bunlar karboksil uç kısımları ile mikrotübüle bağlanır ve onların oluşmasını teşvik eder bu nedenle 'oluşum domanı' olarak adlandırılır (Steiner ve Ark., 1990). Amino uç fragmenti mikrotübüllere bağlanmamakta, fakat mikrotübül yüzeyinden dışarı uzantı yapmaktadır ve bundan dolayı 'projeksiyon domaini' olarak adlandırılmaktadır (Hirokawa ve Ark., 1988). Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisine dayanan daha detaylı analizler, bu verileri onaylamaktadır. Mikrotübüllerle belirgin etkileşimler Tau'nun 200 ve 400 residüleri arasında meydana gelmektedir (Mukrasch ve Ark., 2005).

Tau'nun amino asit dizilimi olağan dışı hidrofilitir ve proteinin katlanmamış karakteri ile uyumluluk göstermektedir. Tau'nun tam uzunluğu (2N4R) 80 S ya da T residüleri 56'sı negatif, 58'i pozitif ve 8'i de aromotiktir. Bu nedenle protein (5Y, 3Y, No W) genel olarak bazik özelliklere sahiptir, fakat amino terminalin 120 residüsü genellikle asidiktir ve karboksi terminal 40 residüsü genelde nötrdür. Bu yüklerdeki asimetri mikrotübüller ve diğer bileşenlerle etkileşim açısından iç katlanma ve Tau agregasyonu için önemlidir. Orta bölge (AA 150-240) çok sayıda prolin içerir, çoğu SP veya TP motifleridir, bu nedenle bu bölge prolin açısından zengin bölge olarak ele alınır. Bu prolin açısından yoğun olan bölge özel bir öneme sahiptir, çünkü bunlar AD'da genellikle SP ve TP motiflerini hiper fosforile hale gelen antikorların epitoplarını içerir. Bu nedenle hem hastalarda ve hemde hayvan modellerinde hastalık durumunu teşhis etmek açısından önem arz etmektedir.

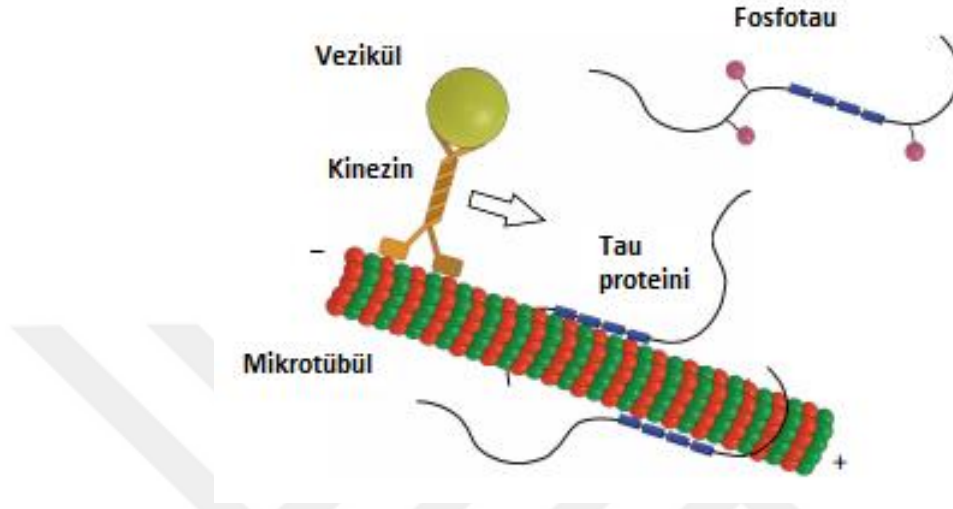
### **2.1.1.TAU YAPISI**

Tau hidrofilik yapısı nedeni ile diğer sitozolik proteinlerin tipik kompakt katlanmış yapısına sahip değildir. Çeşitli biyofiziksel yöntemlerle elde edilen veriler tüm Tau molekülünün doğal olarak katlanmadığını, ya da içsel olarak düzensiz olduğunu göstermektedir (Mukrasch ve Ark., 2009). Bu veri de polipeptid zincirin son derece esnek ve hareketli olduğunu ortaya koymaktadır. Sadece çok az miktarda

sekonder yapılar vardır ( $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -iplik, poli-prolin II sarmal) ve geçicidirler (Şekil 2 üst). Bu bulgu Tau'nun ısı, asit muamelesinden sonra dahi fizyolojik işlevinin mikrotübülleri stabilize ederek sağladığını ortaya koymaktadır (Fellous ve Ark., 1977). Birçok araştırma Tau'nun hücrenin içindeki kalabalık ortamda bulunan diğer proteinlerin bir çoğu ile, geçici etkileşimler oluşturabildiğini göstermektedir.

### **2.1.2.TAU VE MİKROTÜBÜLLER**

Mikrotübüller hücre iskeletinin protein polimerleridir ve çeşitli hücresel işlevlere sahiptirler, hücrelerin şeklini stabilize ederler, mitoz ve motor proteinlerin hücre içi taşınmasındaki işlevinin sağlanmasında rol oynarlar. Tau'da dahil olmak üzere bir çok protein MAP'ler olarak adlandırılmaktadır Tau ve diğer MAP'ler mikrotübül yüzeyine bağlanarak mikrotübülleri stabilize etmektedirler, tübülün alt ünitelerinin yapılanmalarını teşvik ederler fakat mikrotübül yapısı için asal nitelikte değildirler. Bunun aksine diğer iyi katlanmış mikrotübül uyumlu proteinler kinezin gibi daha kesin lokasyon göstermektedirler (Şekil 3).



**Şekil 3: Tau proteininin normal işlevi. Tau protein en uzun isoform durumunda mikrotübülleri dört tübülün bağlanma domainleri (mavi kutular) vasıtası ile stabilize ederler. Tau proteininin mikrotübüllere bağlanması kinaz ve fosfatazların aktivitesi ile dengelenir. Tau' nun fosforilasyonu (pembe küreler) mikrotübüllere bağlanma aktivitesini düzenler ve aksonal taşınmayı etkiler. Tau proteini mikrotübüller üzerinde kinezin tarafından veziküllerin artı uca taşınmasını engelleyebilir (Kolarova ve Ark., 2012).**

Nöronlarda, Tau tübülün ile karşılaştırılmıştır, son derece asidik karboksiterminal tübülün 30 residüleri sıkı bağlama için önemlidir (Littauer ve Ark., 1986), fakat doğal olarak katlanmamıştır dolayısı ile yapısal olarak görünmezdir. Birçok araştırmada Tau'nun dışarı çıkıntı yapan domaininin yaklaşık olarak 18'nm olduğu belirlenmiştir (Hirokawa ve Ark., 1988).

Mikrotübüller ile ilgili Tau işlevini saptamak doğrudan ve dolaylı etkileşimleri ayırt etmek için yararlıdır. Tau ve Tau'nun fosforilasyonu ile mikrotübüllerin yapılanmasında bağlanma, stabilize etme ve teşvik etme de dahil olmak üzere doğrudan

etkileşimler değişebilir (Brandt ve Ark., 2005). Bu fonksiyon, mikrotübül bağlanma domainini gerektirir fakat çıkıntı domainini gerektirmeyebilir. En önemli etki mikrotübül uçlarının uzunluk değişikliğine karşı (dinamik kararsızlık) yani uzama ya da kısalmaya karşı korunmasıdır. Uzama ve kısalmanın kontrolü hücrel organizasyon için önemlidir (Hoogenraad ve Bradke 2009) ve Tau'nun yüksek stabilizasyonu da hücre canlılığına zarar verebilir (Thies ve Mandelkow 2007). Bu etkiden taksol gibi kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlarda yararlandığı bilinmektedir (Wilson ve Jordan 2013).

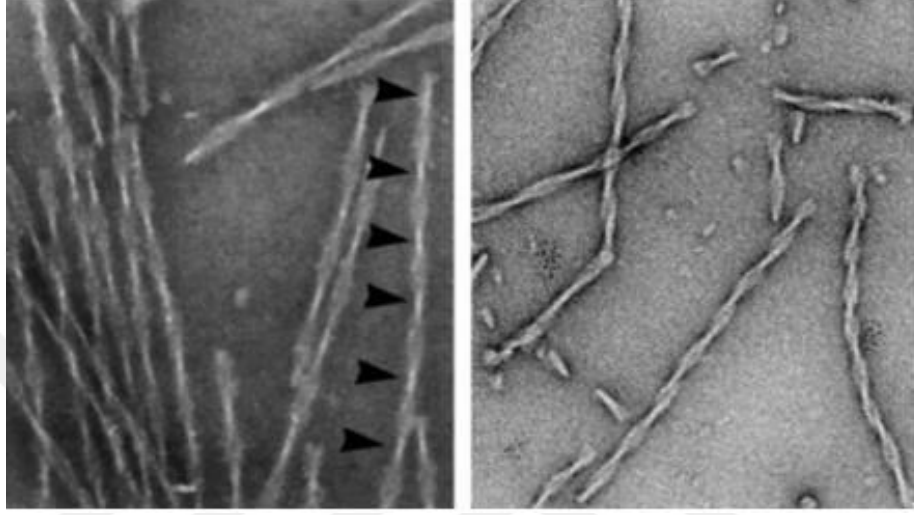
### 2.1.3. TAU LİFLERİNİN YAPISI

Tau proteininin hidrofilik, yapılandırılmamış ve dinamik olması göz önüne alındığında, AD hastalığında Tau'nun düzgün ve periyodik birikimi görülmektedir. Gerçekte *in vitro* koşullarda Tau'nun çözünürlüğü yaklaşık milimolardır, hücrelerdeki konsantrasyonundan (mikromolar) daha yüksektir, bu da *in vitro* koşullarda yapılanma koşullarının keşfedilmesinin neden uzun zaman aldığı açıklamaktadır (Wilson ve Binder 1995). Bununla birlikte iki faktör Tau'nun agregasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi Tau'nun bazik orta kısmının polianyonlar tarafından yükünün dengelenmesidir, bu *in vitro'da* sülfatlaşmış aminoglikanlarla (heparin, heparan sülfat gibi) (Perez ve Ark., 1996) sağlanır, bu da nukleasyon engelini aşılmasına yardım eder. Benzer etki nükleik asitler, (Kampers ve Ark., 1996) asidik lipid miseller (arakhidonik asitten elde edilen) (Wilson ve Binder 1997), asidik peptidler (Friedhoff ve Ark., 1998) veya karboksillenmiş mikro boncuklar ile indüklenebilir (Chirita ve Ark., 2005).

Nöronlarda Tau fibrilizasyonunu uyaranlar bilinmemektedir, fakat muhtemelen asidik kofaktörlerin etkisi söz konusudur (Papazosomenos ve Binder 1987). Peptidlerin karboksi uçlarının fazla yük içermesi nedeni ile asidik protein ışınlarını temsil eden mikrotübüller özellikle ilgi çekmektedir. Tau mikrotübül yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır kendi, kendine yapılanmaz.

Mikrotübül yüzeyi Tau molekülleri ile filament şeklinde olmayan Tau örtüsü ile

yüklüdür (Ackmann ve Ark., 2000). Tau-Tau etkileşim yeri büyük oranda Tau-MT etkileşim yeri ile örtüşmektedir (Mukrasch ve Ark., 2005). Bu durumda mikrotübüller Tau'nun fibrilizasyon kapasitesini bozmaktadır, olasılıkla agregat olmayan konformasyonunu stabilize etmektedir, yani mikrotübüller etkin bir şekilde Tau'nun anormal agregasyonunu önlemek için şaperon olarak aktivite göstermektedirler.



**Şekil 4: Tau lifleri. Sol: Bükülmüş olarak görülen yaklaşık 80' nm aralarla 'Eşleşmiş sarmal yapılar'. Alzheimer beyin dokusundan izole edilmiştir (Oklar). Sağ: *in vitro*da Tau Liflerinin agregat oluşturmadan önce tekrarlanan domainleri (Barghorn ve Ark., 2000).**

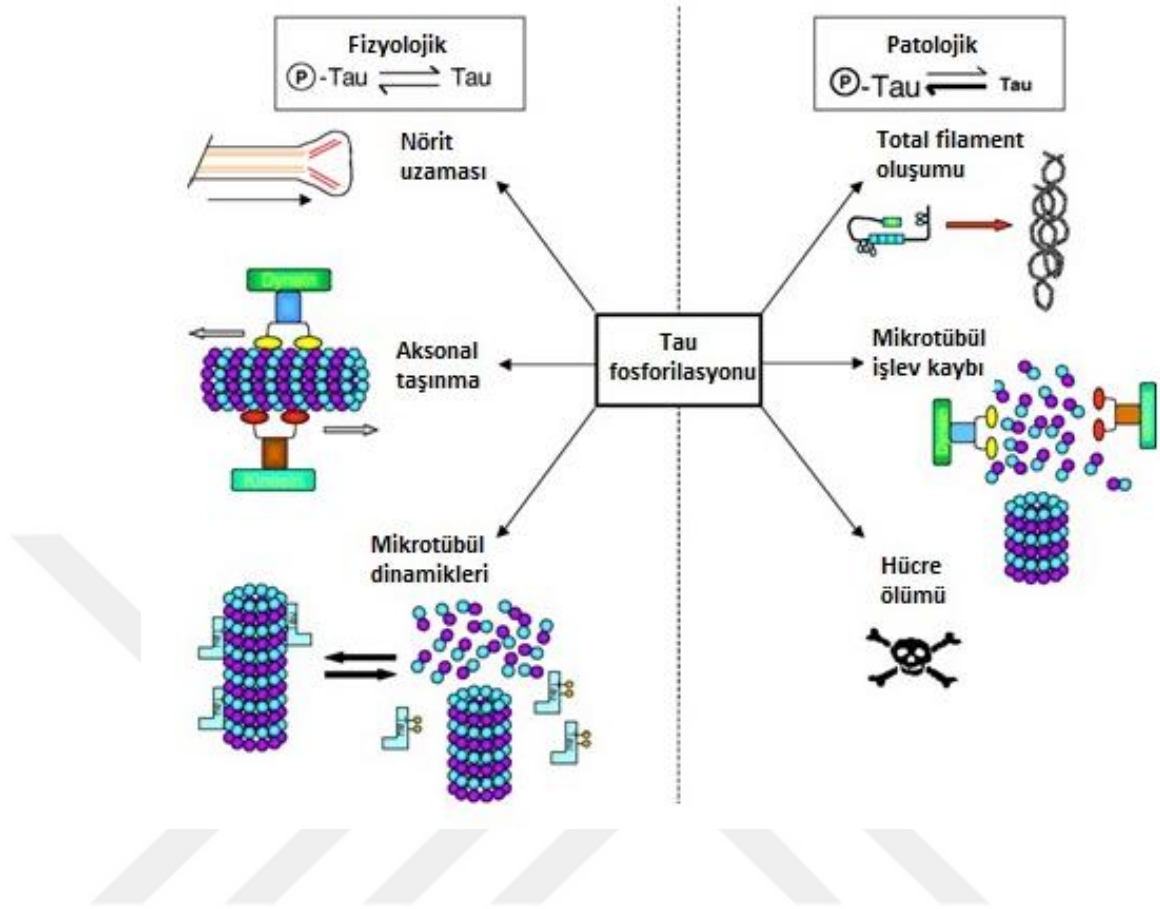
Tau yapılanmasındaki ikinci faktör R2 ve R3 başlangıcında heksapeptid motifleri tarafından kodlanan  $\beta$  yapısının tüketimidir (Von Bergen ve Ark., 2000). Bu motiflerin dağılımı (örneğin prolin mutasyonları) Tau'ların agregat olma eğilimini engeller bu hem *in vitro* da hem de hücre ve hayvan modellerinde gösterilmiştir. (Khlistunova ve Ark., 2007). Bunun aksine mutasyonlarla (örneğin P301L)  $\beta$  eğiliminin güçlendirmesi, *in vitro* ve hayvan modellerinde agregasyonu artırmaktadır.

Düzensiz proteine gömülü küçük boyutlu  $\beta$ -motifleri, bir 'amiloid' proteini gibi rollerini saptamada için güçlük çıkarttığı için Tau proteini uzun süre tartışılmıştır. Bununla birlikte  $\beta$  yapısı sirküler dikroizm ve FTIR ile (Barghorn ve Ark., 2004), NMR

(Mukrasch ve Ark., 2009), elektron difraksiyonu (Giannetti ve Ark., 2000) ve X ışını kristalografisi (Sawaya ve Ark., 2007) ile belirlenmiştir. Tau liflerinin korundaki  $\beta$  yapısının varlığı açıktır, detaylı yapısı ise hala bilinmemektedir.

#### **2.1.4. TAUPATİLER**

Taupatiler nörofibrillerde ya da gliafibrilar formlarında Tau proteinini patolojik birikimi ile uyumluluk gösteren nörodejeneratif hastalık grubuna verilen addır. Hiperfosforile Tau'nun ipliksi ve amorf agregatları birçok nörodejenetarif hastalıkta belirlenmiştir. Parkinsonizm ile, kortikobazal dejenerasyon (CBD), frontotemporal demans ve parkinsonizm bağlantılı kromozom 17 (FTDP-17), motor nöron hastalıklarını (amiyotropik lateral skleroz- Parkinson-demans kompleksi) gibi demans sendromları, AD ve Pick hastalığı içeren önemli Tau patolojileridir.



**Şekil 5: Tau'nun fizyolojik ve patolojik fosforilasyonu (Biernat ve Mandelkow 1999; Biernat ve Ark., 2002).**

AD'nin nörofibrilar karmaşaları hiperfosforile Tau proteininin hücre içi ipliksi agregatlarını içerir. Tau lifsi iplikler halinde yapılanabilir ya da eşleşmiş spiral filamentler oluşturur. Tau'nun kıvrık ya da kıvrılmamış filamentleri AD, PSPi, FTD ve CBD lere belirlenmiştir. Buna ilave olarak amorf Tau agregatları CBD beyinlerindeki astrositlerde bulunmuştur. Aktin yönünden zengin olan Hirano yapıları parakristal yapısındadır ve Tau'nun ipliksi olmayan agregatlarını içerir ve AD beyinlerinde diğer taupatilerde belirlenmiştir (Hirano 1994).

Tau agregatları sadece nöronlarla sınırlı değildir aynı zamanda CBD ve PSP lerin olifodendrositlerindeki glia hücrelerinde de görülmektedir. Tau patolojisi multisistem atrofide ve çeşitli FTDP-17 mutasyonlarında oligodendrositlerde önemlidir



ve nöronal ve glial Tau patolojilerinden farklıdır (Arima 2006). AD hastalarında NFT lerin sayısı cognitive azalışla ve nörodejenerasyonla uyumluluk gösterir ve Tau AD'nin teşhisinde genel bir belirteç olarak kullanılmaktadır, hastalığın erken evrede teşhisi önemlidir, erken tedavi hastalığın seyrini değiştirmektedir (Von Bergen ve Ark., 2000).

CSF'lerde total Tau düzeyi AD, Creutzfeldt-Jakob sendromu, frontotemporal demans (FTD) ve felç gibi yoğun nöronal dejenerasyon sürecinde artmaktadır, fakat Parkinson ve progresiv supranuklear palsy (PSP) de artmamaktadır (Kapaki ve Ark., 2001; Formichi ve Ark., 2006). Bu nedenle CSF total ve fosforile Tau düzeyleri AD teşhisi için çok önemli markırlardır. CSF de fosfo-Tau konsantrasyonu ortalama olarak % 78-92 arasında artmaktadır (Blennow ve Hampel 2003).

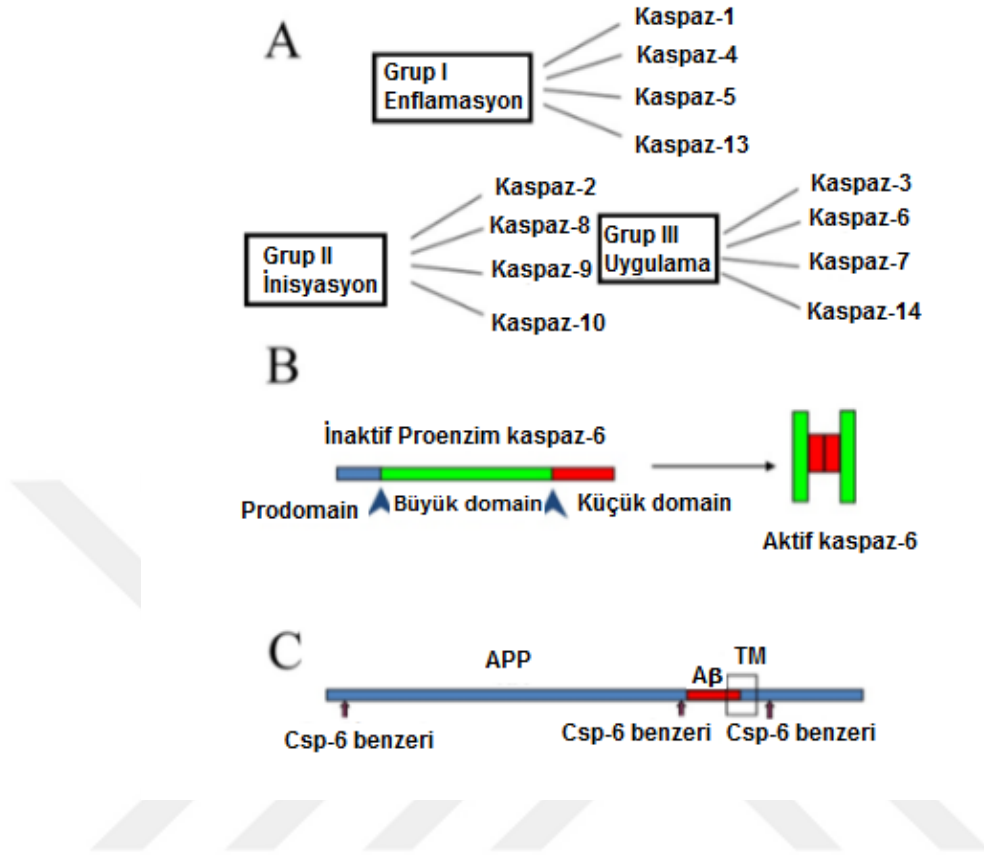
## **2.2. APOPTOZ**

Apoptoz, gelişimsel morfogenezde rol oynayan hücre ölümünün düzenlendiği bir olaydır, aynı zamanda hücre sayısını kontrol eder ve hücrelerin hasarını giderir. Bu nedenle tümör baskılanmasında önemli rol oynar. Hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz arasındaki denge vücutta bulunan net hücre sayısını belirler ve bu olaylardaki hatalı regülasyon tümörün oluşmasına sebep olur. Apoptoz vücuttaki ana tümör baskılama mekanizmasıdır, çünkü yoğun DNA hasarı olan ve dolayısı ile kanser meydana getirme potansiyeline sahip olan hücreleri yok eder. DNA hasarlı hücrelerin eliminasyonu tüm organizmayı kanserden korur. Apoptozdaki hatalar, etkilerini apoptoz yolu ile gösteren geleneksel terapilerin de etkinliğine etki etmektedir. Apoptoz bir tip hücre intiharıdır.

### **2.2.1. APAPTOZUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI**

Hücrelerin apoptoza uğrayabilmesi için hücre dışından 'ölüm faktörleri' adı verilen sinyali alması gerekir, ya da DNA hasarı veya oksidatif stres gibi içsel fiziksel/kimyasal etkenler tarafından indüklenmesi gerekir. Daha sonra sırası ile

intrinsik ve ekstrinsik iki yol ile aktive olabilir. Kaspazlar, intraselular proteinleri aspartat residüsünde (20 amino asitten biri) kıran bir moleküler makas gibi rol oynayan spesifik proteazlardır. Kaspazlar her iki yolda da asal rol oynar. Kaspazlar terimi enzimlerin üç özelliğinden türevlenmektedir: Bunlar sisteince zengin aspartat proteazlardır. On üç memeli kaspazı tayin edilmiştir. Bunlar prokaspazlar adı verilen inaktif enzimler olarak sentez edilirler ve aktif olabilmeleri için aspartat residüsünde kesilmeleri gerekir. Prokaspazların önemli kısmı inaktif olarak kabul edilmekle birlikte, prokaspazlar zayıf aktivite gösterir, tam aktif kaspazların % 2 si kadar proteolitik aktivite gösterirler. Bu muhtemelen kayda değer nitelikte değildir. Ayrıca, kaspazlar aspartat residüsünde kırıldığı için ve prokaspazlar da aspartat residüsünde kırılarak kendilerini aktive ettikleri için, kaspazlar kaskat aktivasyonu gösterir, bir kaspaz diğer kaspazı aktive eder ve bir zincir reaksiyon oluşur (Şekil 6). Kaspazların prokaspazları aktive ettiği bu mekanizma apoptotik sinyalin amplifikasyonuna neden olur: Sadece başlangıçta aktive olan kaspaz molekülleri prokaspazlardan oluşan havuzun hızlı ve tam olarak dönüşmesini sağlayabilir.



**Şekil 6:** Kaspazlar apoptoz sırasında protein yıkımından sorumlu sistenil proteazlardır. A. Yukarıdaki şemada işlevlerine göre kaspazların kategorize edilmesi gösterilmektedir. Asal işlevlerine bağlı olarak üç grup kaspaz bulunmaktadır. B. pro-kaspaz-6 aktivasyonu ile aktif kaspaz-6 oluşumu görülmektedir. Kaspaz-6 aktivasyonu ile pro-domain ile büyük alt unite (p20) ve büyük alt unite ile küçük alt unite (p10) arasında kırılmalar meydana gelir. C. APP de kaspaz benzeri kırılma şematik olarak gösterilmektedir. APP üzerinde üç kaspaz benzeri kırılma vardır. TM: Transmembran domain (Zhang 2013).

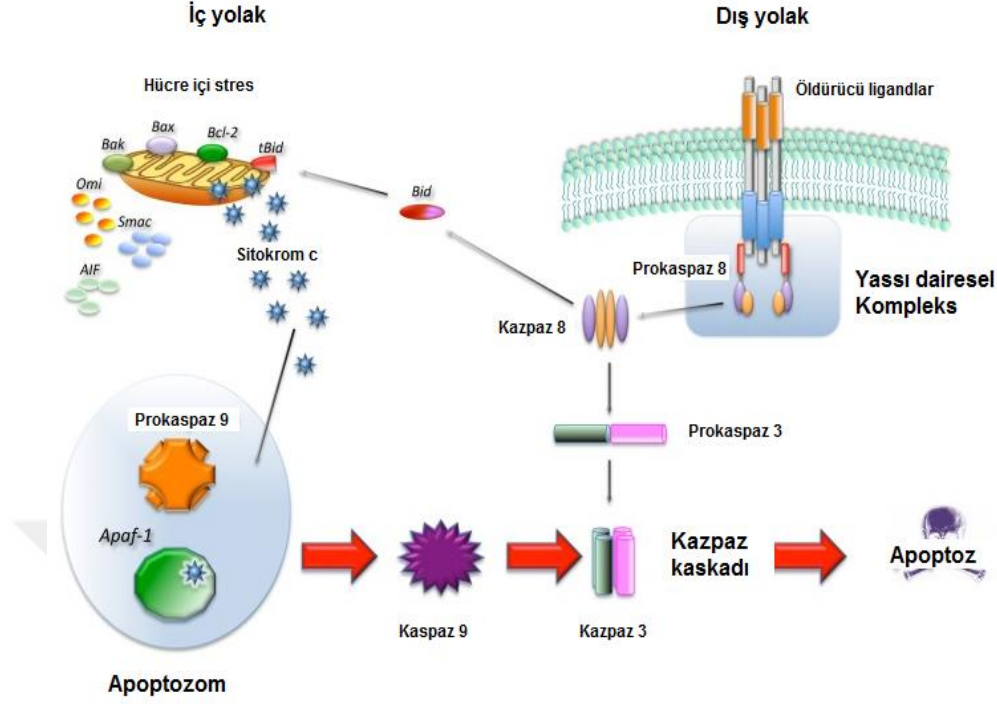
### 2.2.2. EKSTRİNSİK YOLAK: MEMBRANDAKİ ÖLÜM RESEPTÖRLERİ ARACILIĞI İLE

Hücre ölümünü tetikleyen ekstrinsik yolak (Şekil 7), hücre büyümesinin tetiklenmesi ile ilgili yolakla bazı olağan özellikleri paylaşır. Fas ligand gibi bir ölüm faktörü veya tümör nekroz faktörü (TNF) sırası ile Fas reseptörü ya da TNF reseptörü

gibi transmembran ölüm reseptörü tarafından kabul edilir. Fas ligand komşu hücrelerin plazma membranına bağlıdır. Ligand ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman, reseptörde yapısal değişiklikler meydana gelir ve oligomerize olur (yani birkaçı bir araya gelir), böylelikle sinyal hücreye taşınır. Yapısal değişim, reseptörlerin sitoplazmik kuyruğunda lokalize olan ölüm domainlerini açığa çıkarır ve intraselüler adaptör proteinlerin, örneğin FADD (Fas uyumlu ölüm domain proteini) ve TRADD (TNF reseptör uyumlu ölüm domain proteini) gibi, ölüm domainleri aracılığı ile bağlanmasını mümkün kılar.

Adaptör proteinlerin işlevi sinyali reseptörden kaspazlara taşımaktır. Adaptörler birçok prokaspaz-8 molekülünü ölüm efektör domainler aracılığı tutar. Kaspaz-8 aynı zamanda başlatıcı kaspaz olarak bilinmektedir, çünkü reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıdır ve ekstrinsik yol için anahtar niteliğindedir. Ölüm ligandları, reseptörler, adaptörler ve başlatıcı kaspazın hepsine birden ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) adı verilir. Prokaspaz-8 molekülleri kendi kendini kırarak aktif hale gelirler, çünkü prokaspazlar düşük enzimatik aktiviteye sahiptirler ve bu kaspaz aktivasyon kaskatını başlatır: Aktive olan bir kaspaz, diğer kaspazları kırar ve aktive eder. Bu olay apoptoz inhibitörü c-flip tarafından inhibe edilebilir. c-flip, DED vasıtası ile FADD adaptörüne bağlanabilir ve kaspaz-8 in aktivitesini inhibe eder.

Hücresinin yıkımı, hedef proteinlerin proteolizinden dolayı meydana gelir. Hedef proteinler, nükleusun büzülmesine neden olan nükleer laminler, hücre yapısının yeniden düzenlenmesi için aktin ve intermediate filamentler gibi hücre iskeleti proteinleri ve kromatinin kırılmasını sağlayan kaspazların aktive ettiği DNaz gibi diğer enzimleri içerir. Kaspazların aktive ettiği DNaz, DNA yı nükleozomların arasından kırar ve DNA kırıkları meydana gelir. DNA kırıkları araştırmacılar tarafından apoptoz belirteci olarak kullanılmaktadır. Kaspazlar aynı zamanda tümör baskılayıcı protein Retinoblastomayı (RB) de kırar ve bu kırılma RB proteininin yıkımına sebep olur. Bu olay TNF tarafından indüklenen apoptoz için gereklidir, bu veri de RB nin apoptoz inhibisyonundaki rolünü ortaya koymaktadır.



**Şekil 7: Apoptoza sebep olan moleküler yollar. Dış yolda ligandın spesifik reseptöre bağlanması ile DISC kompleksi oluşur ve kaspaz 8 aktivasyonu gerçekleşir. İç yolda mitokondrilerden Sitokrom C serbestlenmesi ile apoptozom oluşur ve kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz 8 ve 9 da hücre ölümüne sebep olan kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olur. Her iki yolak da BH3 proteini BID'in kırılması ile bağlantılıdır (Favaloro ve Ark., 2012).**

### 2.2.3. MİTOKONDİRİ ARACILI İNTRİNSİK YOLAK

Apoptozun intrinsik yolağı dış uyartılara (yani ölüm faktörleri) dayalı değildir. DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyartı, apoptozun intrinsik yolağını mitokondrinin dış membranına etki eden Bcl-2 ailesi proteinleri yolu ile indükler. Bcl-2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi vardır, hepsi en az bir Bcl-2 homoloji (BH) domaini içerir, bu domain protein-protein ilişkisine aracılık yapar. Aile üyelerinin çoğu

üç ya da dört BH domainini paylaşır. Bcl-2 ailesi içinde birbiri ile zıt işlev yapan iki grup mevcuttur: Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptozun inhibe eder diğeri ise teşvik eder (Tablo 2).

**Tablo 2: Bcl-2 ailesi üyeleri (Peccerino, 2012)**

Anti-apoptotik üyeler	Pro-apoptotik üyeler	Pro-apoptotik üyeler-BH3 only üyeleri
Bcl-2	Bax	Bad
Bcl-xL	Bok/Mtd	Bik/Nbk/Bik
Bcl-w	Bcl-x <sub>s</sub>	Bid
A1	Bak	Hrk/DP5
Mcl-1	Bcl-G <sub>L</sub>	Bim/Bod
Boo		Bmf
		Noxa
		Puma/Bcl3

Pro-apoptotik moleküllerden oluşan grup içinde BH-3 only proteinleri olarak isimlendirilen alt grup vardır, çünkü bunlarda bir BH domaini, BH-3 vardır. BH-3 only proteinleri pro-apoptotik moleküllerin aktivitesini ya indükler (BH-3 only aktivatörleri) ya da anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerin bağlanarak inhibe eder. Bcl-2 ailesi proteinlerinin mitokondri dış membranında ya kanal oluşturarak ya da kanalları bloke ederek etkili olduğu düşünülmektedir. Böylece Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondrilerden, önemli moleküler apoptotik araçların serbestlenmesini regüle etmektedir. Bu ailenin üyeleri protein-protein ilişkisi ile uyumluluk gösterebilir ve böylece aktivitenin oranı işlevi belirlemiş olur. Örneğin, eğer düşük inhibisyon nedeni ile pro-apoptotik faktörlerin aktivitesi anti-apoptotik olanlardan yüksekse apoptoz

tetiklenir. Bcl-2 ailesi proteinlerin aktiviteleri aynı zamanda fosforilasyon ile de regüle olmaktadır.

İki mitokondri membranının arasındaki intermembran alan, apoptotik araçlar için bir kabin işlevi yapar. Pro-apoptotik Bcl-2 üyeleri apoptotik araçların bu mitokondri kısmından serbestlenmesini bazen mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu olarak adlandırılan olayla düzenler. Apoptotik sinyal tarafından aktivasyona bağlı olarak Bax veya Bak sitoplazmadan mitokondriye taşınırken şekilsel değişiklik geçirir ve dış mitokondri membranına girerler (insersiyon). Altı ila sekiz molekülün oligomerizasyonu bu insersiyondan sonra meydana gelir ve BH-3 only proteinleri Bid ve Bim tarafından indüklenir. Mitokondri membranı içindeki bu yeni konformasyon, membran kanallarını oluşturarak ve/veya regüle ederek mitokondrinin dış membranının permeabilitesini artırır ve apoptotik araçlar serbestlenir. Yeni bir modelde ise Bax ve Bak oligomerlerinin membran içinde polimer oluşturduğu ve bunun da membranda yırtılmaya neden olduğu ileri sürülmektedir. Ve Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik moleküllerin etkisini bloke eder (Reed, 2006).

Aerobik solunumda elektron transport zincirinde de işlevsel olan sitokrom C ve prokaspaz-9 sitoplazmaya serbestlenir ve apoptozom adı verilen komplekste birikir ve aynı zamanda dATP de Apaf-1 e bağlanır. Sitokrom C'nin sitosolik Apaf-1 e bağlanması ile tekerleğe benzeyen heptamerik kompleks oluşumu tetiklenir ve prokaspaz-9 un, hem Apaf-1 ve hem de prokaspaz-9 da bulunan CARD domainleri adı verilen protein domainler aracılığı ile tutulması kolaylaşır. Son yıllarda yapılan yapısal çalışmalar CARD domainlerinin ve dolayısı ile prokaspaz-9 moleküllerinin merkezi halkada yer aldığını ortaya koymuştur.

Apaf-1 bir kofaktör proteindir ve prokaspaz-9 aktivasyonu için gereklidir. Kaspaz-9 başlatıcı kaspazdır, agregasyon tarafından aktive edilir, agregasyon başka bir

kaspaz kaskatının kırılması ile başlar ve downstream kaspaz-3, -6 ve -7 yi aktive eder. Bu durumda kaspaz-9 intrinsik yolakta anahtar niteliğindedir.

Apoptoz proteinlerinin inhibitörleri (IAP ler; sekiz memeli IAP si tayin edilmiştir) gibi diğer faktörler ve Smac (second mitochondria derived activator/DIABLO) olayı modüle etmede rol oynar. NFkB adı verilen transkripsiyon faktörü inflamasyonda esas rolü oynar ve apoptozun potansiyel inhibitörüdür, IAP lerin transkripsiyonunu indükler.

#### **2.2.4. EKSTRİNSİK VE İNTRİNSİK YOLLAR ARASINDAKİ KARŞILIKLI İLİŞKİLER**

Ekstrinsik ve intrinsik yollar arasında karşılıklı bir ilişkinin varlığı söz konusudur ve downstream kaspazlarının aktivasyonunda iki uyum vardır. Örneğin, kaspaz-8 ekstrinsik yolun anahtar regülatörüdür, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi Bid i proteolitik olarak kırar ve aktive eder . Daha sonra Bid, doğrudan Bax ve Bak'ı aktive ederek apoptozun intrinsik yolunu stimüle eder ve mitokondrilerden Sitokrom C nin serbestlenmesini kolaylaştırır ve daha sonra da downstream kaspazların aktivasyonunu indükler. Buna ilave olarak Bid, DNA hasarına cevap olarak intrinsik yol ile hücre devri olaylarının regülasyonunu birleştirir.

Tümör baskılayıcı protein p53 genomun gardiyanı rolünü oynar ve bunu DNA hasarına ve hücrel strese cevap olarak apoptozu indükleyerek yapar. Bu hem transkripsiyona bağımlılık ve hem de transkripsiyona bağımsızlık anlamını taşır. Transkripsiyon faktörü olarak p53, ölüm reseptörlerini ve Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini kodlayan genlerin ekspresyonunu indükler. Fas reseptörü, Bax ve Bak bu genlere örnek oluşturur. Bu genler promotor bölgelerinde p53 bağlanma yerinde konsensus içerir. P53 aynı zamanda, Bcl-2 ve Bcl-x ve IAP ler gibi anti-apoptotik faktörlerin ifadesini baskılayabilir. Son veriler, Bcl-2 ailesi üyesi PUMA (p53 ün



upregüle ettiği apoptozun modülatörü) p53 ün hedefidir ve p53 tarafından apoptozun indüklenmesi için esastır. DNA ya hasar veren ilaçlar, radyasyon, onkogenik aktivasyon ve hücre stresi tarafında indüklenen apoptoz, PUMA geni knock-out olan farelerde bloke olmuştur. P53, apoptozun transkripsiyona-bağımlı regülasyonunu sağlayabilir. Bu, transkripsiyonu regüle edemeyen p53 mutantları ile apoptoz indüklenerek gösterilmiştir, bu p53 mutantların birisinde DNA bağlama domainleri eksiktir, bu nedenle de hedef p53 geni ile ilişki kuramazlar. Bir diğer mutantta nuklear lokalizasyon sinyali yoktur, bu nedenle p53 ün nukleusda hedef genlere ulaşması önlenir, yine bir diğer mutantta da p53 transaktivasyon domaini, transkripsiyonal aktivasyon işlevini önler. P53 ün transkripsiyona bağımsız apoptoz mekanizması, sitoplazmada Bax ın p53 aktivasyonunu içerir ve daha sonra da sitokrom C serbestlenir ve kaspaz aktive olur (Chipuk ve ark. 2004). Pro-apoptotik proteinlerin (yani Bid) serbestlenmesinde P53 ün rolü, anti-apoptotik proteinler (Bcl-xL) tarafından tecrit edilmesi (ayrılması) ile desteklenmektedir. Bu durumda Bcl-2 ailesi proteinlerinin işlevsel dengesi değişmektedir. PUMA proteini transkripsiyonal ve p53 ün sitoplazmik işlevler arasında bağlantı sağlar (Chipuk ve ark. 2005). Veriler p53 ün PUMA transkripsiyonunu aktive ettiğini ortaya koymuştur; Daha sonra PUMA proteini p53 ün sitoplazmada Bcl-xL den serbestlenmesini sağlar, böylece p53 doğrudan Bax ı aktive eder. Özetle p53 transkripsiyona-bağımlı ve transkripsiyona-bağımsız olarak hem nukleus ve hem de sitoplazmada işlev yapar ve bu işlevler PUMA tarafından birbirine bağlanır.

### **2.2.5. ALZHEİMER HASTALIĞI VE APOPTOZ**

AD patofizyolojisi beyinde amiloid plaklarının birikimini ve nöronların kaybını ortaya koymaktadır. Bu hastalıkta nöronların ölüm mekanizması hala açıklık kazanmamakla birlikte apoptozla ilgili olduğu yönünde pek çok veri bulunmaktadır (Bamberg ve Landreth, 2002). Hastalığın ilerlemesi ve patolojisinde enflamasyon olaylarının da etkin olduğu belirlenmiştir. Amiloid plak oluşumu yaşlılıkla ilgili olarak plaklı mikroglia oluşumu ile uyumluluk göstermekte bunun sonucu olarak hücreler

fenotipik aktivasyona uğramak üzere stimüle olmakta, nörotoksik ve ön inflamasyon ürünleri meydana gelmektedir.

AD' de nöronların ölmesi ile ilgili olarak araştırmacılar apoptoz göstergeleri olan DNA kırıkları ve kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu göstermişlerdir. Ayrıca anti-apoptotik ilaçların AD'lerde hastalığın ilerlemesini yavaşlattığını bulmuşlardır (Behl 2000).

GSK 3 overekspresyonunun AD patolojisi ve nöronal kayıplarla olduğu bilinmektedir. GSK3 lokalizasyon araştırmaları GSK3 ve A $\beta$  peptid, GSK3 ve mikrotübül uyumlu Tau protein ve GSK3 ve apoptotik hücre ölümü arasındaki çoklu ilişkileri ortaya koymuştur. Apoptotik sinyal işlemi iç ya da dış yolak ile meydana gelir. GSK3'ün iç apoptotik sinyal yolunu teşvik ederek AD'de nöronların ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Mines ve Ark., 2011). Özellikle en önemli veri GSK3'ün A $\beta$  tarafından iç apoptotik yolağın belirlenmesidir. Sonuç olarak GSK3 apoptoz aracılı nöronal kayıplara sebep olarak AD'de birçok nöropatolojik mekanizmaları yönlendirmektedir.

## **2.2.6. CDK5 İNHİBİTÖRLERİ VE TAU İLİŞKİSİ**

Kobayashi ve arkadaşları (1993) Tau protein kinaz II'nin CDK5 olduğunu keşfetmişlerdir (Kobayashi ve Ark., 1993). CDK5 birçok substratı fosforile etmektedir ve insulin eksositozu, nörotransmitter serbestlenmesi (Tomizawa ve Ark., 2002), dopamine sinyal yolağı ve nörit büyümesi ile ilgili olduğu bilinmektedir. CDK5 33 kDa prolin tarafından yönlendirilen bir protein kinazdır ve serin treonini fosforile eder. Birçok araştırmada CDK5 aktivitesinin akson büyümesinde, nöronal göçte, sinaptik işlevde, nörit büyümesinde, sinir kas kavşağında sinaps oluşumunda ve miyogenezde (Smith ve Ark., 2001) önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CDK5'in substratlarının çoğu

mikrotübüllerle uyumlu Tau protein gibi hücre iskeleti proteinleridir. Saflaştırılmış CDK5 in *in vitro* da birçok Tau epitopunu fosforile ettiği gösterilmiştir (Paudel ve Ark., 1993). Birçok patolojide Tau şu residüleri fosforile etmektedir: Ser202, Thr205, Thr212, Thr217, Ser235, Ser396 ve Ser404.

CDK5'in tam aktivasyon için, aktivasyon çengelinin fosforlanması gerekir ve bu p35 ya da p39, p25 varlıklarına bağlıdır (Tsai ve Ark., 1994). P25 p35'in proteolitik olarak kırılmasından oluşur ve bilinmeyen bir mekanizma ile nöronal hücre ölümüne sebep olmaktadır ve AD'nin ilerlemesi ile ilgilidir (Takashima ve Ark., 2001). CDK'yı aktive ederek Tau'nun fosforile edilmesi açısından P25, P35'den daha etkilidir. CDK5 in nöronlarda ve hücre hatlarında aşırı ifadesi ve aktivatörleri Tau fosforilasyonunu uyarır. Ayrıca fare modellerinde CDK5 ya da p25'in aşırı ifade edilmesi NFT'lerin oluşmasına sebep olmaktadır (Cruz ve Ark., 2003).

CDK5 inhibitörü roskovitinin birçok nörolojik hastalık ve kanserlerde faz I ve faz II çalışmaları sürmektedir (Meijer ve Raymond 2003).

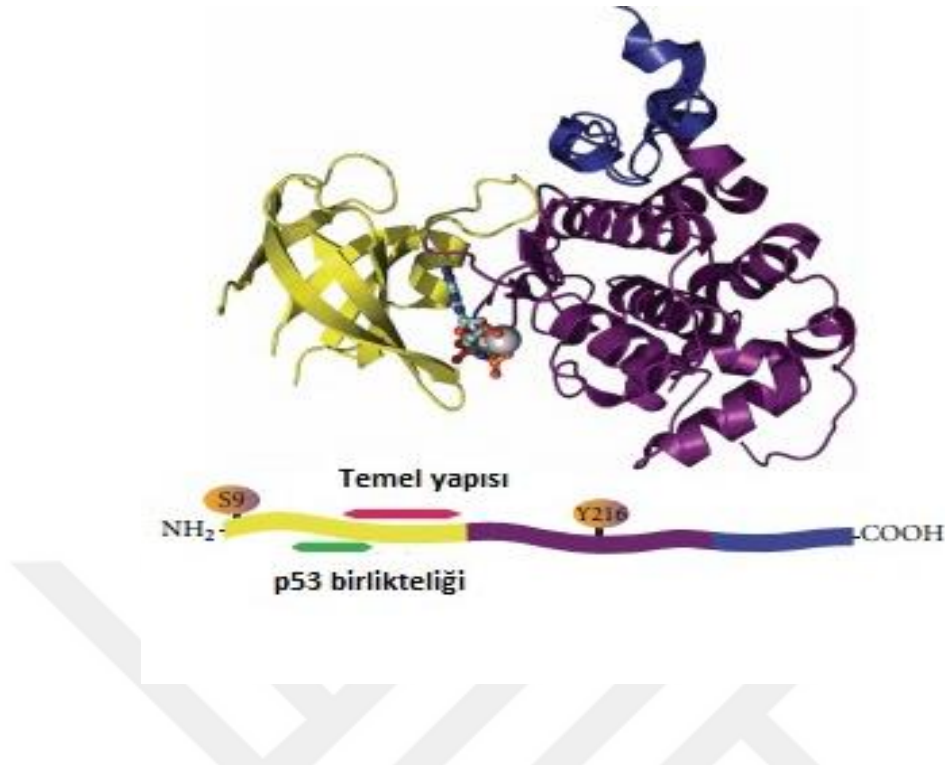
## **2.3. GSK-3 $\beta$ ' NİN HÜCRE ÖLÜMÜ YOLLARINDAKİ ÇİFT İŞLEVLİ ROLÜ**

### **2.3.1.GSK-3 $\beta$ ' NİN TANIMI:**

Glikojen sintaz kinaz-3 (GSK-3) ,  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki izoform olmak üzere yaygın bir protein kinazdır. Glikojen biyosentezindeki ana rolü olan glikojen sentazın fosforilasyonunu inaktive etmesine dayanarak Wnt ve diğer sinyal yolları vasıtası ile sayısız işlevi düzenlediği belirlenmiştir (Frame ve Cohen 2001). Bu iki isoform kinaz domain içinde son derece korunmuştur fakat C-ucunda farklılık gösterirler, alfa isoformu ilaveten glisin açısından zengin N-uç uzantısı içerir (Doble ve Woodgett 2003). Glikojen sentaz 3 $\beta$  farklılaşma, büyüme, çoğalma, hareket, hücre devrinin ilerlemesi, embriyonik gelişim, apoptoz ve insulin cevabı gibi pek çok hücrel işlevden

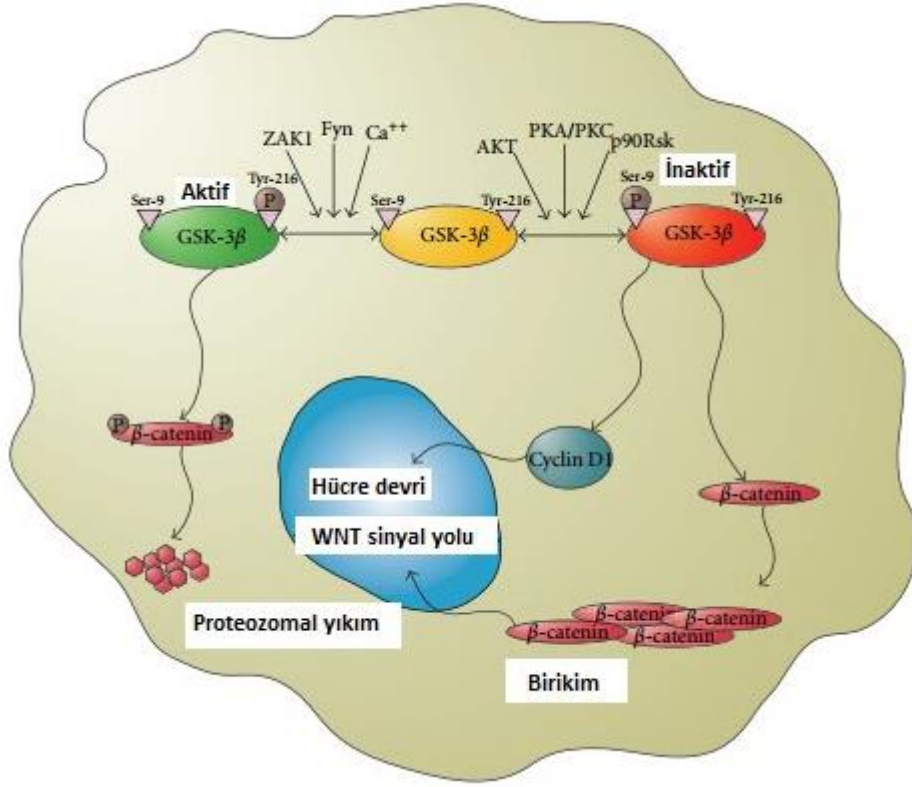
sorumludur (Jacobs ve Ark., 2012). GSK-3 $\beta$ 'nın farklı uyaranlara cevap olarak nöronal endotelial hepatosit, fibroblast ve astrosid hücre ölümlerinde önemli bir düzenleyici olduğu kanıtlanmıştır (Pap ve Cooper 2002).

GSK-3 $\beta$  insanda 12 ekson ve farede 11 ekson içerir ATG başlangıç kodonu ekson 1 içinde ve TAG stop kodonu da terminal eksondadır. Gen ürünü 45 kDa proteindir, insanda 433 amino asit içerir ve farelerde 420 bağlantı eksonunda bulunan 1. ekson ve TAG durdurucu kodon ile ATG başlangıç kodonuna yerleşmiş insanlardaki 12.eksonu farelerdeki 11 eksonu içermektedir. Gen ürünü insanlarda 433 ve farelerde 420 amino asit içerir. Şekil 8'de GSK-3 $\beta$ 'nın yapısı görülmektedir diğer Ser/Thr kinazlara benzerdir. N terminal 135 residü içerir ve 7-strand- $\beta$  barrel motifi içerir. Küçük bağlayıcı domain N terminal domain merkezi  $\alpha$ -heliks domainine bağlar ve 139-342 residüden oluşur. ATP bağlayan yer N-terminal ve  $\alpha$ -heliks domaininin iç yüzeyindedir.



**Şekil 8: Glikojen sentaz kinaz 3β'nin (GSK-3β) yapısı. GSK-3β üç belirgin yapısal domain içeren 433 protein residüsünden oluşan bir proteindir. N uç domain (Gamblin ve Ark., ) ilk 134 residü içerir ve 7 strand-β barrel oluşturur. N terminal domainden kısa bir bağlayıcı, 135 -151 residüleri N terminal domainini α-heliks domainine bağlar (Mora çalan kırmızı). α-heliks domaini 152 -342 residüden oluşmuştur. N terminal ve α-heliks domaini arasında sıkışmış alan ATP bağlayıcı alandır. C terminal domain 343-433 residü içerir (Couchie ve Ark., ). Bu şekil GSK-3β' nın şerit şemasıdır. Ser-9'un fosforilasyonu enzimi inaktive eder buna karşın Tyr -216 'nın fosforilasyonunu aktive eder. P53 ile uyumlu bölge ve temel domain bölgelerinin her ikisi de N-terminal domaininde yerleşim gösterirler (Jacobs ve Ark., 2012).**

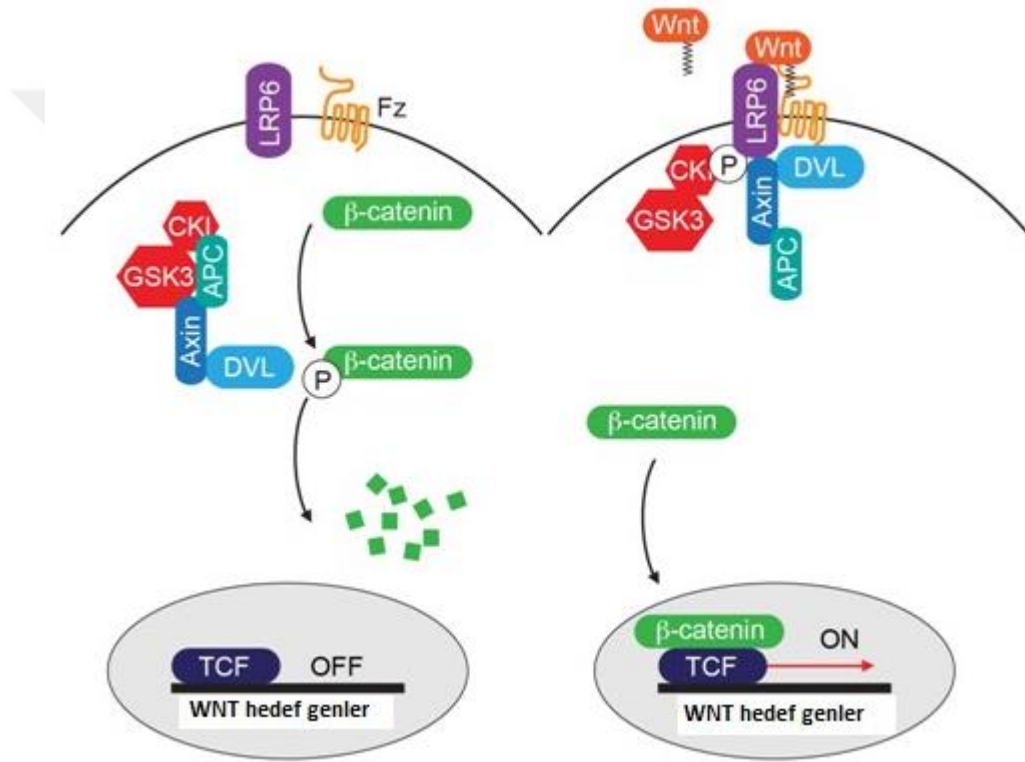
α sarmal domainin çekirdeği ile etkileşim kuran bir heliks döngüsü oluşturur.78' den 92' ye kadar ki artıklar N uç amino asitleri p53 ile birleşmesi için gereklidir (Şekil 4). GSK-3β'nın aktivitesi Ser 9'daki fosforilasyon ile azaltılabilir. Birçok kinaz kinazlar modifikasyonda aracılık yapabilir, örneğin p70S6 kinaz, p90RSK, PKC ve Akt gibi (Cross ve Ark., 1995; Eldar-Finkelman ve Ark., 1995). Ser9'daki GSK-3β fosforilasyonunu azaltılmasına karşılık ZAK1 ile Tyr-216'daki GSK-3β fosforilasyonu veya Fyn enzim aktivitelerini artırır.



**Şekil 9: GSK-3β 'nın düzenlenmesi.** GSK-3β hücre akıbetini düzenleyen çeşitli sinyal yollarında rol oynayan çoklu fonksiyonu olan bir kinazdır. ZAK1 veya Fyn Tyr-216 yı fosforile edebilir ve GSK-3β'nin aktivitesi artar. GSK-3β, β-katenin gibi downstream hedeflerini fosforile edebilir ve ubiquitin-proteozom sisteminde yıkılabilir. Diğer taraftan Akt ve PKC, GSK-3β' nin enzimatik aktivitesini Ser9' u fosforile ederek azaltabilir. Bu nedenle GSK-3β aktivitesinin inhibisyonu sitosolde β-katenin stabilizasyon ve birikmesine neden olur ve gen ekspresyonunu düzenlemede işlev görmek üzere nukleusa yönlendirir. GSK-3β aynı zamanda D1 siklini fosforile ederek hücre döngüsünün düzenlenmesi ile de ilgilidir, bu da siklin D1 proteininin hızla proteolitik dönüşümünü sonuçlandırır (Jacobs ve Ark., 2012). GSK3β ifadesinin düzensiz olması diyabet, nöronal bozukluk, Alzheimer hastalığı, şizofreni, dopamin ile uyumlu davranışlar, bipolar bozukluk, Parkinson ve kanserin de içinde bulunduğu birçok patolojiye yol açmaktadır (Jacobs ve Ark., 2012).

GSK-3β'nin kanserle ilişkisini ortaya koyan veriler tümör baskılayıcı ve tümör teşvik edici roller ile desteklenmektedir, bu karşıt aktiviteler en azından kısmen de olsa hücre tipine ve sinyal ortamına bağlıdır. Örneğin GSK-3β prostat kanserinde androjen reseptörü tarafından teşvik edilen hücre büyümesini engellediği gösterilmiştir, bu

durumda bir tümör baskılayıcı olarak etki göstermektedir (Paudel ve Ark., 1993). Bunun aksine GSK-3 $\beta$  kolorektal kanserde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (Shakoori ve Ark., 2007) ve pankreas kanserinde de hücre sağkalımında nuklear faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aracılığı ile etkili olduğu belirlenmiştir (Pluquet ve Ark., 2005). Bu durumda da tümör promotörü olarak davranış sergilemektedir. Ayrıca, kinaz hücre sağkalımında ikili rol oynamakta ve aktive etmekte ya da apoptozu engellemektedir, dolayısı ile GSK-3 $\beta$ 'nin kanserle olan ilişkisi karmaşıktır (Şekil 9 ve Şekil 10)



**Şekil 10: WNT sinyal yolağı.  $\beta$  Katenin seviyelerinin düzenlenmesi ve Wnt sinyallerinde önemli bir evredir.  $\beta$  Katenin GSK-3 $\beta$  ile fosforile edilir ve daha sonra da ubiquitin-proteozom sisteminde yıkılır. GSK-3 $\beta$ 'nin inhibisyonu  $\beta$  kateninin sitozolde stabilizasyonuna ve birikimine neden olur böylelikle nukleusa girer ve gen ifadesini düzenler (Miller ve Moon 1996; Giles ve Ark., 2003).**

GSK-3 $\beta$  aynı zamanda hücre devrinin düzenlenmesinde de etkindir ve bunu siklin D1 in fosforile ederek yapar ve sonuçta siklin D1 proteininin hızla proteolitik yıkımı meydana gelir (Diehl ve Ark., 1998; Frame ve Cohen 2001). Doğal tip GSK-3 $\beta$ 'nın doğrudan overekspresyonunun farklı hücre kültürlerinde apoptozu uyardığı bilinmektedir ve ayrıca spesifik GSK-3 $\beta$  inhibitörleri apoptotik sinyal yolunu engellemektedir (Pap ve Cooper 2002). GSK-3 $\beta$ 'nın pro-apoptotik etkisi muhtemelen transkripsiyon faktörleri ve gen ifadesinin düzenlenmesini sonuçlandırmaktadır.

GSK-3 $\beta$  düzgün gelişim için gereklidir (Grimes ve Jope 2001) hayvanlar aleminde yaygın bir şekilde ifade edilmektedir. GSK-3 $\beta$  proteini ilk önce iskelet kasından izole edilmiştir, fakat daha sonra en çok beyin dokusunda özellikle nöronlarda ifade edildiği belirlenmiştir. Beyin dokusunda yüksek düzeyde ifade edilmesi muhtemelen nöronal sinyallerde çok önemli bir rol oynaması nedeniyledir. Nöron hücrelerinde GSK-3 $\beta$  dendrit uzaması ve yeni doğanlarda sinaps oluşumu için gereklidir.

### **2.3.2. GSK-3 $\beta$ 'NİN APOPTOZU DÜZENLEMESİ**

GSK-3 $\beta$ 'nin DNA hasarı (Watcharasit ve Ark., 2002) hipoksi (Loberg ve Ark., 2002) endoplazmik retikulum stresi (Song ve Ark., 2002) ve Huntington hastalığı ile uyumlu poliglutamin zehirlenmesi gibi çok çeşitli (Carmichael ve Ark., 2002) koşullarda apoptozu neden olduğu bilinmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında apoptoz primer hücre kültürlerinde (Cohen ve Goedert 2004), HT-22 hücrelerinde, PC12 hücrelerinde (Culbert ve Ark., 2001) ve insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde (Bijur ve Ark., 2000) ya GSK-3 $\beta$ 'ün etkinliğini zayıflatmakta ya da tamamen ortadan kaldırmaktadır.



GSK-3 $\beta$ , CREB ve ısı şoku faktörü 1 (Grimes ve Jope 2001) gibi pro-sağkalım transkripsiyon faktörlerini teşvik ederek ve p53 gibi pro-apoptotik transkripsiyon faktörlerini aktive ederek apoptozu teşvik etmektedir (Watcharasit ve Ark., 2002). Tablo 1 de apoptozu kolaylaştıran GSK-3 $\beta$ 'nin bazı alternatif koşulları gösterilmektedir.

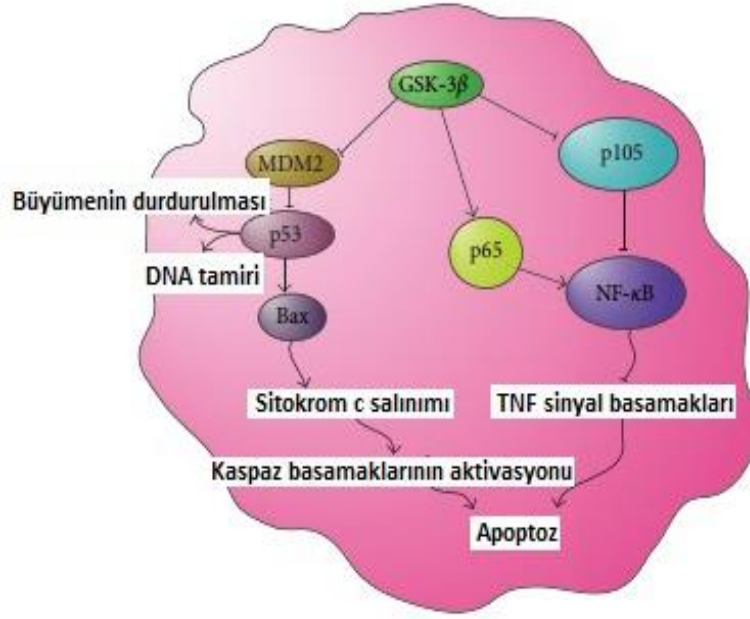
**Tablo 3: GSK-3 $\beta$ 'nin apoptozu teşvik ettiği koşullar (Jacobs ve Ark., 2012).**

<b>SİSTEM VEYA UYARTI</b>	<b>MEKANİZMA</b>
C Seramid-uyumlu hasar	AKT ve ERK yolaklarının fosforilasyonu ile ve GSK-3 $\beta$ nin defosforilasyonu ile inhibisyon GSK-3 $\beta$ inhibitörlerinin apoptozu AKT ve GSK-3 $\beta$ yı inhibe ederek engellemektedir.
LPS-aracılı endotoksik şok	LPS apoptotik sinyal regüle eden kinaz -1 (ASK-1) i ve stresin uyardığı apoptozla uyumlu serin-treonin kinazı stabilize etmektedir.
İmmun sistem	Aktive olan T hücrelerinin apoptozu düzenlemesi.
HIV-aracılı nöronal hasar	NF- $\kappa$ B inhibisyonu.
Nörodejeneratif hastalıkla ilişkili toksisite ve oksidatif stres	GSK-3 $\beta$ nin artan aktivitesi ile uyumluluk gösteren nöronal ve oligodendrosit hasarı ya da toksisite (prion peptidi dahil) GSK-3 $\beta$ nin negatif regülatörleri artan sağkalım faktörleri ile uyumluluk gösterir.
ER stres	ER stresi GSK-3 $\beta$ nin defosforilasyonuna sebep olabilir ve kaspaz-3 ü aktive ederek stresin uyardığı apoptozu açar.
Hipoksi/Ischemia	Mitokondriyal ölüm yolunu aktive eder.

Çok sayıda proteinin, tümör baskılayıcı transkripsiyon faktörü p53 ile bağlantılı olarak apoptozu düzenlemektedir (Kruse ve Gu 2009) birçok araştırmada GSK-3 $\beta$ 'nin pro-apoptotik etkinliği kanıtlanmıştır. DNA hasarını ardışık normal olarak kısa ömürlü olan p53 proteini stabilize olur ve fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon,

ubikuitinasyon, sumolasyon, glikosilasyon ve nedlasyon gibi post translasyonel modifikasyon geçirir. Bu regüle edici proteinlerden bir tanesi de GSK-3 $\beta$ 'dir, nuklear p53 ile kompleks oluşturarak, p53'ün uyardığı apoptozu teşvik eder (Watcharasit ve Ark., 2002). GSK-3 $\beta$  doğrudan p53'e bağlanır ve p53'ün C terminal bölgesi bu bağlantı için gereklidir (Watcharasit ve Ark., 2003). GSK-3 $\beta$ 'nın doğrudan Ser-33'de p53'ü fosforile ettiği gösterilmiştir (Pluquet ve Ark., 2005). GSK-3 $\beta$  aynı zamanda spesifik genlerin p53 aracılı transkripsiyonunu da teşvik eder ve hücre içi lokalizasyonu düzenler. GSK-3 $\beta$ 'nın p53'ü düzenlemesine ek olarak, aynı zamanda GSK-3 $\beta$ 'de p53 tarafından regüle edilir. GSK-3 $\beta$ 'nin aktivitesi fosforilasyona bağımsız bir mekanizma ile, doğrudan p53 GSK-3 $\beta$ 'ya bağlanarak da artar. GSK-3 $\beta$ 'nin nukleusdaki konumlanması aktive olan p53'e bağlanarak da düzenlenebilir (Eom ve Ark., 2007).

Doğrudan etkileşime ilave olarak, GSK-3 $\beta$ , p53 düzeyini p53 spesifik E3 ubikuitin ligaz MDM2'nin fosforilasyonu ile de düzenleyebilir (Kulikov ve Ark., 2012). P53'ün MDM2 ile düzenlenmesi çok yönlüdür. Klasik modelde, p53'ün Ser-15 (farede Ser-18) ve Ser-20 (farede Ser-23) de N-terminal fosforilasyonu MDM2 ile birleşmeyi engeller, böylece MDM2-aracılı ubikuitinasyon engellenir ve p53'ün proteozomal yıkımı ile sonuçlanır (Kruse ve Gu 2009) (Şekil 11).



**Şekil 11: GSK-3 $\beta$  'nın apoptoz sinyallerindeki rolü. Yukardaki şemada aktive olmuş GSK-3 $\beta$ 'nin apoptoz düzenlemedeki rolünü göstermektedir. Aktif GSK-3 $\beta$ , MDM2'nin p53'ü düzenlemesini engellemektedir, bu da DNA onarımına ve büyümenin durmasına yol açmaktadır, bazen de aktif kaspaz kaskatının aktivasyonu yolu ile Bax aracılı apoptozu teşvik eder. Aktif GSK-3 $\beta$  aynı zamanda IKK, I $\kappa$ B ve p65 aktive ederek NF $\kappa$ B' yi pozitif olarak regüle eder, böylece TNF-aracılı apoptozun engellenmesi ortaya çıkar. Bu etkiler TNF sinyal kaskatı yolu ile apoptozun başlamasını engeller (Jacobs ve Ark., 2012).**

Stabilize olan p53 daha sonra karmaşık bir ağ sistemine girerek DNA'ya bağlanmasını ve p53 hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu uyarır, bunu kısmen ko-aktivatörler ve ko-represörlerle yapar. Bu sağkalım, büyümenin durması, DNA onarımı ya da apoptoz gibi spesifik hücresel cevabı belirler (Kruse ve Gu 2009) Hipokampal nöronlarda GSK-3 $\beta$  inhibisyonu radyasyonun uyardığı apoptozu karşı koruyucu niteliktedir. GSK-3 $\beta$  inhibisyonundan benzer bir korunma da primer nöronlarda görülmüştür. Bu hücrelerde radyasyonun uyardığı apoptozdan korunma mekanizması hücre içi konumlanma ve GSK-3 $\beta$ , p53 ve MDM2 ilişkisidir. GSK-3 $\beta$  inhibisyonu MDM2 düzeyini artırarak radyasyonun uyardığı p53 birikimini bloke eder ve sonuçta radyasyona bağımlı apoptoz azalır (Thotala ve Ark., 2012). Buna ilave

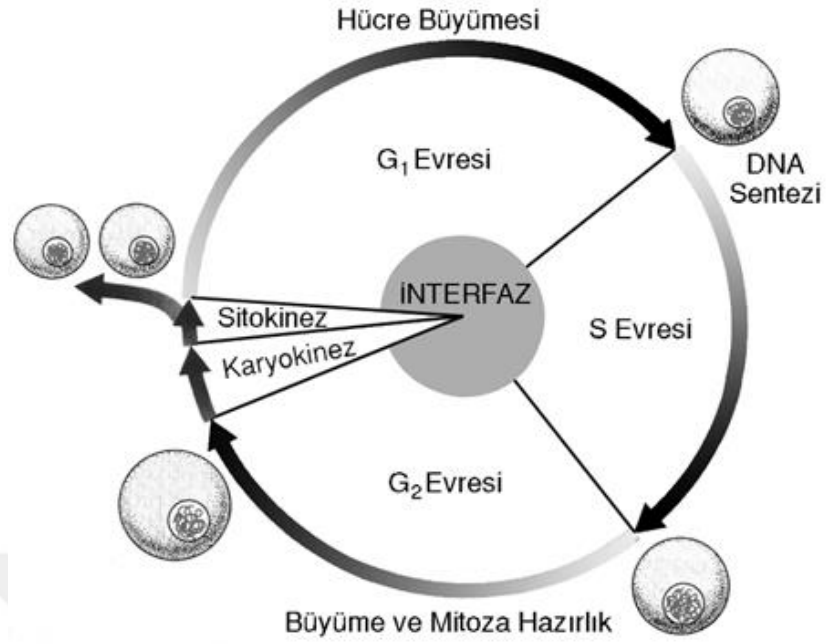
olarak radyasyonun uyardığı p53 fosforilasyonu, birikimi ve nukleusa taşınmasını engellemek için GSK-3 $\beta$  inhibisyonu meydana gelir ve MDM2 birikimine neden olur ve GSK-3 $\beta$ , p53 ve MDM2 sitoplazmada kalır ve orada p53 bu durumda hedef genlere etki edemez (Thotala ve Ark., 2012).

Daha önce belirtildiği gibi, apoptotik cevabın düzenlenmesinde memeli hücreleri Bcl-2 ailesinden çoklu pro-sağkalım proteinlerini (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, bcl-w ve A1) görevlendirir, bunlar Bax ve Bak 'ın pro-apoptotik fonksiyonuna zıt davranır (Watcharasit ve Ark., 2002). Bax ve Bak mitokondri dış membranda yer alır ve sitosole Sitokrom C'lerin serbestlenmesini sağlayarak ölüm sinyallerini tetikler (Youle ve Strasser 2008). Apoptoz, hücreleri parçalamak için bir grup etkin kaspaza gerek duyar. Sitokrom C kaspaz-9'u, o da kaspaz-3'ü aktive eder (Li ve Ark., 1997). Kaspaz-3'ün aktivasyonu DNA onarım enzimi poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)' ın kırılmasında rol oynayan esas evredir, sonuçta genomik DNA fragmentasyonu meydana gelir. Bax protein düzeyleri ve kaspaz-3 kırılması (aktivasyonu) radyasyon nedeni ile artar ve GSK-3 $\beta$  inhibitörleri tarafından yok edilir. GSK-3 $\beta$ 'nın aynı zamanda mitokondriyal apoptotik sinyal ile uyumlu olduğu da saptanmıştır. GSK-3 $\beta$ 'nin inhibisyonu mitokondriden serbestlenen ve kaspaz-3 ü aktive eden ve apoptozu başlatan Sitokrom C tarafından engellenir. Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3-kinaz) ve downstream efektörleri, protein serin-treonin kinaz Akt GSK-3 $\beta$ 'nin negatif regülatörüdür, kaspaz kaskadının aktivasyonunun bloke ederek apoptozun engellenmesinde önemli rol oynar (Datta ve Ark., 1999).

## **2.4. SİNİR HÜCRE MODELİNDE GSK-3 $\beta$ TEMELLİ TAUPATİLERİN OLUŞUMU VE TEDAVİSİNDE TEMEL MOLEKÜLER MEKANİZMALAR**

### **2.4.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ**

Hücre bölünmesi, DNA replikasyonu ve replike olmuş kromozomların iki ayrı hücreye ayrılması ile birbirini izleyen iki süreçten oluşmaktadır. Aslında hücre bölünmesi mitoz ve nuklear bölünme süreci ve interfaz evresi –iki mitoz fazı arasındaki ara faz, olarak iki aşamaya bölünmektedir. Mitoz evresi profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarını içerirken; interfaz evresi de G1, S, ve G2 fazlarından oluşmaktadır (Şekil 12). DNA replikasyonu interfazın S fazında gerçekleşmektedir. G1 aralığında, S fazı öncesi hücrede DNA sentezi için gerekli değişiklikler meydana gelir ve takibinde hücreyi mitozu hazırlayan G2 aralığına girilir. G1, S, G2 ve M fazları standart hücre döngüsü aşamalarını oluşturmaktadır. G1 aralığındaki hücreler antimitojenik sinyaller ya da doğru mitojenik sinyallerin yokluğunda, DNA replikasyonundan önce büyüme ve proliferasyonun durduğu dinlenme evresi G0'a girebilmektedir (Vermeulen ve Ark., 2003).



Şekil 12: Hücre siklusu.

#### 2.4.2. SİKLİNE BAĞIMLI KİNAZLAR (CDK'LAR)

Hücre devrinin ortalama olarak uzunluğu 16 saattir (15 saat interfaz ve 1 saat mitoz), fakat bu hücre tipine bağımlılık gösterir. İnterfazda olan hücreler mikroskopta mitozda olan hücrelerden ayırt edilebilir çünkü interfazda kromozomlar izlenemez ve sadece mitoz sırasında kondansasyon nedeni ile görülebilir (Şekil 12).

G1 den başlayarak hücre devri saat yönünde gider. Hücrelerin çoğu olgun evrededir, hücre bölünme evresinde değildirler. Uyku halindedir ve G0 adı verilen inaktif periyota girerler, bu evre hücre devri dışında bir evredir. Mitojenler ya da büyüme faktörleri, bir şekilde G0 da bulunan hücreleri indükler ve hücreler tekrar hücre devrine girerler ve G1 restriksiyon noktası denilen kontrol noktasını geçerler. Restriksiyon noktasını geçmeden önce hücre bölünmesi mitojenlere bağımlıdır, sonra

ise hücreler geri dönüşken olmayan bir şekilde büyüme faktörlerine gerek olmaksızın hücre devrinde ilerler. Hücrelerin, hücre devrinin farklı fazlarından geçişi siklinler adı verilen protein seti tarafından koordine ve regüle edilir. Siklinler, sikline bağımlı kinazlarla (CDK'lar) beraber işlev yaparlar. Siklin olarak isimlendirilmenin nedeni hücre devri sırasında devresel bir şekilde konsantrasyonlarında değişim olmasıdır. Siklin proteininin konsantrasyonu genindeki transkripsiyona bağımlıdır. Siklinlerle CDK'ların eşleşmesi son derece spesifiktir. Siklinler, kendi CDK'larının regüle edici alt üniteleridir. Siklinin, kendi CDK partnerine bağlanmasına bağlı olarak, siklin CDK'nın katalitik alt ünitesinde konformasyonel değişikliği indükler ve aktif yer ortaya çıkar. Hücre devri sırasında CDK'ların konsantrasyonlarında ise değişim olmaz (Pecorino, 2012).

Hücre devrinin spesifik noktalarında farklı siklin-Cdk kompleksleri mevcuttur ve bunlar geri dönüşken olmayan faz geçişlerinde önemli regülatörlerdir. Bir önceki bölümde siklin D nin EGF sinyal yolundaki son hedeflerden birisi olduğu görüldü. Bu büyüme faktörleri arasında önemli bir bağlantıdır ve bunların gerçekte hücre çoğalmasını ne şekilde stimüle ettiğini göstermektedir. Siklin D ilk sentezlenen siklindir ve CDK 4/6 ile birlikte G1 evresine geçişi sağlar. Daha sonra da görüleceği gibi siklin D siklin E geninin ekspresyonunun regülasyonunda rol oynar ve siklin E nin ürünü G1 den S fazına geçişte önemlidir. Siklin A -CDK 2 S fazı için önemlidir. Siklin A,B-Cdk 1 G2 ve G2 den M fazına geçişi yönlendirir.

Hücre devri kontrol noktaları bir seri biyokimyasal yoldur ve hücrenin DNA hasarını hissetmesini ve ona cevap vermesini sağlar ve genomun bütünlüğü için önemlidir. G1 kontrol noktası DNA hasarına cevap olarak hücrenin G1 noktasında tutulu kalmasını sağlar, böylece S fazında DNA hasarının replike olmamasından emin olunur. G2 kontrol noktası hasara uğramış ve/veya replike olmamış DNA ya cevap olarak hücrenin tutulu kalmasını sağlar, böylece S fazının doğru bir şekilde

tamamlandığından emin olunur. M kontrol noktası ise mitotik iğ ipliği üzerinde kromozomların doğru konumlanıp konumlanmadığını kontrol eder ve buna bağlı olarak hücreyi tutulu kılar. Kontrol noktalarının komponentleri DNA hasarı sensörü, sinyal iletilici ya da efektörü olarak aktivite gösteren proteinlerdir. Kontrol noktalarındaki kesintiler (hatalar) karsinogeneze sebep olan mutasyonları ortaya koyar.

Siklin-CDK kompleksleri hedef proteinleri fosforile ederek etkilerini gösterirler. Daha önce de değinildiği gibi fosforilasyon proteinlerin aktivitelerini regüle etmede en önemli mekanizmadır. Hedefler, transkripsiyonel regülatörler, hücre iskeleti proteinleri, nuklear por ve zarf proteinler ve histonları içine alan çok çeşitli proteinleri içerir. Spesifik örnekleri kondensinler, nuklear laminler, golgi aparatının GM130 u, retinoblastoma proteini (RB ya da pRB), ve transkripsiyon faktörleri E2F ve Smad 3 teşkil eder. Sonuç olarak hücre devrinin asal olayları kromozomal kondensasyon, nuklear yıkım, golgi aparatının fragmentasyonu, regüle olan gen ekspresyonu ve mitotik iğ ipliği oluşumu kolaylaştırır. Defosforilasyon hücrenin yeni bir devre girmesi için önemli bir mekanizmadır.

#### **2.4.3. CDK'NIN REGÜLASYONU**

Olgun bireylerde bir saniyede 25 milyon hücre bölünür. Sayının bu kadar büyük olması aynı zamanda son derece düzenli bir regülasyonun var olduğunu ortaya koyar. CDK'lar, serin/treonin kinazlardır sırasal bir şekilde hücre devri olaylarının, fosforilasyon vasıtası ile düzenli bir şekilde ilerlemesini mümkün kılar. Bu nedenle CDK aktivitesinin regülasyonu, düzenli bir hücre çoğalması için önemlidir.

CDK regülasyonunda dört mekanizma vardır: siklinlerle ilişki, CDK inhibitörleri ile ilişki CDKI aktive etmek için fosfat gruplarının ilavesi ve CDK aktivitesinin inhibisyonu için fosfat gruplarının ilavesi. Düzenli bir regülasyon için



hücre devrine hangi faktörlerin meydana geldiği ve sonra da ortadan kalktığı önemlidir. Bu bir protein yıkım olayıdır aynı zamanda hücre devrinin kontrolünde önemli rol oynar (Reed, 2003). CDK regülasyon mekanizması aşağıda tartışılmaktadır.

#### **2.4.4. SIKLINLERLE İLİŞKİ**

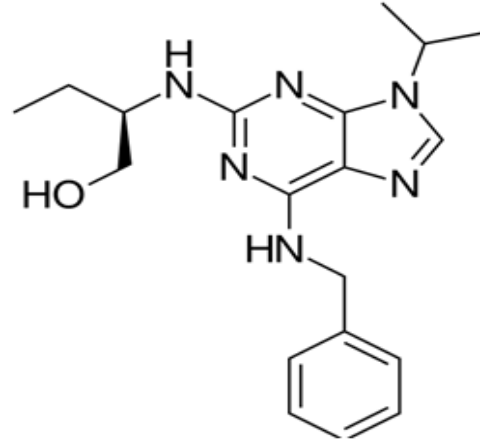
Siklinlerin partner CDK'ya bağlanması CDK'da önemli konformasyonel değişime sebep olur ve böylelikle protein substrata bağlanır ve ATP nin doğru pozisyonu oluşur. İnaktif CDK molekülü ise proteinin substrata bağlanmasını önleyici konformasyona sahiptir. Bazı siklinler CDK'ların spesifik substratlara afinitesini artırır. Daha önce de belirtildiği gibi, siklin protein miktarı hücre devri sırasında değişir. Protein düzeyleri, siklin genlerinin transkripsiyonel regülasyonu ve protein yıkımı tarafından modüle edilir. Bilindiği gibi, büyüme faktörü EGF'nin sinyal yolu aktivitesi sonucunda Siklin D geninin transkripsiyonel aktivitesi meydana gelir ve böylece restriksiyon noktasından geçişe izin verilir. Siklin proteinlerinin yıkımı bir proteazlardan oluşan bir kompleks olan proteozom tarafından meydana getirilir. Küçük polipeptid ubikuitinin, siklindeki lizin amino asidine kovalent ilavesi ile proteozom tarafından protein yıkım meydana gelir. Ubikuitinin, hedef proteine transferini katalize eden enzime ubikuitin-protein ligaz adı verilir. Siklinlerin ubikuitin aracılığı ile proteolizi CDK'ların konstitutiv aktivitesini önler. Ubikuitinasyon aynı zamanda kök hücre oluşumunda ve anjiyogenezde de önemlidir.

#### **2.4.5.ROSKOVİTİN**

ROSC 2-(R)-(1-Ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine (Seliciclib ya da CYC202) sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü ailesine mensup bir ilaç adayıdır, CDK2, CDK ve CDK9'un da içinde bulunduğu bir çok enzimi inhibe etmektedir (Şekil 12). Böylece uygulanan hücrelerin, hücre devri fazını ve durumunu

değiştirmektedir. ROSC küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), Cushing hastalığı, lösemi, HIV enfeksiyonu, Herpes simplex enfeksiyonu, sistik fibrosis ve kronik enflamasyon hastalıklarından başarı ile kullanılmaktadır.

Verilere göre ROSC hücreleri  $G_1$  ve  $G_2/M$  fazında durdurmaktadır, ancak ROSC'in apoptozla hücrelerde morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler, DNA fragmentasyonu, hücre hacminde azalma, mitokondrilerin depolarizasyonu, kaspaz aktivasyonu, kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon ve Sitokrom C serbestlenmesi gibi etkileri pek çok araştırmada ortaya konmuştur. ROSC kinaz proteinlerinin katalitik alt birimlerindeki ATP bağlanma bölgelerine bağlanarak CDK'ları inhibe etmektedir, diğer CDK inhibitörlerine kıyasla CDK 1 ve CDK 2' ye daha spesifiktir.



**Şekil 13: Roskovitin'in kimyasal yapısı (Dolečková ve Ark., 2013).**

Birçok farklı kanser hücre hatlarında ROSC'in apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ROSC zamana bağlı olarak kromozom kondansasyonu aracılığı ile apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bir başka MCF-7 meme kanseri hücrelerinde de ROSC'in apoptoza sebep olduğu bulunmuştur (Wojciechowski 2003).

## 2.6.AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, CDK inhibitörü ROSC'in GSK-3 $\beta$  temelli taupatilerdeki etkisinin insan hücre modelinde irdelenmesidir. Bu hedefe yönelik olarak ROSC'in nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS deki terapötik etkisi önce hücre sağ kalımı ve apoptotik parametrelerle detaylı olarak belirlendi. Daha sonra taupati açısından ROSC'in rolünü anlayabilmeye yönelik olarak Alzheimer biyobelirteçleri araştırıldı. Bu çalışmada elde edilen verilere dayanarak en son aşamada ROSC'in GSK-3 $\beta$  sinyal yolağı ve GSK-3 $\beta$  substratı  $\beta$ -kateninle olan etkileşimi ve ayrıca ROS oluşumu ile olan ilişkileri ortaya konmaya çalışıldı.

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1. KULLANILAN MALZEMELER**

##### **3.1.1. KULLANILAN CİHAZLAR**

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

##### **3.1.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI**

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’ de sunulmuştur.

##### **3.1.3. KULLANILAN KİMYASALLAR**

Kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’de sunulmuştur.

##### **3.1.4. KULLANILAN MOLEKÜLER BİYOLOJİ KİTLERİ**

Kullanılan moleküler biyoloji kitleri Tablo 4’te sunulmuştur

##### **3.1.5. KULLANILAN TAMPONLAR, ÇÖZELTİLER VE İÇERİKLERİ**

###### DMEM Besiyeri:

DMEM sıvı besiyeri

% 10 sığır fetüsü serumu

% 1 (10 U/ml) penisilin/streptomisin

% 0,1 mM asal olmayan amino asit

Bradford çözeltisi

Coomassie blue belirteci	25 mg
Etanol (%95)	12,5 ml
Asetik asit (%85)	25 ml
Saf su	212,5 ml

Yükleme Jel Tamponu: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Ayırma Jel Tamponu: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

% 10 (w/v) APS (amonyum persülfat) 10 ml

1 gr APS 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanır. -20°C'de saklanır.

%4'lük yükleme jeli (20 ml için)

2.6 ml Akrilamid:bis-akrilamid çözeltisi

5 ml Yükleme jel tamponu

0.2 ml % 10 (w/v) SDS

100 µl % 10 (w/v) APS

20 µl TEMED

12.2 ml saf su

%12'lik ayırma jeli (50 ml)

20 ml Akrilamid:bis-akrilamid çözeltisi

12.5 ml Ayırma jel tamponu

0.5 ml % 10 (w/v) SDS (sodyum dodesil sülfat)

500 µl % 10 (w/v) APS (amonyum persülfat)

25 µl TEMED (Tetrametletilendiamin)

17 ml saf su

TBS (Tris tamponlu tuz çözeltisi) (10X) (1 litre):

24,2 gr Tris bazi

80 gr NaCl

pH 7,6

1X TBS-Tween (1 litre):

100 ml TBS 10X

500 µl Tween 20

10X SDS-PAGE (SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yürütme tamponu (500 ml)

15.2 gr Tris bazi

72 gr glisin

5 gr SDS

Transfer tamponu (1 litre):

3 gr Tris bazi

14,4 gr Glisin

200 ml Metanol

Kemiluminisans Tamponu:

A çözeltisi

9 mlsaf su

1ml 1M tris-HCl, pH 8,5

45 µl kumarik asit

100 µl luminol

B çözeltisi

9 ml saf su

1ml 1M tris-HCl, pH 8,5

6,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Hazırlandıktan sonra karanlıkta saklanmaktadır.

## **3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE SAĞKALIM TAYİNİ**

### **3.2.1. HÜCRELERİN YETİŞTİRİLMESİ**

Tez kapsamında kullanılan nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS, American Type Tissue Culture Collection' dan temin edilmiştir. Bu hücre hattında insulin benzer büyüme hormonu (IGF-1) ifadesi gerçekleşmektedir. Kafkas bir çocuğun kemik iliği metastazından izole edilmiş ve yayılımcı kanser hücrelerini temsil etmektedir. Hücreler DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde % 10 sığır fetusu serumu, 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ve 0,1 mM asal olmayan amino asit ile % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de inkübatörde büyütülmüştür.

### **3.2.2. HÜCRELERİN KALDIRILMASI, SAYIMI VE PASAJLANMASI**

Petri kabındaki hücre sayısının artması sebebiyle hücre pasajlama işlemi yapılır. Petri kabında bulunan besin ortamı uzaklaştırılır. 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. 25cm<sup>2</sup> flaska 1 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve CO<sub>2</sub> içeren etüvde 5 dk inkübe edilmiştir. 5 dakika sonrasında tripsin -EDTA'nın etkinliğinin durdurmak için tripsin-EDTA miktarı ile eşit miktarda DMEM besi ortamına eklenerek hücreler falkona aktarılmıştır. 2000 rpm'de 4 dakika santifüj işlemi gerçekleştirilmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine 1 ml DMEM besi ortamı eklenerek pipetaj yapılmış ve hücreler homojenize hala getirilmiştir. Hücre süspansiyonunda 10 µl alınmış, Neubauer hemositometresi kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bir mililitredeki hücre sayısının öğrenilebilmesi için 10<sup>4</sup> ile çarpılır. 1x10<sup>6</sup> hücre, 25cm<sup>2</sup>'lik petri kabına eklenerek pasajlama işlemi yapılmıştır.

### **3.2.3. HÜCRE CANLILIĞI TAYİNİ**

1x10<sup>4</sup> hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra, hücrelere 0-50 µM ROSC 0-24 saat boyunca farklı

zaman aralıklarında uygulanmıştır. MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin yüzeyinde birikir. Bu bileşiklerin verdiği renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulmuş ve ilaç uygulanmamış kontrol örneklere oranlama yapılarak bağıl ROSC'in sitotoksik düzeyi belirlenmiştir.

#### **3.2.4. HÜCRE SAĞKALIM TAYİNİ**

Hücre sağkalım tayini için hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp, Neubauer hemositometrede sayıldıktan sonra  $1 \times 10^5$  hücre 6 kuyulu petrilere ekilmiş ve gece boyu hücrelerin petri kaplarına yapışmaları beklenmiştir. 0-24-48-72 ve 96 saatlik zaman dilimlerinde 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulanmış ve bu süreler sonunda hücreler yeniden tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj ile çöktürülmüşlerdir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavisini eklendikten sonra, 10  $\mu\text{l}$  hücre süspansiyonundan alınarak hemositometrede sayılmışlardır. Ölü olan hücreler tripan mavisini absorbe ederken, canlı olanlar şeffaf şekilde görülmüşlerdir. Bu şekilde ROSC uygulaması sonucu sağ kalan hücrelerin sayısı belirlenmiştir.

#### **3.2.5. SOFT AGAR İLE KOLONİ OLUŞUM TAYİNİ**

Yumuşak agar tabakaların hazırlanması: Alt agar için 500  $\mu\text{l}$  %0,5'lik agaroz ile 500  $\mu\text{l}$  %20 FBS içeren medya karıştırılıp 6 kuyucuklu petride her kuyuda 1 ml olacak şekilde dökülmüştür. Agar donana kadar laminer flow içerisinde bekletilmiştir. +37°C'de olan %0,3'lük agaroz %20 FBS içeren medya ile karıştırılıp üstüne %10 FBS medya 2500 hücre karışımı ve sırasıyla 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC ilave edilip pipetaj yapılmıştır. Hazırlanan solüsyon Petriye dökülüp ve homojen yayılmaları için yavaşça çalkalanmıştır. Daha sonra +37 °C 'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 8 gün bekletilip floresan ataçmanlı ışık mikroskopunda beyaz ışıkta 10x10, 20x10 ve 40x10 da görüntüleri belirlenmiştir.



### **3.2.6. KOLONİ OLUŞUM TAYİNİ**

Koloni oluşum tayini için hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp, Neubauer hemositometrede sayıldıktan sonra 7500 hücre 6 kuyulu petrinin üst kısmında bulunan 3 kuyuya ekimi yapılmıştır. 5000 hücre 6 kuyulu petrinin alt kısmında bulunan 3 kuyuya ekilmiş ve gece boyu hücrelerin petri kabına yapışmaları beklenmiştir. 24 saatlik zaman diliminde 0, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulanmış ve süre sonunda hücreler ChemiDoc cihazında görüntülenmiştir.

### **3.2.7. HÜCRELERİN DONDURULMASI VE ÇÖZDÜRÜLMESİ**

Erken pasaj sayıları olan hücreler yedeklemek amacıyla aşamalı olarak önce bir gece -80 °C buzdolabında, daha sonra uzun süre saklamak için -196 °C sıvı azot tankına alınmışlardır. Bu işlem için hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırıldıktan sonra, 2000 rpm'de santrifüj edildikten sonra sayılmış ve yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre kriyovial tüplerde dondurulmuştur. Dondurma işlemi için % 10'luk DMSO (Dimetilsulfoksit) kullanılmıştır.

Gerekli görüldüğünde hücreler sıvı azottan çıkartıldıktan sonra, hızlı bir şekilde çözündürülmüş ve önceden ısıtılarak 37 °C'ye getirilmiş besiyerinde 45 cm<sup>2</sup>'lik petri kaplarına alınmışlardır. Hücreler petri kabına yapıştıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve DMSO uzaklaştırılmıştır.

## **3.3. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER**

### **3.3.1. IŞIK MİKROSKOBU**

$1 \times 10^4$  hücre 12 kuyulu petri kaplarına ekildikten sonra yapışmaları için bir gece bekletilmiştir. Daha sonra 24 saat süreyle 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulanmıştır. ROSC uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu hücrelerin morfolojik görüntüleri fluoresan

ataçmanlı mikroskop ile beyaz ışıktta öncelikle 10x10 daha sonra 40x10 büyütmede belirlenmiştir.

### 3.3.2. FLUORESAN MİKROSKOBU

#### 3.3.2.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama

$1 \times 10^4$  SK-N-AS hücresi 12 kuyulu petri kaplarına ekilip bir gece yapışmaları beklendikten sonra, 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulanmıştır. İnkübasyon süresini takiben ilaçlı besiyeri mikropipet yardımıyla çekilip atıldıktan sonra, hücreler 5mg/ml propidyum iyodür (PI) içeren DMEM besiyeri ile 30 dakika boyunca bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda kuyulardan PI içeren medyum uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, 500  $\mu$ l PBS eklenerek floresan ataçmanlı mikroskop ile incelenmiştir (Eksitasyon:536 nm, Emisyon: 617nm). Ölü hücreler kırmızı renkte gözlemlenmiştir.

#### 3.3.2.2. 3,3 Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC6) Boyama

$1 \times 10^4$  sayıda SK-N-AS hücresi 12 kuyulu petri kabına ekildikten sonra, 24 saat süre ile 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulaması sonunda, ROSC'li DMEM besiyeri uzaklaştırılıp 4nm DiOC6 içeren besiyeri eklenmiştir. 15 dakika boyunca DiOC6 ile muamele sonucu hücreler boyayı içeren besiyerinden mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra bir kez PBS ile yıkanmış ve kuyulara 500  $\mu$ l PBS ilave edilmiştir. 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında floresan ataçmanlı mikroskop ile incelenmiş ve sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler yeşil olarak gözlemlenmiştir.

#### 3.3.2.3. 4 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

SK-N-AS hücrelerinde ROSC'in neden olduğu DNA kondensasyonunu gözlemlemek için DAPI boyama gerçekleştirilmiştir.  $1 \times 10^4$  sayıda SK-N-AS hücresi 12 kuyulu petri kabına ekilip bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra, 1 ve 10  $\mu$ M ROSC 24 saat süre ile uygulanmıştır. 24 saat sonunda ROSC içeren besiyeri uzaklaştırılıp yerine 5 mg/ml DAPI içeren besiyeri eklenmiş ve 10 dakika boyunca 37

°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda DAPI içeren medyum çekilip hücreler PBS ile yıkanmış ve her kuyuya 500 µl PBS eklenmesinin ardından DNA kondensasyonu floresan ataçmanlı mikroskop ile 350 nm eksitasyon ve 470 nm emisyon dalga boylarında incelenmiştir.

#### 3.3.2.4. 2',7'-diklorfloresein-diasetat (DCFH-DA) Boyama

DCFH-DA, ROSC uygulanan hücrelerde oluşan ROS üretimini görüntülemek için kullanılmıştır. DCFH-DA, normalde floresan özellikte olmayan fakat hücre içine difüze olduktan sonra, hücrede bulunan reaktif oksijenlerle okside olarak DCF molekülüne dönüşerek floresan ışımaya veren bir moleküldür. 1x10<sup>4</sup> sayıda SK-N-AS hücresine 12 kuyulu petri kabına ekildikten sonra, 10 µM ROSC 24 saat süresince uygulanmıştır. Son konsantrasyon 1 µM olacak şekilde 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 5 dakika bekletilen hücreler inkübasyon süresi sonrası PBS ile iki kez yıkanmışlardır. Daha sonra üzerlerine 500 ml fosfat tamponu eklendikten sonra, DCFH-DA'nın okside formu diklorfloreseinin floresan mikroskopunda emisyon 480 nm ve eksitasyon 500 nm dalga boylarında incelenmiştir.

### 3.4. FLUOROMETRİK YÖNTEM

SK-N-AS hücreleri 1x10<sup>4</sup> sayıda olacak şekilde 12 kuyulu petri kablalarına ekildikten sonra, 24 saat boyunca 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 1 µM ve 10 µM ROSC ile inkübe edilmişlerdir. ROS miktarının belirlenebilmesi için 24 saat sonunda ROSC uzaklaştırılmış ve hücreler bir kez 1X PBS ile yıkanmıştır. 1 µM DCFH-DA uygulanarak, 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 5 dakika bekletilmişlerdir. Inkübasyon süresi sonrası 1X PBS ile bir kez yıkanan hücrelere, 500 µl tripsin-EDTA eklenerek CO<sub>2</sub> içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Hücreler daha sonra 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüşlerdir. Bu işlemden sonra, hücrelerin üzerine 200 µl PBS eklenmiş ve hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. 96 kuyulu optikal petri kaplarına 50'şer µl olacak şekilde 4

ayrı tekrar şeklinde bölünen örnekler emisyon 480'nm ve eksitasyon 500'nm dalga boylarında incelenmiştir.

### **3.5. İMMUNOBLOTLAMA**

#### **3.5.1. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU**

SK-N-AS nöroblastoma hücreleri  $1 \times 10^6$  hücre/kuyu olacak şekilde 60 mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı (DMEM besiyerinde % 10 sığır fetüsü serumu, 10 U/ml penisilin/streptomisin ve % 0,1 mM asal olmayan amino asit) eklenmiştir. Bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücelere 24 saat süre boyunca 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulanmıştır. ROSC uygulamasından sonra besiyeri atılmış, hücreler soğuk 1X PBS ile bir kez yıkanmış ve tekrar 1X PBS eklenmiştir. Bu aşamada kazıyıcı yardımı ile hücreler kaldırılmış ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmışlardır. Tüpler 1 dakika 13200 rpm' de santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılmıştır. Çökeltinin üzerine hücre protein özütleme tamponu, %10 proteaz inhibitörü ilavesi ile eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika kalan örnekler daha sonra +4°C'de 20 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar total protein tayini için -80°C'de saklanmıştır.

#### **3.5.2. SİTOPLAZMİK VE NUKLEAR PROTEİN İZOLASYONU**

Sitoplazmik ve nuklear protein izolasyonu için ProteoJET sitoplazmik ve nuklear protein izolasyon kiti kullanılmıştır. SK-N-AS nöroblastoma hücreleri  $5 \times 10^6$  hücre/kuyu olacak şekilde 45' mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı eklenmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulanmıştır. İlaç uygulanmasından sonra, hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve 1X PBS içinde kazınarak kaldırılmış ve mikrofüj tüplerinde toplanmıştır. 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra hücre pelletine 200  $\mu$ l hücre lizis tamponu (proteaz inhibitörü ve 0,1M DTT içermektedir) eklenmiştir. Örnekler daha sonra karıştırılıp, 10 dakika buzda

tutulmuştur. +4°C' de 500 rpm'de 7 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant ayrı bir mikrofüj tüpüne alınmıştır (süpernatant sitoplazmik protein içermektedir). Çökeltinin üzerine 500 µl nukleus yıkama tamponu proteaz inhibitörü ve 0,1M DTT (dikloro difenol trikloroethan) içermektedir eklendikten sonra, örnekler karıştırılıp 2 dakika buzda bekletilmiştir. +4°C'de 500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır. Elde edilen çökeltinin üzerine 150 µl nukleus saklama tamponu (proteaz inhibitörü ve 0,1M DTT içermektedir) ve 1/10 hacim kadar nukleus lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler tekrar karıştırılarak 15 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra +4°C' de 13200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant başka bir mikrofüj tüpüne alınmıştır (nükleer protein içermektedir). İzole edilen proteinler -80°C' de saklanmıştır.

### **3.5.3. BRADFORD PROTEİN MİKTAR TAYİNİ**

İzole edilen proteinlerin miktarı Bradford yöntemiyle belirlenmektedir. 96 kuyucuklu petriye 1,5 µg/µl konsantrasyona sahip BSA artan miktarda kullanılarak standart bir eğri elde edilmiştir. 24 saat boyunca ROSC eklenmiş örneklerden 1'er µl 96 kuyucuklu petriye eklenmiştir. Proteinler üzerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenerek 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Mikroplaka okuyucuda 595 nm'de çıkan absorbans değerleri kullanılmış ve protein konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

### **3.5.4. PROTEİNLERİN SDS-PAGE'DE YÜRÜTÜLMESİ**

Konsantrasyonları hesaplanan proteinler 5X Laemli boyası eklenerek 95 °C'de 5 dakika ısıtıcıda bekletilmiştir. Hazırlanan proteinler %12'lik akrilamid/ bis-akrilamid jele belirlenen konsantrasyonlarda yüklenerek yürütme tamponu olan tankta 85 V'da yürütülmüştür.

### **3.5.5. MEMBRANA TRANSFER VE BLOKLAMA**

Yürütülen proteinler transfere alınmadan önce kullanılacak PDVF membran metanol ile aktif hale getirilmiştir. Jeldeki proteinler, transfer işleminden geçirilmiş 2,5

mA da 5 dakika boyunca membrana transfer edilmiştir. Membrana 1X TBS Tween solüsyonu ile hazırlanmış olan %5 yağsız sütte 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

### **3.5.6. BİRİNCİL VE İKİNCİL ANTİKOR İŞARETLEMELERİ**

İnkübasyon sonrası membranlar (1:1000) birincil antikorlarda bir gece boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir. Birincil antikorda beklenen membran ikincil antikora alınmadan önce 3 kez 1X TBS-T çözeltisi ile yıkanmış ve ikincil antikorla 1 gece boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir. Kemiluminesans ışımalar, ChemiDoc™ Imaging System, Bio-Rad ile görüntülenmiştir. Sonuçlar  $\beta$ -Aktin ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

## **3.6. AKIM SİTOMETRİSİ**

### **3.6.1. HÜCRELERİN HAZIRLANMASI**

$3 \times 10^5$  sayıda SK-N-ASHüresi 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek, bir gece boyunca 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde tutulmuşlardır. Petri kabının dibine yapışan hücrelere 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M ROSC uygulaması hücre döngüsünün tayini için 24, 48 ve 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Hücre membranının dışına çıkarak lokalizasyon değişikliği yapan fosfatilserinlerin tayini için kullanılan annexin V ve ölü hücrelerin belirlenmesi için kullanılan propidyum iyodür boyaması için ise 24 saatlik 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M ROSC uygulaması gerçekleştirilmiştir. Belirtilen zaman dilimlerinde ROSC uygulamasını takiben hem yüzen hücreler hem de tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj edilip, akım sitometrisi için hücreler hazırlanmaya başlanmıştır.

### **3.6.2. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN ANNEKSİN V VE PROPİDYUM İYODÜR BOYAMASI İLE AKIM SİTOMETRİSİNDE TAYİNİ**

Apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde anneksin V-PI boyama ile tespit edilmiştir. Protokol üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Kısaca; santrifüj edilen hücreler 500 µl anneksin V bağlama tamponu içinde karıştırıldıktan sonra, 5 µl annexin V-FITC ve 5 µl PI (50µg/ml) ile 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Örnekler daha sonra akım sitometrisinde değerlendirilmişlerdir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisi tarafından analiz edilmiştir. Annexin V floresansı absiste, PI floresansı ordinatta olmak üzere hücreler noktalar halinde dörtgen bölümlü grafikte sunulmuştur. Bu dörtgen grafiğin her bir bölmesindeki rakamlar hücre popülasyonunun % değerini temsil etmektedir. Dörtgenin her bir bölmesi sırasıyla: alt sol: canlı; alt sağ: erken apoptotik; üst sağ: geç apoptotik; üst sol: nekrotik hücre popülasyonlarını işaret eder. Veri analizi CellQuest programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir

### **3.6.3. HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN AKIM SİTOMETRİSİ KULLANILARAK İNCELENMESİ**

Tripsin-EDTA uygulaması sonrası santrifüj edilen hücreler %70 etanol ile fikse edilerek, 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilen hücreler daha sonra RNaz (100 ug/ml) ve PI (40 ug/ml) içeren 1X PBS içinde karıştırılmış ve örnekler 30 dakika boyunca 37 °C'de karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisinde incelenmiştir (Becton Dickinson). PI floresansı sunulan grafikte absiste verilmiştir. Bu grafiğe göre DNA miktarı, hücre siklusunun G1, S, G2 ve M evrelerinde değiştiği için, ilk pik 2n sayıda DNA içeren ve hücre siklusunun G1 fazındaki hücreleri, plato bölümü DNA sayısı artmaya başlayan S fazındaki hücreleri, 2. pik DNA sayısı 4n'e çıkmış G2 evresindeki hücreleri göstermektedir. G1 fazından önceki evre ise DNA kırıkları bulunduran

apoptotik hücrelerin yer aldığı subG1 fazı olarak bilinmektedir. Veri analizi CellQuest programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.7. İSTATİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel verilerin oluşturulabilmesi için veriler GraphPad Prism 6 programı aracılığı ile Bonferroni çoklu karşılaştırmalı veri analiz işlemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen p değerleri ilgili verilerin karşılaştırıldığı sonuçlar kısmında belirtilmiştir.

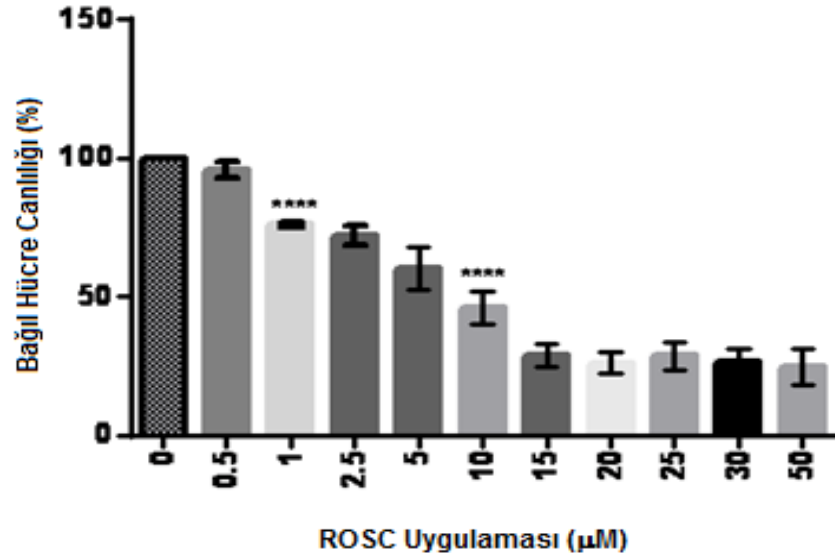




## **4. BULGULAR**

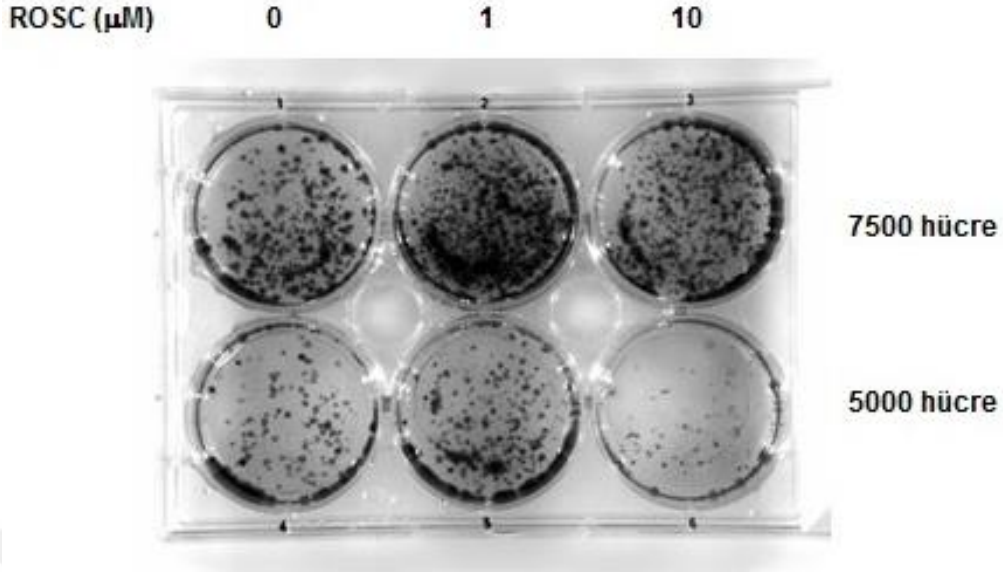
### **4.1. ROSKOVİTİN'İN İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTI SK-N-AS'DA HÜCRE ÇOĞALMASINI İNHİBE ETMEKTEDİR**

ROSC'in SK-N-AS hücre hattında etkisi incelenmiştir. ROSC'in hücre canlılığına etkisi ilk olarak MTT hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir. DMEM besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C' lik etüvde büyütülen SK-N-AS hücreleri, hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda ROSC (0-50µM) uygulamaları yapılmıştır. 1 µM ROSC uygulaması sonucu % 20 oranında, 10 µM ROSC uygulaması sonucunda ise % 50 oranında hücre canlılığında azalma gözlemlenmiştir. Şekil 14'de görüldüğü üzere, ROSC uygulanmış hücrelerin bağlı canlılık yüzdeleri zamana bağlı olarak azalmıştır.



**Şekil 14: SK-N-AS hücrelerinde roskovitin'in zamana bağlı bağlı hücre canlılığının doza bağlı olarak incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca (0-50 µM) farklı konsantrasyonlarda roskovitin ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.\*\*\*\*: p<0,0001.**

ROSC'in koloni oluşumuna etkisinin belirlenebilmesi amacı ile koloni oluşum testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 15). SK-N-AS hücreleri 5000 ve 7500 hücre olacak şekilde 6 kuyulu petri kabına ekilmiş ve gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra 24 saat boyunca 0, 1, 10 µM ROSC uygulanmıştır. 1 µM ROSC uygulaması sonucunda koloni oluşumuna etkisinin olmadığı, 10 µM ROSC uygulaması sonucunda ise koloni oluşumunda kayda değer bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.

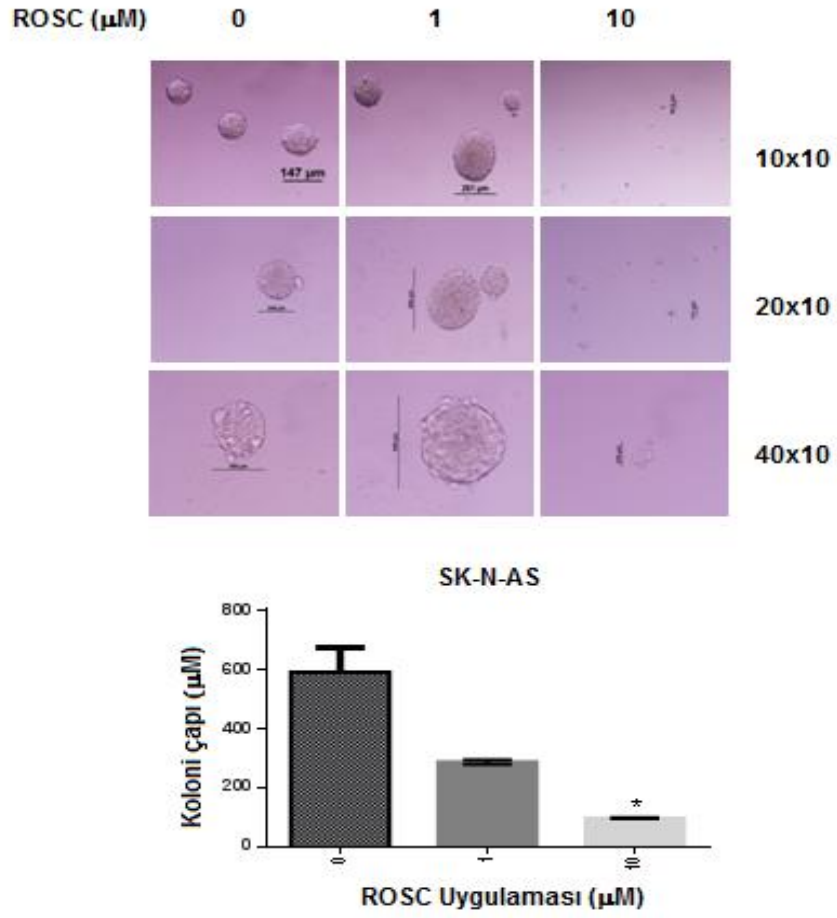


**Şekil 15: SK-N-AS hücrelerinde roskovitin koloni oluşumuna etkisinin incelenmesi.  $5 \times 10^3$  ve  $7 \times 10^3$  hücre/kuyu olacak şekilde SK-N-AS hücreleri petri kaplarına ekilmiş, 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu\text{M}$  roskovitin uygulanmış 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 14 gün sonunda fikse edilip kristal viyole ile boyanmış ve ışık mikroskobunda görüntüleri alınmıştır. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.**

ROSC'in SK-N-AS hücre hattında tümör oluşumuna etkisinin belirlenebilmesine yönelik olarak bu aşamada ROSC uygulaması ile soft agar içerisinde koloni çapı incelenmiştir. SK-N-AS hücreleri her kuyuda 2500 hücre olacak şekilde 6 kuyulu petri kabına soft agar ve 0, 1, 10  $\mu\text{M}$  ROSC ile homojen bir şekilde ekilmiştir. Daha sonra  $+37^\circ\text{C}$  'de % 5  $\text{CO}_2$  içeren etüvde 8 gün bekletilip floresan ataçmanlı ışık mikroskobunda beyaz ışıkta 10x10, 20x10 ve 40x10'da görüntüleri belirlenmiştir. Şekil 16'da görüldüğü üzere 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulaması sonucunda koloni çapında % 90 azalma, 1  $\mu\text{M}$  ROSC uygulaması sonucunda koloni çapında % 50 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 16).

ROSC uygulaması ile zamana bağlı olarak SK-N-AS hücrelerinde hücre sağ kalım tayininin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 17). SK-N-AS hücreleri  $1 \times 10^5$  hücre 6 kuyulu petrilere ekilmiş 0-24-48-72 zaman aralıklarında 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC

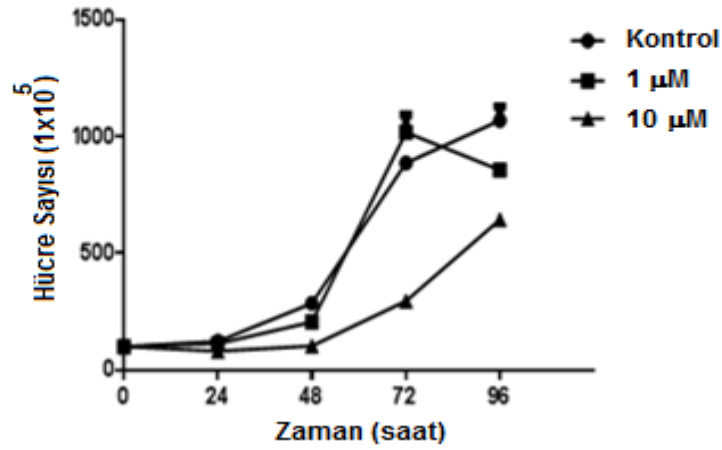
uygulanmış ve 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavisi eklendikten sonra hemositometrede sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Tablo 3'de belirtildiği gibi 0-24-48-72 zaman aralıklarında 1  $\mu$ M ROSC uygulaması ile 72 saatte hücre sayısı değişmemiş 96 saatte hücre çoğalması azalmıştır. 10  $\mu$ M ROSC uygulaması ise hücre sayısını indirirken hücre çoğalmasına ket vurmamıştır.



**Şekil 16: Roskovitin uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde soft agarda koloni oluşumunun incelenmesi. Soft agarda 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, 10 gün sonunda ışık mikroskobu altında incelenmiş ve koloni çapları ölçülmüştür. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. \* p= 0,012.**

**Tablo 4: Roskovitin'in SK-N-AS hücre hattında hücre sayısına etkisinin zaman ve doza bağlı olarak değişmesi. Değerler 3 farklı deneyin ortalamasıdır. \* p= 0,012.**

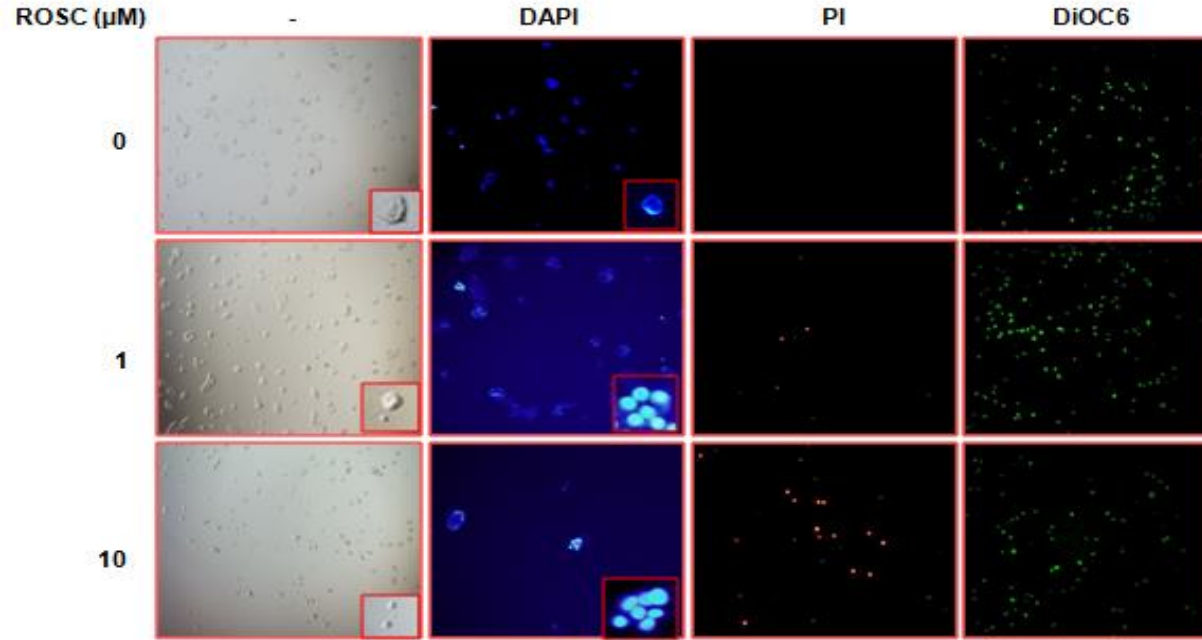
Zaman (Saat)	ROSC ( $\mu\text{M}$ )		
	0	1	10
	Hücre Sayısı ( $1 \times 10^3$ )		
Kontrol	100	100	100
24	123	113	80
48	285	205	113
72	886	1016	295
96	1068	856	645



**Şekil 17: SK-N-AS hücrelerinde roskovitin hücre sayısı ve çoğalması üzerine etkisinin belirlenmesi. Hücreler 24-96 saat boyunca 1 ve 10  $\mu\text{M}$  roskovitin uygulanmış ve hücreler tripan mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında hemositometre ile sayılmıştır. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.**

## 4.2. SK-N-AS NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE CDK İNHİBİTÖRÜ ROSKOVİTİN APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE NEDEN OLMAKTADIR

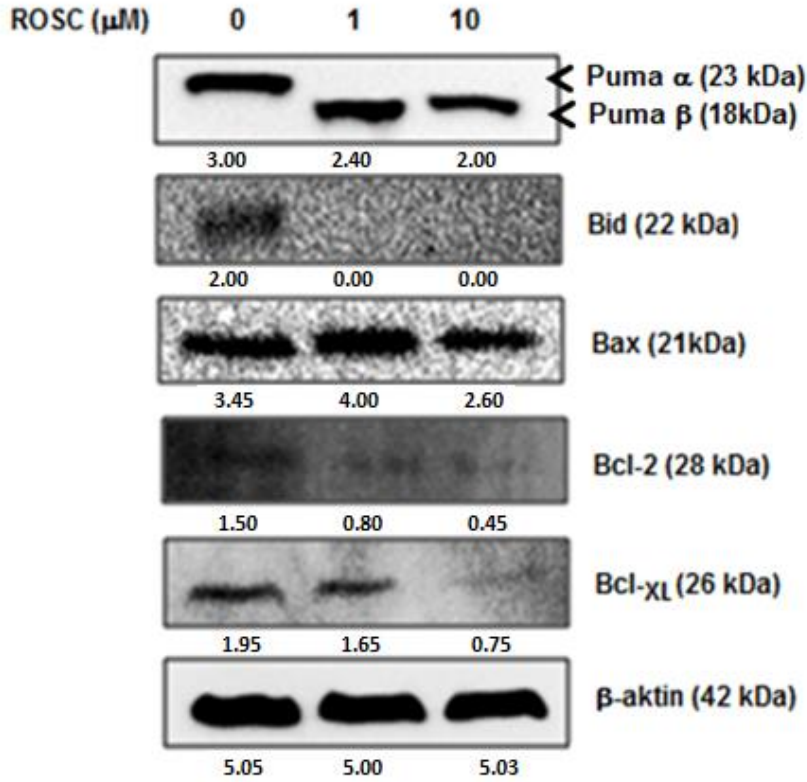
Taupatilerde hücre ölümünü gerçekleşmesi noktasından hareketle ROSC'in SK-N-AS hücrelerinde apoptoza olan etkisi araştırmamızın bundan sonraki odağını oluşturmuştur. Bu amaçla ROSC uygulamasının hücre ölümünü tetikleyip tetiklenmediğini belirlemek için PI (propidyum iyodür) boyaması gerçekleştirilmiştir. PI canlı hücrelerin membranından geçiş yapamayarak yalnızca ölü hücrelerin boyanmasını sağlamaktadır. Ölü hücrelerin membran morfolojisinin değişmesi sonucu içine girerek ölü hücrelerin belirlenmesi sağlanmıştır. 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulanan SK-N-AS hücrelerinde 24 saatte, hücre ölümünde artış olduğu PI boyama ile belirlenmiştir. 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasının 1  $\mu\text{M}$  uygulamasına kıyasla daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 18). Bundan sonraki aşamada hücredeki mitokondriyal apoptotik hücre ölümünü göstermek amacıyla DiOC6 boyama yapılmıştır. Apoptotik hücre ölümünde mitokondri membran potansiyeli bozulmaktadır. Bu nedenle apoptotik ölümü gerçekleştirmiş hücrelerde boya hücrede tutulamaz, yalnızca sağlıklı hücreler yeşile boyanabilmektedir. DiOC6 boyama ile 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasının mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkisi incelendiğinde hücre ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir. 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasının 1  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasına kıyasla daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 18). Daha sonra nükleik asit boyası olan DAPI hücre nükleusunu belirgin hale getirerek DNA kırıklarının görünür hale gelmesini sağlamaktadır. ROSC ile tetiklenmiş apoptotik hücre ölümünün gösterilmesi amacıyla DNA kırıkları gösterilmiştir. SK-N-AS hücrelerinde 24 saat ROSC uygulaması ile oluşan DNA kırıkları DAPI boyama ile belirlenmiştir. SK-N-AS nöroblastoma hücre hattı 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulaması sonucu 24 saatte DNA kırıkları artış gösterdiği görülmüştür. 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasının 1  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasına kıyasla daha fazla DNA kırığı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 18).



**Şekil 18: Roskovitin ile tetiklenen hücre ölümünün SK-N-AS nöroblastoma hücrelerinde fluoresan probalar ile belirlenmesi. 1 ve 10  $\mu\text{M}$  roskovitin SK-N-AS hücrelerine 24 saat boyunca uygulandı. 4nm DiOC6, 5mg/ml propidium iyodür ve 5 mg/ml DAPI ile boyanan hücreler fluoresan mikroskopunda incelendi (x20-x40). Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.**

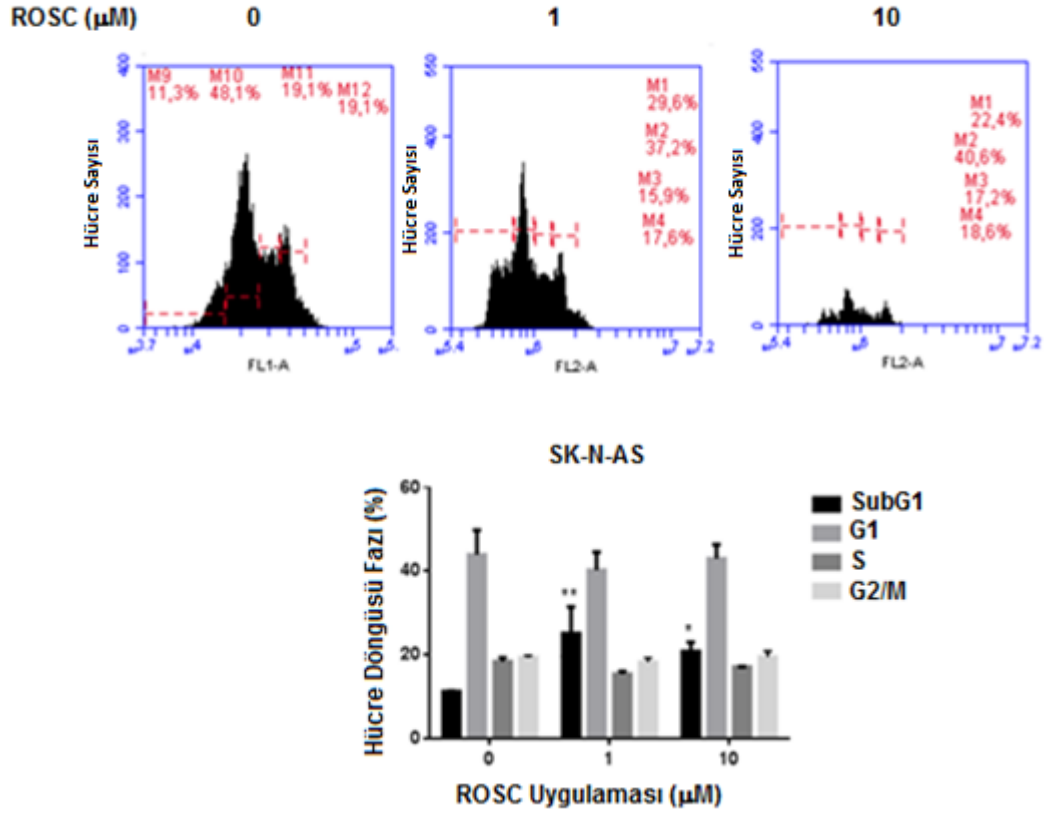
ROSC'in SK-N-AS nöroblastoma hücre hattında apoptotik hücre ölümüne etkisini gösterebilmek amacıyla immunoblotlama tekniği kullanılarak apoptotik proteinlerin anlatım düzeyleri incelenmiştir. Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ROSC uygulaması sonucundaki değişimleri araştırıldı. Apoptotik protein kaspaz-8'in kesilerek aktif hale gelmesinin Bid proteinin kesilimine neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada SK-N-AS nöroblastoma hücre hattında ve ROSC'nin 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda total Bid protein düzeylerinin azalmasına neden olduğu belirlendi (Şekil 19). Ayrıca 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamalarında anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub> proteinlerinin anlatımlarının azaldığı saptandı. Diğer taraftan pro-apoptotik protein Bax 1  $\mu$ M ROSC uygulamasında artış gösterirken, 10  $\mu$ M 'da azalışa neden olduğu belirlenmiştir. Bir diğer Bcl-2 aile üyesi Puma protein ifadesinin 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulaması ile  $\beta$  formunda azalma belirlenmiştir bunu zıt olarak  $\alpha$  formu artış göstermektedir.  $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 19).





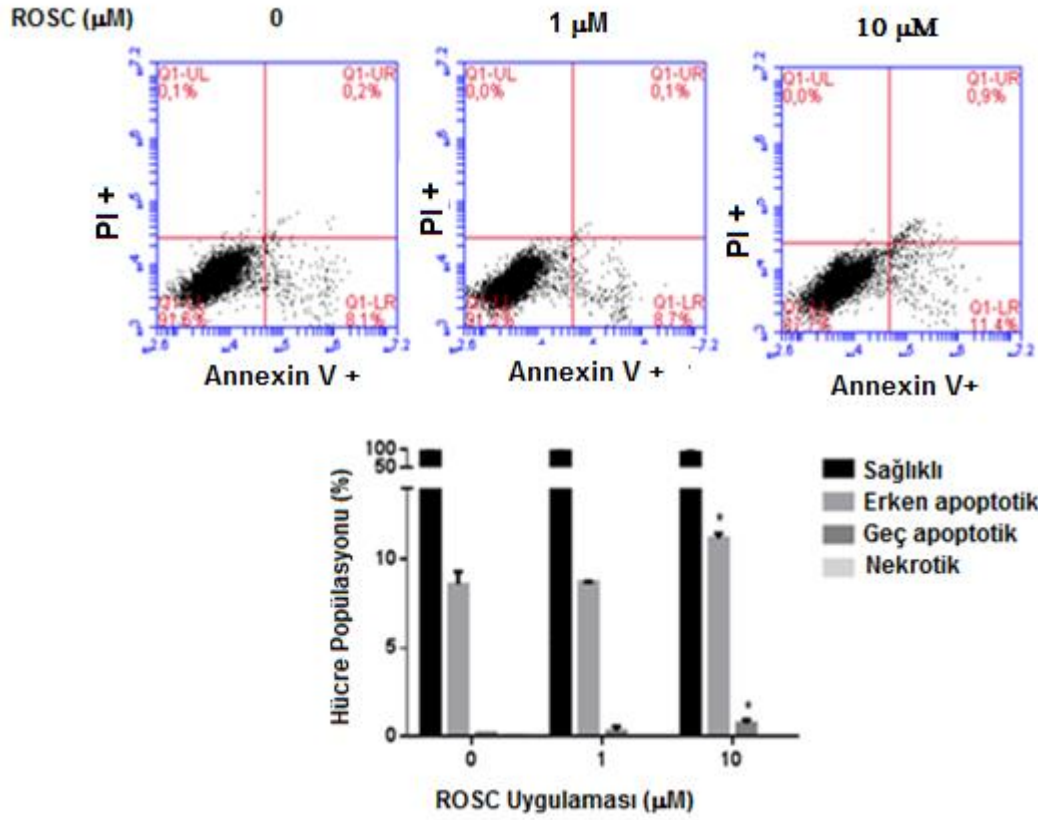
**Şekil 19: Roskovitin'in 24 saat süre ile 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda uygulamalarının pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üzerine etkileri immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunununundan sonra 25  $\mu$ g protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır.**

Şekil 20'de görüldüğü üzere, SK-N-AS hücrelerine 24 saat 1  $\mu$ M ROSC uygulanan hücrelerde % 60, 10  $\mu$ M ROSC uygulanan hücrelerde ise %50 oranlarında artış tespit edilmiştir. Böylelikle SK-N-AS hücre hattında ROSC'nin hücre döngüsüne SubG1 fazında ket vurucu etkisi gösterilmiş olmaktadır. Bu sonuçlar, SK-N-AS hücrelerinde ROSC'nin apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini de onaylar niteliktedir.



**Şekil 20: 24 saat 1 ve 10 μM roskovitin uygulanan SK-N-AS hücrelerinde hücre döngüsü evrelerindeki değişim akım sitometresi analizi ile araştırılması. Hücreler 24 saat boyunca roskovitin ile inkübe edildikten sonra etanol ile fikse edilip, PI boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre sayısı 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. \* p= 0,012; \*\*p=0,0087.**

Apoptotik hücre ölümünün saptanmasındaki bir diğer yöntem ise hücre döngüsündeki subG1 fazındaki hücrelerin PI boyama sonrası akım sitometrisi ile belirlenmesidir. SubG1 fazı, G1 fazından önceki fazda DNA kırıkları bulunan apoptotik hücrelerin gözlemlendiği faz olarak nitelendirilmektedir. Bu doğrultuda, 24 saat ROSC uygulamasını takiben 10 μM ROSC uygulanan SK-N-AS hücrelerinde subG1 fazında artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda 10 μM ROSC uygulanan hücrelerde geç apoptotik artış belirlenmiştir (Şekil 21).



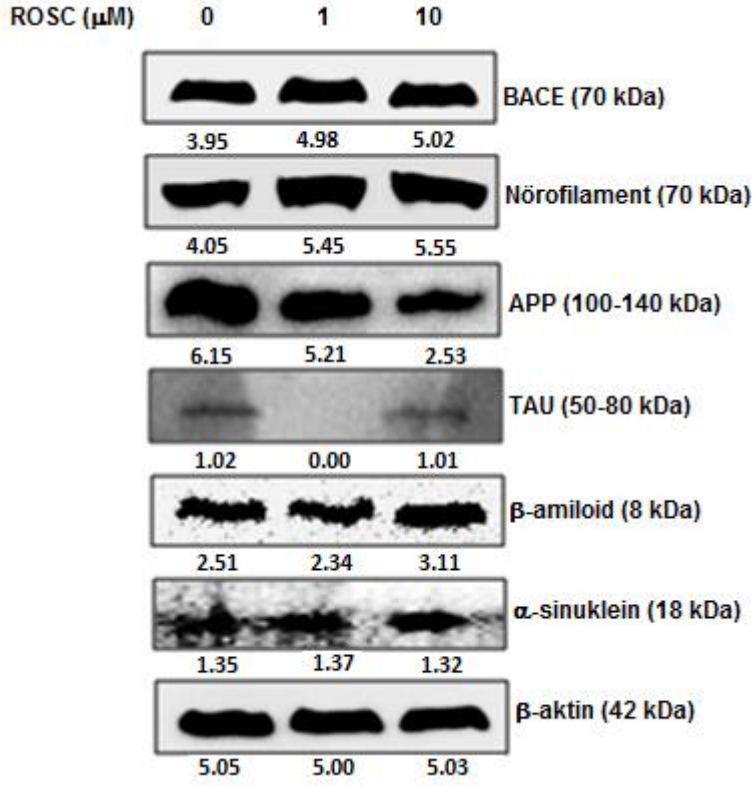
Şekil 21: 24 saat süre ile 1 ve 10  $\mu\text{M}$  Roskovitin uygulanan SK-N-AS hücrelerinde Annexin V-PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi. Hücreler 24 saat boyunca roskovitin ile inkübe edildikten sonra Annexin V ve PI boyaması uygulanmış ve BD Bioscience Accuri C6 programı ile analiz edilmiştir. Erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik popülasyon yüzdeleri 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. \*  $p=0,012$ .

#### 4.3. ROSKOVİTİN ALZHEİMER BELİRTEÇLERİNİ İNHİBE ETMEKTEDİR

AD biyobelirteçleri hastalığın varlığını ya da olma riskini belirlemede kullanılan nörokimyasal belirteçlerdir. Biyobelirteçler AD'nin erken evrede teşhisi ve aynı zamanda hastalığın ilerleme süreçlerini belirleme açısından çok önemlidirler. Erken teşhisin bir an önce yapılması AD'deki nöropatolojik değişiklik semptomlarının görülmesi yılları almaktadır.  $A\beta$ , AD'de çok iyi bir belirteçtir.  $A\beta$ , transmembrane amiloid öncü proteinin proteolitik olarak kırılması ile meydana gelen peptid ailesine mensuptur.  $\beta$ - ve  $\gamma$ -

sekretaz dahil çeşitli enzimatik sindirim APP'yi kırar ve A $\beta$  proteinin farklı tipleri meydana gelir.  $\beta$ -sekretaz aktivitesinin çoğu  $\beta$ -APP kırma enzimi 1 geni (*BACE1*) tarafından kodlanan integral membrane protein aspartil proteazdan kökenlenir (Zetterberg ve Ark., 2008).  $\alpha$ -sinuklein'in AD beyinlerinde 2 kat artış gösterdiği bilinmektedir, dolayısı ile A $\beta$ , Tau, ve  $\alpha$ -sinuklein hep birlikte AD tanısı açısından çok önemli parametrelerdir (Larson ve Ark., 2006).

Bütün bu verilere dayanarak ROSC uygulanan SK-N-AS hücre hattında AD biyobelirteç proteinlerinin anlatımları araştırıldı. Daha önce birçok kez değinildiği üzere Tau proteini AD patogenezinde anahtar bir moleküldür. 1  $\mu$ M ROSC uygulaması sonucunda Tau proteininin ekspresyonunda azalma belirlenirken, 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında Tau protein ifadesinde kontrole oranla bir değişiklik saptanmamıştır. 1  $\mu$ M ROSC uygulaması ile A $\beta$  peptid ifadesi kontrol hücrelerine oranla azalma göstermiştir, fakat 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında protein ifadesinde artış görülmüştür. APP ifadesinde de 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamaları sonucunda kontrol hücrelerine oranla azalma belirlenmiştir. Nörofilament'de 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında kontrol hücrelerine oranla protein ifadesinde artış belirlenmiştir. BACE'de 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında kontrol hücrelerine oranla protein ifadesinde artış belirlenmiştir.  $\alpha$ -sinuklein'de 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında kontrol hücrelerine oranla protein ifadesinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 22).



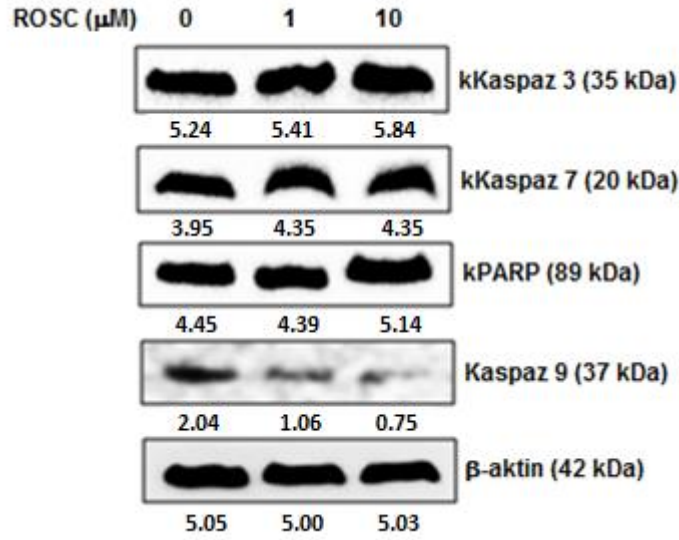
**Şekil 22: 1 ve 10  $\mu\text{M}$  Roskovitin 24 saat süre ile uygulandıktan sonra SK-N-AS hücre hattında Alzheimer ailesi proteinlerinin ifade düzeylerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonununundan sonra 25  $\mu\text{g}$  protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır.**

#### 4.4. ROSKOVİTİN KASPAZA BAĞIMLI APOPTOZU İNHİBE ETMEKTEDİR

Bu aşamada ROSC uygulanan SK-N-AS hücre hattında kaspaz ailesi proteinlerinin anlatımları incelendi. 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulandığında apoptotik mekanizmanın ekstrinsik yolağının aktif hale gelmesi ile kesilmiş kaspaz-7 proteinleri kontrole oranla artış göstermiştir.

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)'ın en önemli işlevi DNA onarımı ve apoptozun göstergelerinden olan DNA kırıklarını saptamaktır. Bu nedenle 1 ve 10  $\mu$ M ROSC'in PARP proteininin kesilimine etkisi araştırıldığında 10  $\mu$ M uygulamasında kontrol ve 1  $\mu$ M uygulamasına oranla daha fazla PARP kesilimi belirlendi (Şekil 23).

Bir diğer apoptoz parametresi olan pro-kaspaz-9 proteini de 1 ve 10  $\mu$ M ROSC muameleleri kontrol hücreleri ile kıyas edildiğinde 10  $\mu$ M ROSC dozunun 1  $\mu$ M ROSC dozuna oranla daha fazla azaldığı görülmektedir.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı (Şekil 23).

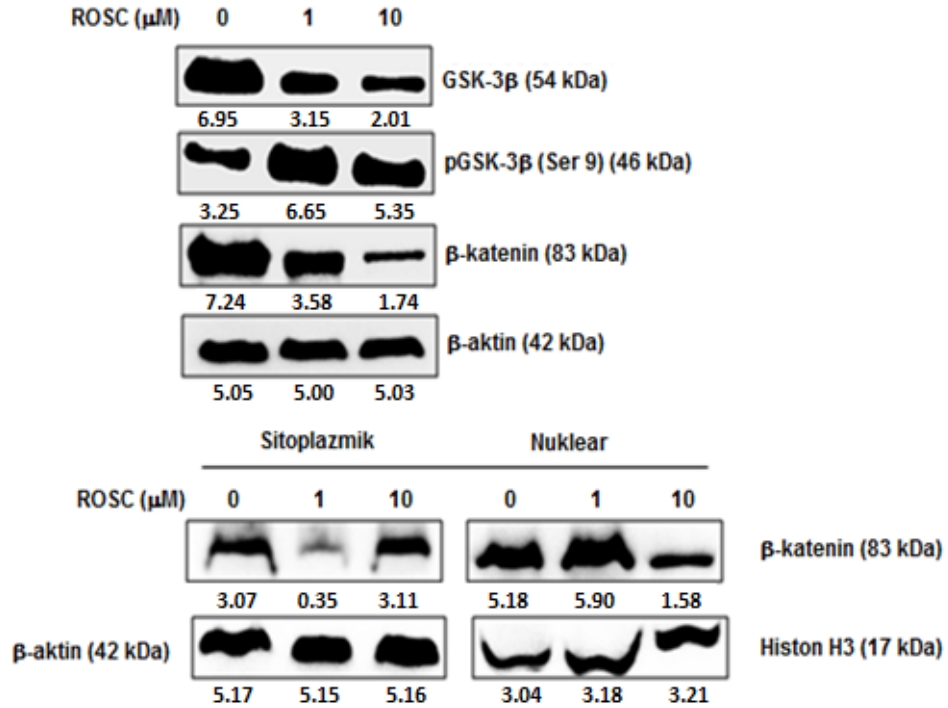


**Şekil 23:** 24 saat süre ile 1 ve 10  $\mu\text{M}$  roskovitin uygulamalarının kaspaz kesilimi üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonununundan sonra 25  $\mu\text{g}$  protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. En az 3 deney tekrarı yapıldı. (k: kesilmiş).

#### 4.5. ROSKOVİTİN PRO-APOPTOTİK ETKİNLİĞE SAHİP OLAN GSK-3 $\beta$ VE SUBSTRATI $\beta$ -KATENİNİ İNHİBE ETMEKTEDİR

Birçok araştırmada GSK-3 $\beta$ 'nin pro-apoptotik etkinliği kanıtlanmıştır, 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulanan hücrelerde GSK-3 $\beta$  protein ifade düzeyinin kontrol hücrelerine oranla azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca GSK-3 $\beta$  substratlarından olan  $\beta$ -katenin 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamaları sonucunda kontrol hücreleri ile kıyaslandığında azaldığı belirlenmiştir. 1 ve 10  $\mu\text{M}$  ROSC uygulamasının pGSK-3 $\beta$  (Ser 9) formunun ise kontrol hücrelerine oranla arttırdığı belirlendi.

Bu verilere ek olarak ayrıca sitoplazmik ve nüklear  $\beta$ -katenin proteinlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Sitoplazmadan izole edilen proteinlerde ROSC'in 1  $\mu$ M uygulanması durumunda  $\beta$ -katenin miktarının azaldığı, nükleusda ise arttığı belirlenmiştir. Sitoplazmadan izole edilen proteinlerde ROSC 10  $\mu$ M uygulandığında  $\beta$ -katenin miktarında değişiklik belirlenmemiştir fakat nükleusda ise kontrol hücrelerine oranla azaldığı saptanmıştır.  $\beta$ -aktin ve Histon H3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 24).

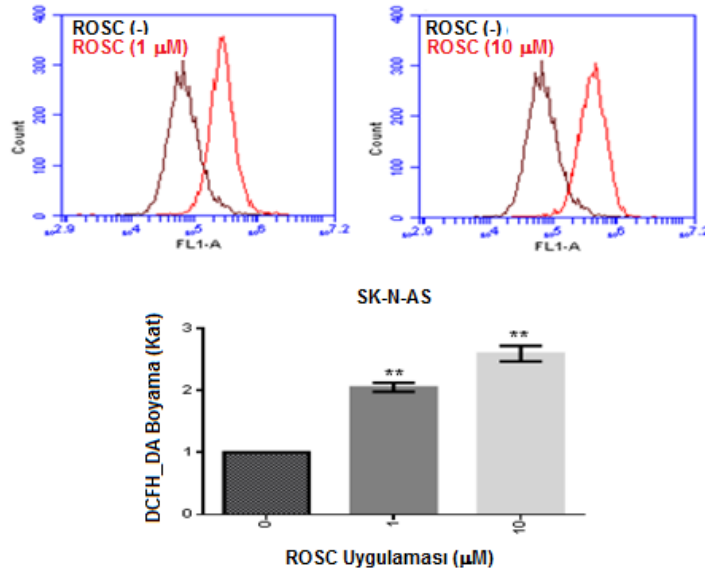


**Şekil 24:** 24 saat süre ile 1 ve 10 mM roskovitin uygulamalarının GSK-3 $\beta$  ve substratlarından olan  $\beta$ -katenin üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunununundan sonra 25  $\mu$ g protein örnekler için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinden sonra ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. Beta aktin ve Histon H3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. En az 3 deney tekrarı yapıldı.



#### 4.6. SK-N-AS NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE NAC, CDK İNHİBİTÖRÜ ROSKOVİTİN'İN HÜCRE CANLILIĞINA YARATTIĞI ETKİYİ GERİ ÇEKMEKTEDİR

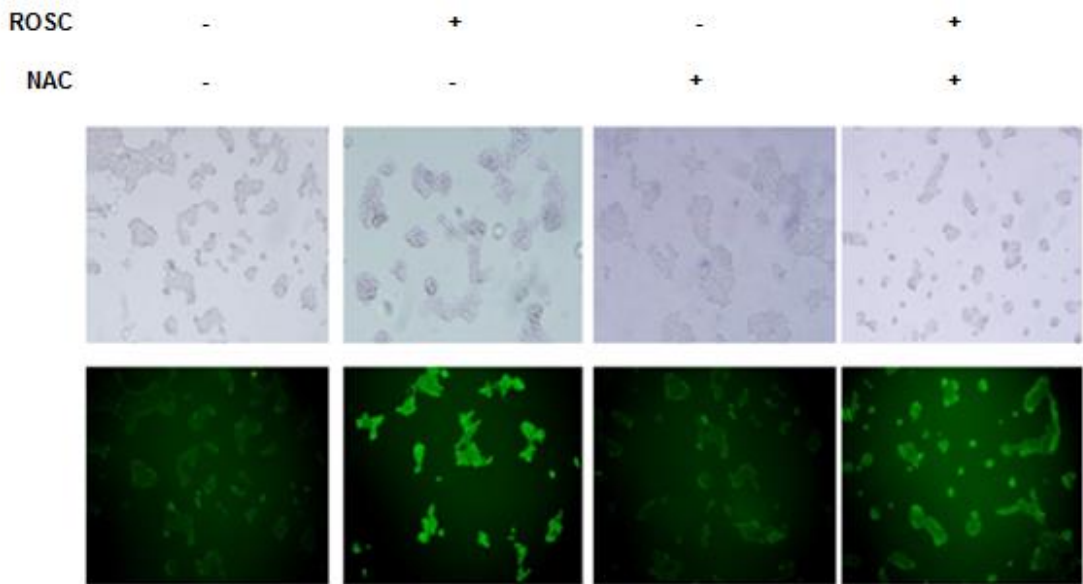
ROS ve mitokondriler hem fizyolojik ve hem de patolojik koşullarda apoptozun uyarılmasında önemli rol oynamaktadır. Mitokondrilerin ROS için hem kaynak ve hem de hedef olması ilginçtir. Mitokondrilerden Sitokrom C serbestlenmesi kaspaz aktivasyonunu tetikler ve bu doğrudan ya da dolaylı olarak ROS aktivitesi ile ilgilidir. Diğer taraftan ROS aynı zamanda anti-apoptotik etkiye de sahiptir. Bu bulgulara dayanarak SK-N-AS hücre hattında ROSC'in apoptoz ve ROS'la olan ilişkisi araştırmanın bundan sonraki amacını oluşturdu.



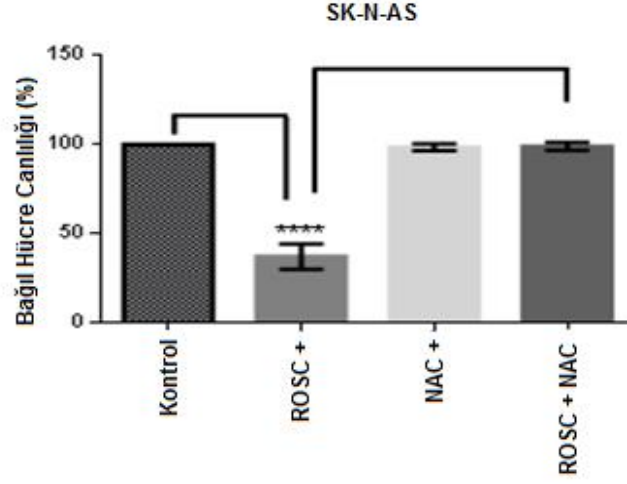
Şekil 25: 1 ve 10 μM roskovitinin 24 saat uygulamasının SK-N-AS hücre hattında ROS oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi. 24 saat boyunca 1 ve 10 μM roskovitin uygulanmış hücreler DCFH<sub>2</sub>-DA boya ile boyandı. 15 dakika inkübasyon sonucunda hücreler akım sitometrisinde analiz edildi. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır. \*\*p=0,0087.

#### 4.7. SK-N-AS HÜCRE HATTINDA ROSKOVİTİN'İN N-ASETİL-SİSTEİN (NAC) İLE EŞ ZAMANLI ETKİSİNİN SAPTANMASI

ROSC uygulaması ile tetiklenen apoptotik süreçte artan ROS oluşumuna etkisi DCFH-DA boyama ile floresan mikroskobu ve fluorometre ile tespit edilmiştir. ROS inhibitörü N-asetil sisteinin (NAC) hücreler üzerindeki etkisini anlamak üzere sağkalım analizi gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskobu ve fluorimetrede 24 saat ROSC uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine oranla ROS artışı olduğu belirlenmiştir. SK-N-AS hücrelerinde ROSC ile tetiklenen ROS'un yıkıcı etkisini önleyen bir ajan olan NAC, ROSC ile eş zamanlı olarak 24 saat boyunca uygulanmış ve ROSC'in tetiklediği yıkıcı etkiyi ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 26-Şekil 27).

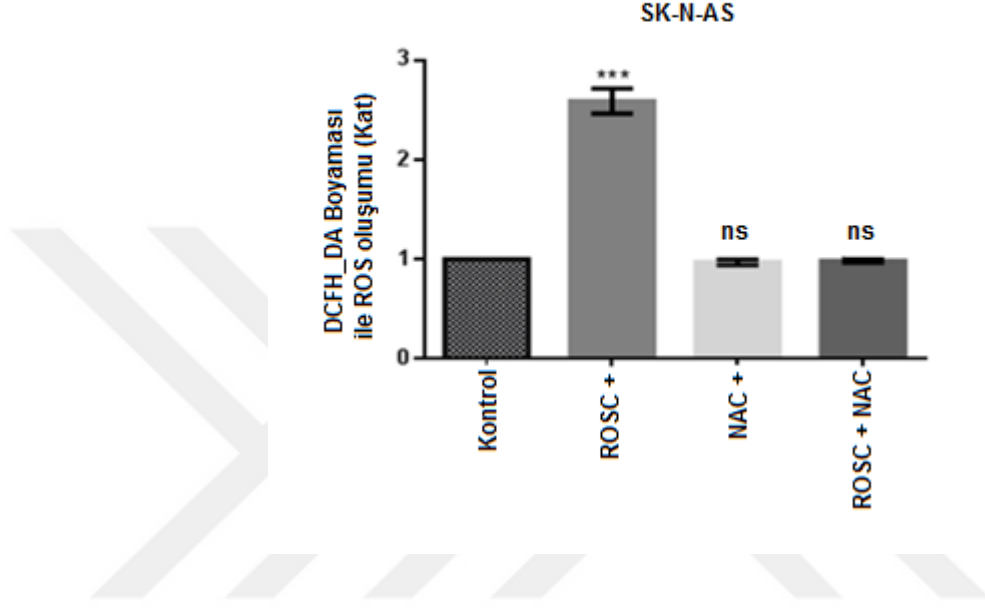


Şekil 26: SK-N-AS hücrelerine 10  $\mu$ M roskovitin ve 5 mM NAC uygulandı ve 24 saat boyunca inkübe edildi. Roskovitin 10  $\mu$ M uygulanan hücrelerde tetiklenen apoptotik süreçte artan  $H_2O_2$  miktarının ROS oluşumuna etkisi DCFH-DA 100'nM boyama ile floresan mikroskobunda belirlenmesi. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır (20x).



**Şekil 27: SK-N-AS hücrelerinde NAC'ın roskovitin ile kombine edilip bağıl hücre canlılığının incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca 10  $\mu$ M roskovitin ve 5 mM NAC ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen değerler 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. \*\*\*\* p<0,0001.**

Bu bulgulara ilave olarak DCFH-DA boyaması ile ROSC ve NAC kombinasyonunun sadece ROSC uygulaması ile artan ROS miktarını geri çektiği de kanıtlanmıştır (Şekil 28).



**Şekil 28:** NAC'ın 10  $\mu$ M roskovitin uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde roskovitin toksik etkisinin geri döndürmesinin belirlenmesi. SK-N-AS hücreleri 24 saat boyunca 10  $\mu$ M roskovitin ve 5 mM NAC uygulaması sonucunda DCFH-DA ajanı ile boyanmış, 15 dakika inkübasyon sonucunda örnekler akım sitometresinde incelenmesi. En az 3 deney tekrarı yapılmıştır \*\*\* p=0,0003, ns: non-spesifik.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

AD toplumda sıklıkla rastlanan bir hastalık olup, nörolojik vakalarının %50-70'ini kapsamaktadır. Hastalığın erken başlangıçlı formları otozomal dominant genetik geçiş özelliğine sahip olup olguların ancak % 3-5'ini oluşturmaktadır. Kesin tanı, progresif hastalık bulguları olan vakalarda biyopsi ya da otopsi ile AD'ye özgü patolojik bulguların saptanması ile konulabilir. Bu patolojik bulgular, nörofibriller yumaklar, nörotik plaklar, sinaps kaybı, nöron kaybı, granülovakuolar dejenerasyon ve Meynertin bazal nukleus'unda kolinerjik hücre kaybı ve arterosklerotik değişikliklerdir. Yaşlı popülasyonun artış gösterdiği toplumlarda hastalık önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Hastalığın görülme oranı 60 yaşından sonra her beş senede bir iki katına çıktığı belirlenmiştir (Maurer ve Ark., 1997).

CDK inhibitörü ROSC güçlü bir apoptotik ajan olup, CDK'ların siklinler ile etkileşimlerini yarışıl bir etki göstererek ve hücre siklusunda durmaya neden olarak hücre ölümünü tetiklemektedir (Monaco ve Ark., 2004). Kanser hücrelerindeki metabolik farklılıklardan dolayı ROSC'nin her kanser hücresinde etkisi aynı değildir. Son çalışmalar, GSK-3 $\beta$  inhibisyonunun kanser tedavisinde potansiyel rolü olduğunu düşündürmektedir. GSK-3 $\beta$  inhibisyonunun özellikle nöroblastoma hücrelerinde apoptozu indüklediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Dickey ve Ark., 2011). Lityum uygulaması ile gerçekleştirilen GSK-3 $\beta$  inhibisyonunun hücre döngüsüne ket vurduğu gösterilmiştir (Pizarro ve Ark., 2009). Lityumun aynı zamanda *in vivoda* da gecikmiş tümör büyümesine neden olduğu gösterilmiştir (Dickey ve Ark., 2011). Bu noktadan yola çıkarak laboratuvarımızda çeşitli kanser hücrelerinde ROSC'nin GSK-3 $\beta$  sinyal yolağına olan etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular HCT 116 kolon kanseri

hücre hattında ROSC'in GSK-3 $\beta$ 'yı Ser9 domaninden 72 saatte fosforlayarak  $\beta$ -katenin'in nuklear göçüne engel olduğunu ortaya koymuştur. 24 ve 48 saat ROSC uygulaması ise Ser 9 fosforlanmasını indirgemıştır (Yayınlanmamış veri). Bu çalışmada nöroblastoma hücre hattı olan SK-N-AS'da ROSC uygulaması sonrası apoptotik parametreler, GSK-3 $\beta$ 'nın bu süreçteki rolü ve son olarak AD hastalığı biyobelirteçlerinin değişimleri incelenmiştir. Çalışmamızda ROSC uygulamasının hücre canlılığında azalmaya ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. ROSC in 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarının hücre canlılığını sırasıyla % 20 ve 50 oranında azaltmıştır. Bu sonuçlara bakılarak SK-N-AS hücrelerinin CDK inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu ortaya konulmaktadır. Kanser hücrelerine uygulanan terapötik ajanlara oluşturulan cevap, kanser hücrelerinin farklı genomik özelliklerinden dolayı farklılık göstermektedir. Hücrelerin sağkalım mekanizması stresin türüne ve uygulandığı süreye göre değişiklik göstermektedir. Hücrelerde aminoasitler gibi besin kıtlığı, büyüme faktörlerinin yokluğu veya stres faktörleri ökaryotik hücrelerin strese girmesine ve hızla durumun düzeltilmesine yönelik bir çok sinyalin oluşturulmasına sebep olmaktadır (Ikenoue ve Ark., 2009). Hücre sağ kalımının belirlenmesinde 0-24-48-72 saat zaman dilimlerinde ROSC 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda uygulandı. 10  $\mu$ M ROSC uygulaması ile hücre çoğalmasını indirgerken çoğalmaya ket vurmamıştır. Ayrıca SK-N-AS hücrelerinde ROSC uygulamasının koloni oluşumuna etkisi araştırıldı ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamasının koloni oluşumunu azalttığı bulundu. Buna ilaveten Soft agar içerisinde koloni çapları incelendiğinde 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulaması ile koloni çaplarında kayda değer azalma bulundu bütün bu veriler ROSC'nin hücre ölümünü teşvik ettiğini göstermektedir. ROSC literatürde bir çok araştırmada canlılığa ve koloni oluşumuna ket vurucu bir ajan olarak belirlenmiştir Laboratuvarımızda yapılan farklı kanser hücrelerindeki araştırmalarda da aynı yönde veriler elde edilmiştir.

Araştırmanın bundan sonraki aşamasında ROSC ile tetiklenen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik belirteçler araştırıldı. Öncelikle hücreler ışık

mikroskobunda incelenmiş membran yapısındaki bozulmalar tespit edilmiştir. Bunu takiben SK-N-AS hücrelerine ROSC uygulanarak mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim floresan ve fluorometrik ölçümler ile incelenmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, genellikle mitokondri zarları arasında bulunan ve elektron transport zinciri üyesi olan Sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkışını tetiklemektedir. Sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkışı mitokondriyal yolağın aktive olduğunun en önemli işareti olarak gösterilmektedir. Böylece SK-N-AS hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelinde oluşan kaybın mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu tetiklediği saptanmış olmaktadır. SK-N-AS hücrelerinde elde edilen bu bulgular ROSC'nin kanser hücrelerinde olan etkisi ile uyumlu olarak bulunmaktadır.

Mitokondriyal membran potansiyeli kaybı ile mitokondri içerisinde bulunan Sitokrom C'nin sitoplazmaya çıkışı kaspazların aktivasyonu anlamına gelmektedir (Kulikov ve Ark., 2012). Bu nedenle mitokondriyal yolak aracılı apoptozdaki PARP ve kKaspase-3 ifade düzeyleri araştırıldı. 1 ve 10  $\mu$ M ROSC dozunda bu proteinlerin ifadesinde artış belirlendi. Pro-Kaspas-9 uygulaması ile ROSC 1 ve 10  $\mu$ M dozlarında sırasıyla kesilimin giderek azaldığı belirlenmiştir. kKaspaz-7 uygulaması ile 1 ve 10  $\mu$ M dozlarında kesilimin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumda ROSC etkisinde kesilmiş kaspazların artması ve kaspazların azalması hücre ölümünün apoptotik olduğunu ortaya koymaktadır.

Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Iizuka ve Ark., 2008). Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ROSC uygulaması sonucundaki değişimleri incelenerek hangi apoptotik yolağın aktif olduğu belirlenmeye çalışıldı. Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik olan Bid proteinin ifadesindeki azalma kesildiğine işaretler. Bir diğer pro-apoptotik protein olan Pumanın,  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki formu bulunmaktadır, bunlar benzer faaliyetler göstermektedirler, Sitokrom C salınımında ve apoptozun aktive olmasında rol oynamaktadırlar. Puma protein

ifadesinin 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulaması ile  $\beta$  formunda azalma belirlenmiştir bunu zıt olarak  $\alpha$  formu artış göstermektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesinden olan Bax'ın protein ifadesinde 10  $\mu$ M ROSC uygulaması durumunda azalma görülürken, 1  $\mu$ M ROSC uygulanan protein ifadesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesinden olan Bcl-2 ve Bcl-XL protein ifadelerinin 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamaları ile kayda değer bir şekilde azalmasıyla apoptozu tetiklediği kanıtlanmış olmaktadır. Bcl-2 ve Bcl-XL çoğu nöroblastoma hücre hatlarında ve primer tümörlerde aşırı ifade edilmektedir. Ayrıca bu proteinlerin yüksek düzeyleri tümörün ilaca direncinde önemli rol oynamaktadır (Shalini ve Ark., 2015). *In vivo* kanser çalışmalarda Bcl-2 gen ekspresyonunun arttığı ortaya konmuştur (Zinkel ve Ark., 2006), aynı zamanda Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun apoptozu engelleyerek hücrelerin yaşam sürecini arttırdığı da gösterilmiştir (Reed ve Ark., 1991).

Bir diğer CDK inhibitörü Flavipiridolün nöroprotektif olduğu Hilton ve Arkadaşları (2008) tarafından gösterilmiştir. Özellikle ROSC nin travmatik beyin hasarlarında nöronal ölümü azalttığı ve nöronlardaki aktive olan hücre devrini inhibe ettiği belirlenmiştir (Hilton ve Ark., 2008).

Alzheimer patolojisi beyne sınırlı olduğundan beyin omurilik sıvısı önemli bir biyolojik belirteç kaynağıdır. Nöronal dejenerasyon, plaklarda A $\beta$  peptid depolanması ve yumak formasyonları Alzheimer'ın biyokimyasal belirteçleridir. Bu patojenetik sürecin olası beyin omurilik belirteçleri ise A $\beta$  proteinin 42 amino asit formu (A131-42) ile total ve fosforile Tau protein düzeyleridir (Blennow ve Hampel 2003). Bu çalışmada SK-N-AS hücre hatlarında 1  $\mu$ M ROSC uygulaması Tau proteininin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu belirlenirken, 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında Tau protein ifadesinde kontrole oranla bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1  $\mu$ M ROSC uygulaması ile A $\beta$  peptidinde azalma belirlenirken, 10  $\mu$ M ROSC uygulamasında protein ifadesinde artış saptandı. Bir diğer AD biyobelirteci APP protein ifade düzeyi incelendiğinde 1 ve 10  $\mu$ M ROSC



uygulamaları sonucunda kontrol hücrelerine oranla azalmaya sebep olduğu saptandı. Buna karşın, 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamaları ile kontrol hücrelerine oranla nörofilament protein ifadesinde artış belirlenmiştir. Diğer Alzheimer biyobelirteçleri BACE ve  $\alpha$ -sinukleine 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulandığında BACE protein ifadelerinde artış olduğu bulunurken,  $\alpha$ -sinukleine ifadesinde değişiklik olmadığı belirlendi. Özetle Alzheimer'ın biyokimyasal belirteçlerinden olan A $\beta$  ve Tau' nun 1  $\mu$ M ROSC uygulaması sonucu protein ifadelerindeki azalışa neden olarak apoptozu tetiklemektedir. Böylelikle anti- ve pro-apoptotik biyobelirteçlerin yanında Alzheimer biyobelirteçleri ile de ROSC'nin apoptoz üzerindeki teşvik edici etkisi onaylanmış olmaktadır.

GSK-3 $\beta$  hücreyel çoğalma, göç, iltihap ve bağışıklık gibi olaylarda pro-inflamatuar sitokin ve interlökin üretimi de dahil olmak üzere çeşitli protein kinazlar aracılığıyla adaptif değişiklikler, hücre çoğalması, ve hücre içi sinyal yollarını etkileyerek glukoz regülasyonu ve apoptoz başta olmak üzere hem periferde hem de santral sinir sisteminde etkilidir (Manceur ve Ark., 2011). GSK-3 aktivitesindeki artışın çok sayıda hastalığın etiyopatogenezinde rol aldığı gösterildiğinden beri GSK-3 inhibe edilerek yeni terapötik yaklaşımları üzerinde çalışılmaktadır (Meijer ve Ark., 2004). Özellikle merkezi sinir sisteminde GSK-3 aktivitesinin, A $\beta$  ve nörofibriler yumakların oluşumu, Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu, kognitif fonksiyonların düzenlenmesi, nöronal polarizasyon ve aksonal büyüme ve hücre içi sinyalizasyon dolayısıyla nöroadaptif değişiklikler, sinaptik plastisite, çeşitli nörogelişimsel bozukluklar, Alzheimer, depresyon, bipolar bozukluk ve şizofreni de dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın patogenezinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Jope ve Roh 2006). Bu çalışmada 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulanan hücrelerde GSK-3 $\beta$  etkinliğinin kontrol hücrelerine oranla kayda değer bir şekilde azaldığı buna karşın pGSK-3 $\beta$ 'nin arttığı belirlendi. Ayrıca GSK-3 $\beta$  substratlarından olan  $\beta$ -kateninin 1 ve 10  $\mu$ M ROSC uygulamaları sonucunda kontrol hücrelerine oranla azaldığı saptandı. Bu bulgulara ek olarak  $\beta$ -katenin proteininin ifade düzeyi sitoplazma ve nuklear fraksiyonlarda ayrı ayrı

araştırılmış ve sitoplazmadan izole edilen proteinlerde 1  $\mu$ M ROSC uygulaması sonucu  $\beta$ -katenin miktarının azaldığı, nüklear fraksiyonda ise  $\beta$ -katenin miktarının arttığı belirlenmiştir. 10  $\mu$ M ROSC uygulaması sonucu sitoplazmadan izole edilen proteinlerde  $\beta$ -katenin miktarında değişiklik olmamıştır fakat nuklear fraksiyonda kontrol hücrelerine oranla azalma belirlenmiştir. Sonuç olarak ROSC in, GSK-3 $\beta$  ve  $\beta$ -katenini inhibe ederek apoptozu teşvik ettiği anlaşılmaktadır. GSK-3 $\beta$ 'nın kanser hücre tipine bağımlı olarak hem tümör teşvik edici hem de tümör engelleyici bir rolü olduğu bilinmektedir (Garcia-Gorostiaga ve Ark., 2009). Neuro-2A nöroblastoma hücrelerinde GSK-3 $\beta$  inhibisyonunun apoptozun indüklenmesi ve hücre döngüsü durdurulmasıyla hücre canlılığında azalma belirlenmiştir (Dickey ve Ark., 2011). Petit-Paitel ve arkadaşlarının çalışmasında fare nöron hücrelerinde GSK3 $\beta$  aktivitesinin inhibisyonunun mitokondriyal membran potansiyeli değişiklikleri ve sonrasında kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunun engellenmesiyle hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (Petit-Paitel ve Ark., 2009).

GSK-3 $\beta$  yüksek düzeyde beyinde eksprese edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar GSK-3 $\beta$ 'nin beyin önemli işlevlerine dahil olduğunu ve Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörolojik hastalıklar ve başka nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Grimes ve Jope 2001). Literatürde epilepsi ve bipolar bozuklukların tedavisinde kullanılan valproatın *in vivo*'da GSK3 enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bir başka GSK-3 $\beta$  inhibitörü olan himenialdizinin Alzheimer hastalığında GSK-3 $\beta$  tarafından hiperfosforlanan bölgelerde mikrotübül bağlanma proteini olan Tau'nun *in vivo*'da fosforlanma durumu engellemektedir. Alsterpaulon, başka bir GSK-3 $\beta$  inhibitörü *in vivo*'da GSK3' e bağlanmak için ATP ile rekabet ederek, Alzheimer hastalığında GSK3 tarafından fosforillenen bölgelerde Tau'nun fosforlanmasını engellemektedir (Martinez ve Ark., 2002).

Alzheimer hastalığında nöronal apoptozun da önemli bir rol oynadığı ve kaspazların bu patolojik sürece dahil olduğu literatürde gösterilmiştir (Rohn 2010).

Kültüre edilmiş hipokampal nöronlarının A $\beta$  peptidlerine maruz kalması kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanmıştır (Gervais ve Ark., 1999). A $\beta$ , APP'nin ardışık parçalanmasından oluşmaktadır ve kaspaz-3 APP kesilimine dahil olan baskın kaspaz olarak bilinmektedir (Shang ve Ark., 2012). Tau proteini de kaspaz-3 için bir substrat olarak bilinmektedir ve C-ucunda Tau'nun kesilimi, Tau hiperfosforlanmasını ve nörofibril birikimini teşvik etmektedir (Noble ve Ark., 2009). Ayrıca, A $\beta$  kaynaklı kaspaz-3 aktivasyonu Alzheimer modellerinde Tau proteininin anormal işlemine neden olmaktadır (Banwait ve Ark., 2008). APP aynı zamanda *in vivo*' da kaspaz-6 tarafından da kesilebilmekte ve APP fragmentinin N- ucu, kaspaz-6 bağımlı aksonal dejenerasyonu tetikleyen ölüm reseptörünün aktivasyonu için bir ligand olarak bilinmektedir (Nikolaev ve Ark., 2009). Daha önce yapılan çalışmalarda, üçlü transgenik AD fare modelinde anti-apoptotik Bcl-2 geninin kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunu engellemesiyle içsel apoptotik yolağın bloke edilmesinin potansiyel faydası gösterilmiştir; bu koşullarda Tau'nun kaspaz kesilimi seviyesi sınırlıdır ve plakların ve düğümlerin oluşumu inhibe edilmiştir, hafızanın korunması geliştirilmiştir (Corona ve Ark., 2011).

CDK inhibitörlerinin SSAT ve PAO'yu indükleyerek ROS oluşumunu uyardıkları bilinmektedir (Arısan ve Ark., 2012; Çoker ve Ark., 2012). ROSC ile tetiklenen apoptotik süreçte artan ROS oluşumuna etkisi DCFH-DA boyama ile floresan mikroskobu ve fluorometre ile tespit edilmiştir. ROSC uygulanan hücrelerde ROS artışına sebep olduğu belirlenmiştir. ROSC ile tetiklenen ROS'un yıkıcı etkisini önleyen bir ajan olan NAC (Monaco ve Ark., 2004) SK-N-AS hücrelerinde ROSC ile eş zamanlı olarak 24 saat boyunca uygulanmış ve ROSC'in tetiklediği yıkıcı etkiyi ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu araştırma kapsamında elde edilen bulgulara göre, nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS' da ROSC apoptotik mekanizmayı tetiklediği açıkça ortaya konmuştur. Bu durumda ROS nin taupatik değil de apoptotik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu araştırmaların *in vivo* düzeyde ele alınması gerekliliği de

söz konusudur. Özellikle İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Model Organizmalar Laboratuvarında halen yürütülmekte olan *C. elegans*'da taupati araştırmalarında ROSC uygulamalarının yapılması planlanmaktadır. Özellikle ROSC'in CDK5 ve GSK-3 $\beta$  ilişkili sinyal yolakları ile ilişkili olarak daha detaylı araştırmalar yapmayı hedeflemekteyiz.

Son yıllarda AD araştırmaları, bu hastalığın çoklu faktörlere bağlı olarak patolojik olaylarla oluştuğunun belirlenmesi ile giderek önem kazanmaktadır. A $\beta$  toksisitesinin Tau patolojisini artırdığı saptanmıştır. Ayrıca GSK-3 $\beta$ 'nın kendisinin A $\beta$  üretimini artırdığı da bilinmektedir. CDK5 A $\beta$  toksisitesini inhibe etmektedir ve GSK-3 $\beta$ 'da CDK5 tarafından aktive edilmektedir. Ayrıca kinazlar aracılı ile meydana gelen enflamasyonla ilgili beyin olaylarında A $\beta$  proteininin aracı olduğu da belirlenmiştir (Tell ve Hilgeroth 2013). AD terapisinde kombine ilaç terapilerinin önemi ortaya konmuştur. Protein kinazlar hastalığı etkileyen hedef yapılarıdır. Tau fosforilasyonu ile Tau patolojisinde protein kinazlar asal işleve sahiptirler. AD'ye uygun protein kinaz inhibitörlerin geliştirilmesine ağırlık verilmektedir. Özellikle mikromolar inhibitörler klinik açıdan çok önem kazanmıştır. Bu nedenlerle çok hedefli ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Ackmann, M., H. Wiech ve E. Mandelkow (2000). "Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation." Journal of Biological Chemistry 275(39): 30335-30343.

Andreadis, A. (2006). Misregulation of tau alternative splicing in neurodegeneration and dementia. Alternative Splicing and Disease, Springer: 89-107.

Arima, K. (2006). "Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: Immuno-electron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies." Neuropathology 26(5): 475-483.

Arısan, E. D., A. Çoker ve N. Palavan-Ünsal (2012). "Polyamine depletion enhances the roscovitine-induced apoptosis through the activation of mitochondria in HCT116 colon carcinoma cells." Amino Acids 42(2-3): 655-665.

Banwait, S., V. Galvan, J. Zhang, O. F. Gorostiza, M. Ataie, W. Huang, D. Crippen, E. H. Koo ve D. E. Bredesen (2008). "C-terminal cleavage of the amyloid-beta protein precursor at Asp664: a switch associated with Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis 13(1): 1-16.

Barghorn, S., P. Davies ve E. Mandelkow (2004). "Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on  $\beta$ -structure in the core domain." Biochemistry 43(6): 1694-1703.

Barghorn, S., Q. Zheng-Fischhöfer, M. Ackmann, J. Biernat, M. Von Bergen, E.-M. Mandelkow ve E. Mandelkow (2000). "Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias." Biochemistry 39(38): 11714-11721.

Behl, C. (2000). "Apoptosis and Alzheimer's disease." Journal of neural transmission 107(11): 1325-1344.

Biernat, J. ve E.-M. Mandelkow (1999). "The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains." Molecular biology of the cell 10(3): 727-740.

Biernat, J., Y.-Z. Wu, T. Timm, Q. Zheng-Fischhöfer, E. Mandelkow, L. Meijer ve E.-M. Mandelkow (2002). "Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity." Molecular biology of the cell 13(11): 4013-4028.

Bijur, G. N., P. De Sarno ve R. S. Jope (2000). "Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Facilitates Staurosporine-and Heat Shock-induced Apoptosis PROTECTION BY LITHIUM." Journal of Biological Chemistry 275(11): 7583-7590.

Blennow, K. ve H. Hampel (2003). "CSF markers for incipient Alzheimer's disease." The Lancet Neurology 2(10): 605-613.

Brandt, R., M. Hundelt ve N. Shahani (2005). "Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1739(2): 331-354.

Carmichael, J., K. L. Sugars, Y. P. Bao ve D. C. Rubinsztein (2002). "Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation." Journal of Biological Chemistry 277(37): 33791-33798.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. and Green, D.R.(2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis .*Science* 303:1010-1014.

Chirita, C. N., E. E. Congdon, H. Yin ve J. Kuret (2005). "Triggers of full-length tau aggregation: a role for partially folded intermediates." Biochemistry 44(15): 5862-5872.

Cleveland, D. W., S.-Y. Hwo ve M. W. Kirschner (1977). "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly." Journal of molecular biology 116(2): 227-247.

Cohen, P. ve M. Goedert (2004). "GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential." Nature reviews Drug discovery 3(6): 479-487.

Corona, C., A. Pensalfini, V. Frazzini ve S. L. Sensi (2011). "New therapeutic targets in Alzheimer's disease: brain deregulation of calcium and zinc." Cell Death Dis 2: e176.

Couchie, D., C. Mavilia, I. S. Georgieff, R. Liem, M. L. Shelanski ve J. Nunez (1992). "Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system." Proceedings of the National Academy of Sciences 89(10): 4378-4381.

Cruz, J. C., H.-C. Tseng, J. A. Goldman, H. Shih ve L.-H. Tsai (2003). "Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles." Neuron 40(3): 471-483.

Culbert, A. A., M. J. Brown, S. Frame, T. Hagen, D. A. Cross, B. Bax ve A. D. Reith (2001). "GSK-3 inhibition by adenoviral FRAT1 overexpression is neuroprotective and induces Tau dephosphorylation and  $\beta$ -catenin stabilisation without elevation of glycogen synthase activity." FEBS letters 507(3): 288-294.

Çoker, A., E. D. Arisan ve N. Palavan-Ünsal (2012). "Silencing of the polyamine catabolic key enzyme SSAT prevents CDK inhibitor-induced apoptosis in Caco-2 colon cancer cells." Molecular medicine reports 5(4): 1037-1042.

Datta, S. R., A. Brunet ve M. E. Greenberg (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes & development 13(22): 2905-2927.

Dickey, A., S. Schleicher, K. Leahy, R. Hu, D. Hallahan ve D. K. Thotala (2011). "GSK-3 $\beta$  inhibition promotes cell death, apoptosis, and in vivo tumor growth delay in neuroblastoma Neuro-2A cell line." J Neurooncol 104(1): 145-153.

Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel ve C. J. Sherr (1998). "Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes & development 12(22): 3499-3511.

Doble, B. W. ve J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." Journal of cell science 116(7): 1175-1186.

Dolečková, I., M. Česnek, M. Dračinský, J. Brynda, J. Voller, Z. Janeba ve V. Kryštof (2013). "Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine." European journal of medicinal chemistry 62: 443-452.

Doll, T., M. Meichsner, B. Riederer, P. Honegger ve A. Matus (1993). "An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif." Journal of Cell Science 106(2): 633-639.

Eldar-Finkelman, H., R. Seger, J. R. Vandenhede ve E. G. Krebs (1995). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells." Journal of Biological Chemistry 270(3): 987-990.

Eom, T.-Y., K. A. Roth ve R. S. Jope (2007). "Neural precursor cells are protected from apoptosis induced by trophic factor withdrawal or genotoxic stress by inhibitors of glycogen synthase kinase 3." Journal of Biological Chemistry 282(31): 22856-22864.

Favaloro, B., N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio ve V. De Laurenzi (2012). "Role of apoptosis in disease." Aging (Albany NY) 4(5): 330-349.

Fellous, A., J. Francon, A. M. LENNON ve J. Nunez (1977). "Microtubule assembly in vitro." European Journal of Biochemistry 78(1): 167-174.

Formichi, P., C. Battisti, E. Radi ve A. Federico (2006). "Cerebrospinal fluid tau, Ass, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease." Journal of cellular physiology 208(1): 39-46.

Frame, S. ve P. Cohen (2001). "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." Biochemical Journal 359(1): 1-16.

Friedhoff, P., A. Schneider, E.-M. Mandelkow ve E. Mandelkow (1998). "Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution." Biochemistry 37(28): 10223-10230.

Garcia-Gorostiaga, I., P. Sanchez-Juan, I. Mateo, E. Rodriguez-Rodriguez, C. Sanchez-Quintana, S. C. del Olmo, J. L. Vazquez-Higuera, J. Berciano, O. Combarros ve J.



Infante (2009). "Glycogen synthase kinase-3 beta and tau genes interact in Parkinson's and Alzheimer's diseases." Ann Neurol 65(6): 759-761; author reply 761-752.

Gervais, F. G., D. Xu, G. S. Robertson, J. P. Vaillancourt, Y. Zhu, J. Huang, A. LeBlanc, D. Smith, M. Rigby, M. S. Shearman, E. E. Clarke, H. Zheng, L. H. Van Der Ploeg, S. C. Ruffolo, N. A. Thornberry, S. Xanthoudakis, R. J. Zamboni, S. Roy ve D. W. Nicholson (1999). "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation." Cell 97(3): 395-406.

Giannakakou, P., M. Nakano, K. C. Nicolaou, A. O'Brate, J. Yu, M. V. Blagosklonny, U. F. Greber ve T. Fojo (2002). "Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics." Proceedings of the National Academy of Sciences 99(16): 10855-10860.

Giannetti, A., G. Lindwall, M.-F. Chau, M. Radeke, S. Feinstein ve L. Kohlstaedt (2000). "Fibers of tau fragments, but not full length tau, exhibit a cross [beta]-structure: Implications for the formation of paired helical filaments." Protein Science 9(12): 2427-2435.

Giles, R. H., J. H. van Es ve H. Clevers (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 1653(1): 1-24.

Goedert, M., B. Ghetti ve M. G. Spillantini (2012). "Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease." Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2(2): a006254.

Goedert, M., M. Spillantini, M. Potier, J. Ulrich ve R. Crowther (1989). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain." The EMBO journal 8(2): 393.

Grimes, C. A. ve R. S. Jope (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." Prog Neurobiol 65(4): 391-426.

Grimes, C. A. ve R. S. Jope (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling." Progress in neurobiology 65(4): 391-426.

Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E.-M. Mandelkow ve E. Mandelkow (1994). "Domains of tau protein and interactions with microtubules." Biochemistry 33(32): 9511-9522.

Hilton, G. D., B. A. Stoica, K. R. Byrnes ve A. I. Faden (2008). "Roscovitine reduces neuronal loss, glial activation, and neurologic deficits after brain trauma." J Cereb Blood Flow Metab 28(11): 1845-1859.

Hirano, A. (1994). "Hirano bodies and related neuronal inclusions." Neuropathology and applied neurobiology 20(1): 3-11.

Hirokawa, N., Y. Shiomura ve S. Okabe (1988). "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." The Journal of cell biology 107(4): 1449-1459.

Hoogenraad, C. C. ve F. Bradke (2009). "Control of neuronal polarity and plasticity—a renaissance for microtubules?" Trends in cell biology 19(12): 669-676.

Iizuka, D., A. Ogura, M. Kuwabara ve O. Inanami (2008). "Purvalanol A induces apoptosis and downregulation of antiapoptotic proteins through abrogation of phosphorylation of JAK2/STAT3 and RNA polymerase II." Anti-cancer drugs 19(6): 565-572.

Ikenoue, T., S. Hong ve K. Inoki (2009). "Monitoring mammalian target of rapamycin (mTOR) activity." Methods in enzymology 452: 165-180.

Jacobs, K. M., S. R. Bhave, D. J. Ferraro, J. J. Jaboin, D. E. Hallahan ve D. Thotala (2012). "GSK-3." International journal of cell biology 2012.

Kampers, T., P. Friedhoff, J. Biernat, E.-M. Mandelkow ve E. Mandelkow (1996). "RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments." FEBS letters 399(3): 344-349.

Kang, J., H.-G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K.-H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther ve B. Müller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor."

Kapaki, E., K. Kilidireas, G. Paraskevas, M. Michalopoulou ve E. Patsouris (2001). "Highly increased CSF tau protein and decreased  $\beta$ -amyloid (1–42) in sporadic CJD: a discrimination from Alzheimer's disease?" Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 71(3): 401-403.

Khlistunova, I., M. Pickhardt, J. Biernat, Y. Wang, E.-M. Mandelkow ve E. Mandelkow (2007). "Inhibition of tau aggregation in cell models of tauopathy." Current Alzheimer Research 4(5): 544-546.

Kobayashi, S., K. Ishiguro, A. Omori, M. Takamatsu, M. Arioka, K. Imahori ve T. Uchida (1993). "A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule." FEBS Lett 335(2): 171-175.

Kolarova, M., F. García-Sierra, A. Bartos, J. Ricny ve D. Ripova (2012). "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease." International journal of Alzheimer's disease 2012.

Kruse, J.-P. ve W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell 137(4): 609-622.

Kulikov, A., E. Shilov, I. Mufazalov, V. Gogvadze, S. Nedospasov ve B. Zhivotovsky (2012). "Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis." Cellular and molecular life sciences 69(11): 1787-1797.

Larson, E. B., L. Wang, J. D. Bowen, W. C. McCormick, L. Teri, P. Crane ve W. Kukull (2006). "Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older." Ann Intern Med 144(2): 73-81.

Lee, G., N. Cowan ve M. Kirschner (1986). "The Primary Structure and Heterogeneity of Tau." J. Neurophysiol 55: 484.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri ve X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell 91(4): 479-489.

Littauer, U. Z., D. Givon, M. Thierauf, I. Ginzburg ve H. Ponstingl (1986). "Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences 83(19): 7162-7166.

Loberg, R. D., E. Vesely ve F. C. Brosius (2002). "Enhanced glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism." Journal of Biological Chemistry 277(44): 41667-41673.

Manceur, A. P., M. Tseng, T. Holowacz, I. Witterick, R. Weksberg, R. D. McCurdy, J. J. Warsh ve J. Audet (2011). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the differentiation and reduces the proliferation of adult human olfactory epithelium neural precursors." Experimental cell research 317(15): 2086-2098.

Mandelkow, E. M. ve E. Mandelkow (2012). "Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration." Cold Spring Harb Perspect Med 2(7): a006247.

Martinez, A., A. Castro, I. Dorronsoro ve M. Alonso (2002). "Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation." Med Res Rev 22(4): 373-384.

Maurer, K., S. Volk ve H. Gerbaldo (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." The Lancet 349(9064): 1546-1549.

Meijer, L., M. Flajolet ve P. Greengard (2004). "Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3." Trends Pharmacol Sci 25(9): 471-480.

Meijer, L. ve E. Raymond (2003). "Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials." Accounts of chemical research 36(6): 417-425.

Miller, J. R. ve R. T. Moon (1996). "Signal transduction through 13-catenin and specification of cell fate during embryogenesis." Genes Dev 10(20): 2527-2539.

Mines, M. A., E. Beurel ve R. S. Jope (2011). "Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3." International Journal of Alzheimer's Disease 2011.

Mohamed, F. Z., Y. M. Hussien, M. M. AlBakry, R. H. Mohamed ve N. M. Said (2013). "Role of DNA repair and cell cycle control genes in ovarian cancer susceptibility." Molecular biology reports 40(5): 3757-3768.

Monaco, E. A., C. M. Beaman-Hall, A. Mathur ve M. L. Vallano (2004). "Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons." Biochemical pharmacology 67(10): 1947-1964.

Mukrasch, M. D., S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow ve M. Zweckstetter (2009). "Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution." PLoS Biol 7(2): e1000034.

Mukrasch, M. D., J. Biernat, M. von Bergen, C. Griesinger, E. Mandelkow ve M. Zweckstetter (2005). "Sites of tau important for aggregation populate  $\beta$ -structure and bind to microtubules and polyanions." Journal of Biological Chemistry 280(26): 24978-24986.

Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. D. O'Leary ve M. Tessier-Lavigne (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." Nature 457(7232): 981-989.

Noble, W., C. Garwood, J. Stephenson, A. M. Kinsey, D. P. Hanger ve B. H. Anderton (2009). "Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease." FASEB J 23(3): 739-750.

Pap, M. ve G. M. Cooper (2002). "Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  signaling pathway." Molecular and cellular biology 22(2): 578-586.

Papasozomenos, S. C. ve L. I. Binder (1987). "Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system." Cell motility and the cytoskeleton 8(3): 210-226.

Paudel, H. K., J. Lew, Z. Ali ve J. Wang (1993). "Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments." Journal of Biological Chemistry 268(31): 23512-23518.

Pecorino L. 2012 *Molekuler Biology of Cancer*, Oxford, Press Third Ed. University P.119-125

Perez, M., J. M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini ve J. Avila (1996). "Polymerization of  $\tau$  into Filaments in the Presence of Heparin: The Minimal Sequence Required for  $\tau$ - $\tau$  Interaction." Journal of neurochemistry 67(3): 1183-1190.

Petit-Paitel, A., F. Brau, J. Cazareth ve J. Chabry (2009). "Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3beta in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP-treated neurons." PLoS One 4(5): e5491.

Pizarro, J. G., J. Folch, J. L. Esparza, J. Jordan, M. Pallas ve A. Camins (2009). "A molecular study of pathways involved in the inhibition of cell proliferation in neuroblastoma B65 cells by the GSK-3 inhibitors lithium and SB-415286." J Cell Mol Med 13(9B): 3906-3917.

Pluquet, O., L.-K. Qu, D. Baltzis ve A. E. Koromilas (2005). "Endoplasmic reticulum stress accelerates p53 degradation by the cooperative actions of Hdm2 and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ." Molecular and cellular biology 25(21): 9392-9405.

Ramanan, V. K. ve A. J. Saykin (2013). "Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders." Am J Neurodegener Dis 2(3): 145-175.

Reed, J. C., L. Meister, S. Tanaka, M. Cuddy, S. Yum, C. Geyer ve D. Pleasure (1991). "Differential expression of bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin." Cancer Res 51(24): 6529-6538.

Rohn, T. T. (2010). "The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities." Apoptosis 15(11): 1403-1409.

Sawaya, M. R., S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. Wiltzius ve H. T. McFarlane (2007). "Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers." Nature 447(7143): 453-457.

Schneider, A. ve E. Mandelkow (2008). "Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases." Neurotherapeutics 5(3): 443-457.

Searle, J., D. Collins, B. Harmon ve J. Kerr (1973). "The spontaneous occurrence of apoptosis in squamous carcinomas of the uterine cervix." Pathology 5(2): 163-169.

Shakoori, A., W. Mai, K. Miyashita, K. Yasumoto, Y. Takahashi, A. Ooi, K. Kawakami ve T. Minamoto (2007). "Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents." Cancer science 98(9): 1388-1393.

Shalini, S., L. Dorstyn, S. Dawar ve S. Kumar (2015). "Old, new and emerging functions of caspases." Cell Death Differ 22(4): 526-539.

Shang, Y. C., Z. Z. Chong, S. Wang ve K. Maiese (2012). "Prevention of beta-amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL." Aging (Albany NY) 4(3): 187-201.

Smith, D. S., P. L. Greer ve L.-H. Tsai (2001). "Cdk5 on the brain." Cell growth and differentiation 12(6): 277-283.

Song, L., P. De Sarno ve R. S. Jope (2002). "Central role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation." Journal of Biological Chemistry 277(47): 44701-44708.

Steiner, B., E. Mandelkow, J. Biernat, N. Gustke, H. Meyer, B. Schmidt, G. Mieskes, H. Söling, D. Drechsel ve M. Kirschner (1990). "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca<sup>2+</sup> (+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles." The EMBO journal 9(11): 3539.

Takashima, A., M. Murayama, K. Yasutake, H. Takahashi, M. Yokoyama ve K. Ishiguro (2001). "Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain." Neuroscience letters 306(1): 37-40.

Tell, V. ve A. Hilgeroth (2013). "Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics." Front Cell Neurosci 7: 189.

Thies, E. ve E.-M. Mandelkow (2007). "Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1." The Journal of neuroscience 27(11): 2896-2907.

Thotala, D. K., D. E. Hallahan ve E. M. Yazlovitskaya (2012). "Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitors protect hippocampal neurons from radiation-induced apoptosis by regulating MDM2-p53 pathway." Cell Death & Differentiation 19(3): 387-396.

Tomizawa, K., J. Ohta, M. Matsushita, A. Moriwaki, S.-T. Li, K. Takei ve H. Matsui (2002). "Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity." The Journal of neuroscience 22(7): 2590-2597.

Tsai, L.-H., I. Delalle, V. S. Caviness, T. Chae ve E. Harlow (1994). "p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5."

Von Bergen, M., P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E.-M. Mandelkow ve E. Mandelkow (2000). "Assembly of  $\tau$  protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming  $\beta$  structure." Proceedings of the National Academy of Sciences 97(10): 5129-5134.

Watcharasit, P., G. N. Bijur, L. Song, J. Zhu, X. Chen ve R. S. Jope (2003). "Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) binds to and promotes the actions of p53." Journal of Biological Chemistry 278(49): 48872-48879.

Watcharasit, P., G. N. Bijur, J. W. Zmijewski, L. Song, A. Zmijewska, X. Chen, G. V. Johnson ve R. S. Jope (2002). "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and p53 after DNA damage." Proceedings of the National Academy of Sciences 99(12): 7951-7955.



Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo ve M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A 72(5): 1858-1862.

Wilson, D. M. ve L. I. Binder (1995). "Polymerization of microtubule-associated protein tau under near-physiological conditions." Journal of Biological Chemistry 270(41): 24306-24314.

Wilson, D. M. ve L. I. Binder (1997). "Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease." The American journal of pathology 150(6): 2181.

Wilson, L. ve M. Jordan (2013). "New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies." Journal of chemotherapy.

Wischik, C., M. Novak, P. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar ve R. Crowther (1988). "Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." Proceedings of the National Academy of Sciences 85(13): 4884-4888.

Wojciechowski, M. F. (2003). "Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective." Advances in legume systematics, part 10: 5-35.

Youle, R. J. ve A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nature reviews Molecular cell biology 9(1): 47-59.

Zhang, Y. (2013). Role of apoptosis in disease, Intertech.

Zinkel, S., A. Gross ve E. Yang (2006). "BCL2 family in DNA damage and cell cycle control." Cell Death Differ 13(8): 1351-1359.

## 7. EKLER

Tablo 5: Kullanılan cihazların listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
ChemiDoc	1708280	Bio-Rad
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Dikey akışlı güvenlik kabini	Model:	HeraSafe
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low	New Brunswick
Elektroforez sistemi	165-8000	Bio-Rad
Elektroforez transfer sistemi	170-4155	Bio-Rad
Etüv	Thermo	Herocell 1150
Floresan ataçmanlı invert	Model: 1X71	Olympus
Fluorometre	Fluoroskan	Thermo Labsystems
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar flow	Thermo	12469,2
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Z359629	Sigma Aldrich
Invert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Kar-buz makinası	AF80	Scotsman
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Masaüstü soğutmalı santrifüj	5417R	Eppendorf
Mikropipet (0,5µl-10µl)	B344800920	OHAUS
Mikropipet (2µl-20µl)	B344600720	OHAUS
Mikropipet (20µl-200µl)		Thermo Scientific
Mikropipet (100µl-1000µl)	B361701454	OHAUS

<b>Mikroplaka okuyucu</b>	680	Bio-Rad
<b>Otoklav</b>	OTO32	Nüve
<b>pH Metre</b>	N315	SEM/Mettler Toledo
<b>PVDF Membran</b>	88518	Thermo Scientific
<b>Sıvı azot tankı ve ikmal tankı</b>	Arpege 40	Air Liquid
<b>Spektrofotometre</b>	Ultraspec 2100	Biosciences
<b>Tartı</b>	LE6202S	Sartorius
<b>Tüp rotasyon aleti</b>	SRT9D	Stuart
<b>Vorteks</b>	SA8	Stuart/ProLab

**Tablo 6: Hücre kültürü donanımları.**

<b>ADI</b>	<b>ÜRÜN KODU</b>	<b>FİRMA ADI</b>
<b>12 kuyucuklu petri</b>	92012	TPP
<b>25cm<sup>2</sup> hücre büyütme kabı</b>	90026	TPP
<b>6 kuyucuklu petri</b>	92006	TPP
<b>60 mm petri</b>	93060	TPP
<b>96 kuyucuklu petri</b>	92096	TPP
<b>DMEM besiyeri</b>	D6429	Sigma Aldrich
<b>Enjektör seti (5-10-25 cc)</b>	P110-0231	Set Inject
<b>Asal olmayan amino asit çözeltisi (100x)</b>	M7145	Sigma Aldrich
<b>Fetal Bovine Serum</b>	P291509	Pan Biotech
<b>Kriyovial tüp</b>	V7634	NUNC
<b>Penisilin/Streptomisin</b>	P06-07100	Pan Biotech
<b>Roskovitin</b>	R7772	Sigma Aldrich
<b>SK-N-AS hücre hattı</b>	CRL-2137	ATCC

<b>Steril pipetler (10ml)</b>	94010	TPP
<b>Steril pipetler (5ml)</b>	94005	TPP
<b>Şırınga filtreleri (0.22 µm)</b>	99722	TPP
<b>Tripsin-EDTA</b>	P10-0231	Pan Biotech

**Tablo 7: Kullanılan kimyasallar listesi.**

<b>ADI</b>	<b>ÜRÜN KODU</b>	<b>FİRMA ADI</b>
<b>10X PBS</b>	P04-53500	Pan Biotech
<b>2-merkaptolanol</b>	S4805940517	Merck
<b>Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti</b>	A3699	Sigma Aldrich
<b>Amonyum persülfat</b>	A3678	Sigma Aldrich
<b>Coomassie Blue Belirteci</b>	500-0006	Bio-Rad
<b>DAPI</b>	D1306	Invitrogen
<b>DCFH-DA</b>	C6827	Invitrogen
<b>DiOC6 Boya</b>	2129966	Fluka
<b>DMSO</b>	D5879	Sigma Aldrich
<b>DTT</b>	D0632	Sigma Aldrich
<b>EDTA</b>	A3452	Sigma Aldrich
<b>Etanol</b>	A3452	Sigma Aldrich
<b>Fetal Bovine Serum (FBS)</b>	P290310	Pan Biotech
<b>Glisin</b>	A1067	AppliChem
<b>Hidrojen peroksit</b>	K39218400838	MERCK
<b>İzopropanol</b>	24137	Rieel-de Haen
<b>Laemli Tamponu</b>	S3401	Sigma Aldrich
<b>Luminol</b>	A8511	Sigma Aldrich
<b>Metanol</b>	24229	Sigma Aldrich
<b>MTT Solüsyonu</b>	M2003	Sigma Aldrich

<b>Page Ruller Prestained Protein Ladder</b>	SM0671	Fermentas
<b>p-Coumaric Asit</b>	C9008	Sigma Aldrich
<b>Phosphate buffered salina (PBS)</b>	2810305	MP Biomedicals
<b>Propidium Iodide</b>	A2261,0025	Applichem
<b>Protein İzolasyonu Tamponu</b>	K0301	Fermentas
<b>Saf Etanol</b>	32221	Rieel-de Haen
<b>SDS (Sodyum dedosil sülfat)</b>	A3452	Applichem
<b>Sığır Serum Albumin (BSA)</b>	500-0007	BioRad
<b>Sodyum Klorür</b>	A2942	AppliChem
<b>TEMED</b>	A1148	Applichem
<b>Trikloroasetik asit</b>	T0699	Sigma Aldrich
<b>Tris Baz</b>	A2264	Applichem
<b>Tris-HCl</b>	A3452	Applichem
<b>Tween 20</b>	S4927784 802	MERCK
<b>Yağsız Süt Tozu</b>	9999	Cell Signaling Technology

**Tablo 8: Kullanılan moleküler biyoloji kitleri.**

<b>ADI</b>	<b>ÜRÜN KODU</b>	<b>FİRMA ADI</b>
<b>Annexin V-PI kiti</b>	BV-K101-3	MBL International
<b>Sitoplazmik nuklear protein izolasyon kiti</b>	K0311	Fermentas



## ÖZGEÇMİŞ

### 1. ADI SOYADI: BERKAY GÜRKAN

#### İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

**Telefon:**0554 742 59 03

**E-posta:** berkay-gurkan@hotmail.com

**2. Doğum Tarihi:** 01.11.1991

**3. Ünvanı:** Öğrenci

**4. Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2009-2014
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2014-2016