

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**POTANSİYEL GSK3 β İNHİBİTÖRÜ EPİBRASSİNOLİDİN ANTI
NÖRODEJENERATİF ETKİSİNİN TAU PLAZMİDİ AKTARILMIŞ
SİNİR HÜCRE MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YENİGÜN YAZICI

160000759

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

MAYIS 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**POTANSİYEL GSK3 β İNHİBİTÖRÜ EPİBRASSİNOLİDİN ANTI
NÖRODEJENERATİF ETKİSİNİN TAU PLAZMİDİ AKTARILMIŞ
SİNİR HÜCRE MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YENİGÜN YAZICI

1600000759

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27 Haziran 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 28 Mayıs 2019

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Prof. Dr. Hülya YAZICI (İstanbul Üniversitesi)

MAYIS 2019

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesini esirgemeyen danışmanım, çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya,

Laboratuvar çalışmalarını sürdürdüğüm süre içerisinde bilimsel yardım ve destekleri ile yanımda olan sevgili hocalarım Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER-GÜRKAN'a,

Yardımlarını esirgemeyerek deney süreçlerinde her zaman yanımda olan ve birikimleriyle bize destek olan Araş. Gör. Özge BERRAK-RENCÜZOĞULLARI ve Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ-KILBAŞ'a,

Laboratuvar çalışmalarımda daima yanımda olan canım arkadaşlarım Osman Orçun OKUMUŞ ve Derya BULUT'a,

Hayatta en büyük desteğim olan abim Gökhan YENİGÜN ve eşi Elizabeth Jane WILSON'a,

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırma laboratuvarına sunmuş olduğu olanaklardan dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezi annem Şahsenem YENİGÜN ve babam Nihat YENİGÜN'e itaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ALZHEIMER HASTALIĞI	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığı Tanısı	4
2.1.2. Alzheimer Hastalığı Semptomları	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Evreleri	5
2.1.4. Alzheimer Hastalığı Patolojisini Tetikleyen Olası Mekanizmalar ve Risk Faktörleri	8
2.1.5. Alzheimer Hastalığında Tedavi/Yönetim	11
2.2. ALZHEIMER HASTALIĞININ GENETİĞİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMASI	13
2.2.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığının Genetiği	15
2.2.1.1. Amiloid Prekürsör Proteini (APP)	15
2.2.1.2. Amiloid Kaskad Hipotezi	18

2.2.1.3. APP' nin İşlenmesi.....	19
2.2.1.4. PSEN Mutasyonları.....	21
2.2.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığının Genetiği	23
2.2.2.1. Apolipoprotein E (APOE), TREM ₂	23
2.2.3. APP Tetikleyici Taupati.....	27
2.2.4. MAPT Geni ve Tau Proteini	28
2.2.5. Tau' nun Post-Translasyonel Modifikasyonları.....	31
2.2.6. Glikojen Sentaz Kinaz 3	35
2.2.7. GSK3' ün Alzheimer Hastalığındaki Rolü	39
2.3. OTOFAJİ	40
2.3.1. Otofajinin Aşamaları.....	43
2.3.2. Otofajinin Regülasyonu	44
2.3.3. Sinir Hücrelerinde Otofaji.....	46
2.3.4. Alzheimer Hastalığı ve Otofaji	46
2.4. EPİBRASSİNOLİD (EBR).....	48
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1. KULLANILAN MATERYALLER.....	51
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	51
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları	51
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	51
3.1.4. Kullanılan Tamponlar	51
3.1.4.1. 10X TBS.....	51
3.1.4.2. 1X TBS-Tween.....	51
3.1.4.3. 10X PBS	51
3.1.4.4. Besiyeri Hazırlanması.....	52

3.1.4.5. Protein Standardı (Bovine Serum Albumin = BSA).....	52
3.1.4.6. Bradford Reagent.....	52
3.1.4.7. Hücre Lizis Tamponu (CLB).....	52
3.1.4.8. Harsh Strip Buffer.....	52
3.1.4.9 Mild Strip Buffer.....	52
3.1.4.10. %10 Ammonium Persulphate Solution (APS).....	52
3.4.1.11. Coumaric Asit (CA).....	53
3.4.1.12 Luminol.....	53
3.4.1.13. Yürütme tamponu.....	53
3.4.1.14. Transfer Tamponu.....	53
3.4.1.15. Yürütme Jelinin Hazırlanması.....	53
3.4.1.16. Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması.....	53
3.4.1.17. LB Agar.....	53
3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	54
3.2.1. Hücre Kültürü.....	54
3.2.1.1. Hücrelerin Yetiştirilmesi.....	54
3.2.1.2. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması.....	54
3.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	54
3.2.1. Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılık Testi (MTT).....	55
3.2.2. Bakterilerden Plazmit İzolasyonu.....	55
3.2.3. Plazmit Transfeksiyonu.....	56
3.2.4. İmmunoblotlama.....	56
3.2.4.1. Total Protein İzolasyonu.....	56
3.2.4.2. Sitoplazmik ve Nükleer Protein İzolasyonu.....	57
3.2.4.3. Bradford Protein Miktar Tayini.....	57

3.2.4.4. Proteinlerin SDS-PAGE Jelde Yürütülmesi.....	58
3.2.4.5. Membrana Transfer ve Bloklama.....	58
3.2.4.6. Birincil ve İkincil Antikor İşaretlemeleri	58
3.2.5. Fluoresan Boyama.....	59
3.2.5.1. Diheksilokarbosiyanin İyodür (DiOC ₆) Boyama.....	59
3.2.5.2. Propidyum İyodür (PI) Boyama.....	59
3.2.5.3. 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama	60
3.2.5.4. Dikloro-Dihidro-Fluoreskein Diasetat (DCFH-DA) Boyama	60
3.2.6. Hücre Akış Sitometresi	61
3.2.6.1. Hücre Akış Sitometrisinde PI Analizi.....	61
3.2.6.2. Annexin V/PI Boyama	61
3.2.6.3. Reaktif Oksijen Türleri Analizi.....	62
4. SONUÇLAR	63
4.1. PRK5-EGFP-P301L-TAU PLAZMIDI AKTARILMIŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN ANTI-NÖRODEJENERATIF ETKİSİNİN MTTANALIZI İLE GÖSTERİLMESİ.....	63
4.2. PRK5-EGFP-P301L-TAU PLAZMİDİ TRANSFEKTE EDİLEREK TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN DOZA BAĞLI OLARAK HÜCRE DEVRİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	64
4.3. İN VİTRO TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRE AKIŞ SİTOMETRESİ İLE GÖSTERİLMESİ.....	65
4.4. İN VİTRO TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ VE DOĞAL TİP PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ BOYAMALAR YAPILARAK FLUORESAN MİKROSKOBİSİ İLE GÖSTERİLMESİ	66
4.5. POTANSİYEL GSK3B İNHİBİÖRÜ EBR' NİN TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE AH BİYOBELİRTECİ	

PROTEİNLERİN ANLATIMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İMMUNOBLOTLAMA TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ	69
4.6. TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ VE DOĞAL TİP PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İMMUNOBLOTLAMA TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ	72
4.7. EBR' NİN TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ VE DOĞAL TİP PC12 HÜCRELERİNDE OTOFAJİ YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İMMUNOBLOTLAMA YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ.....	74
5. TARTIŞMA	76
6. KAYNAKÇA.....	84

KISALTMALAR

- AH (AD):** Alzheimer hastalığı
AKT (PKB): Protein kinaz B
AMP: Adenozin monofasfat
AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4 izooksazol-propiyonik
AMPK: AMP ile aktive edilen protein kinaz
AP-1: Aktivatör protein-1
APOE: Apolipoprotein E
APP: Amiloid öncül proteini
ATCC: American Type Culture Collection
ATF: Aktive Tf
ATF6f: Sitosolik ATF6 fragment
ATG: Makrootofaji-ilişkili proteinler
ATP: Adenozin trifosfat
A β : Amiloid beta
BAK1: BRI1 ilişkili reseptör kinaz 1
BBB: Kan-beyin bariyeri
Beklin1: Sargılı bobin Miyozin-benzeri Bcl2-ilişkili protein
BES1: BR duyarlı EMS baskılayıcı 1 Tf
BIN2: BR duyarlı 2 kinaz (GSK3 benzeri kinaz)
BOS: Beyin-omurilik sıvısı
BR: Brassinolid
BRI1: Brassinolid duyarlı 1 reseptörü
BSA: Sığır serum albümini
BSK1: BR sinyalizasyon kinaz 1
BSU1: BRI1-baskılayıcı 1
BZR1: Brassinazol-direnç 1 Tf
CDC: Hücre bölünme devri kinazı
CDK: Sikline bağımlı kinaz
CK1: Cdk-bağımlı inhibitörler
CMA: Şaperon aracılı otofaji
CSF: Serebrospinal sıvı
DAPI: 4,6-Diamidino-2-fenilindol
DAPK: Ölüm ilişkili protein kinaz
DCFH-DA: Dikoloro-Dihidro-Fluoreskein Diasetat
DISC: Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi
DiOC6: 3,3'-Diheksilokarbosiyanin İyodür
DMSO: Dimetil sülfoksit
EBR: Epibrassinolid
ER: Endoplazmik Retikulum

ERK: Ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinaz (p44/42)
FBS: Fetal sığır serumu
FTD: Frototemporal demans
FTDP-17: Parkinson ile birlikte gelişen FTD-17
GABA: Gama-aminobutrik asit
GRK: G-protein bağlantılı reseptör kinaz
GSK3: Glikojen sentaz kinaz-3
GST: Glutatyon-S-transferaz
HDAC: Histon deasetilaz
HRD1: HMG-CoA redüktaz degregasyon 1 homolog
IGFs: İnsülin-benzeri büyüme faktörleri
IkB: Kappa B'nin inhibitörü
IKK: IkB kinaz
IL: İnterlökin
IP3R: İnositol trifosfat reseptör
IR: İnsülin reseptörü
IRE: Demir (Fe+) Cevap elementi
IRE1 α : İnositol gerektiren enzim 1 α
IRS-1: İnsülin reseptör subsratı-1
Kaspaz: Sistein-aspartik proteaz
LAMP-2A: Lizozom-ilişkili membran proteini-2
LB: Luria Bertani besiyeri
LC3A/B: MAP 1-hafif zincir 3 α / β
LCH: Lewy cisimciği hastalığı
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LiCl: Lityum Klorür
MAP: Mikrotübül ilişkili proteinler
MARK: Mikrotübül afinite düzenleyici kinaz
Mdm2: Fare çift dakika 2 enzimi
MEF: Fare embriyonik fibroblast hücresi
MMP: Mitokondriyal membran geçirgenliği
MSS: Merkezi sinir sistemi
MTB: Mikrotübül bağlanma bölgesi
mTOR: Rapamisinin mekanistik hedefi
Myc: Miyelositomatoses viral onkogen homologu
NF: Nörofilament
NF κ B: B hücresi nüklear faktör kappa-hafif zincir-aktivatörü
ÖR: Östrojen reseptörü
p44/42: Mitojenle aktive edilen protein kinaz-44/42
p53: Apoptozun-tümör-ilişkili proteini-53
p62: Ub-bağlanma proteini Sekuestozom 1
p70S6K: Ribozomal protein S6 kinaz beta-1
PARP: Poli ADP-riboz polimeraz
PBS: Fosfat-tamponlu tuz çözeltisi
PDI: Protein disülfüt izomeraz
PH: Parkinson hastalığı

PI: Propidyum iyodür
PI3K: Fosfotidil-inositol-3-kinaz
PKA: Protein kinaz A
RIPK: Reseptör ilişkili serin / trenonin protein kinazlar
ROS: Reaktif oksijen türleri
ROSC: Roskivitin
SAPK: Stres ile aktive olan kinaz
SDS: Sodyum dodesil sülfat
TBS: Tris-tamponlu tuz çözeltisi
TRAIL: TNF-ilişkili apoptozu indükleyen ligand
UPR: Katlanmamış protein cevabı
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
XBP1: X-kutusu bağlanma proteini-1



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. AH' de beyindeki nörolojik ve fizyolojik değişimler	5
Şekil 2. 2. AH' nin evreleri	7
Şekil 2. 3 AH ilaç geliştirme ve kombinasyon tedavileri.....	12
Şekil 2. 4. APP' nin sıralı bölünmesi iki yolla gerçekleşir. (a) α -sekretaz içeren APP-amiloidojenik olmayan işleme ve ardından γ -sekretaz gösterilmektedir. (b) β -sekretaz (BACE1) ve ardından γ -sekretaz içeren APP' nin amiloidojenik işlemi gösterilmektedir. Her iki işlem de çözümlenür ektodomainler (sAPP α ve sAPP β) ve C-terminal fragmentleri (AICD) üretir.....	16
Şekil 2. 5 APP protein ailesinin büyük, biyolojik olarak aktif, N-terminal ektodomainlerinin yanı sıra çok önemli bir Tirozin-Glutamik asit-Aspargin-Prolin-Treonin-Tirozin (YENPTY) protein-sıralama domaini içeren daha kısa bir C-terminal kuyruğu vardır. X11 ve Fe65 proteinlerini bağlar. A β peptidi ektodomain içinde başlar ve transmembran bölgeye doğru devam eder (kırmızı)	18
Şekil 2. 6. AH' de nöroinflamasyonun şematize edilmesi	19
Şekil 2. 7 Apolipoprotein E' nin alt izoformları	24
Şekil 2. 8 AH' nin genetik ve patolojik sebeplerinin şematize edilmesi	26
Şekil 2. 9 AH patolojisinin şematize olarak gösterilmesi	28
Şekil 2. 10 MAPT geni ve tau mRNA' sının alternatif eklenme ürünleri. Ekson 2,3-10' un alternatif eklenmesiyle tau proteinin MSS' de yaygın olarak bulunan 6 izoformunu oluşturmaktadır. Tau izoformları, amino (N-terminal) ucu (0N, 1N ve 2N) ve mikrotübül bağlanma domaini (MTD) tekrar dizilerine (3R ve 4R) göre adlandırılmaktadır.....	29
Şekil 2. 11 En büyük tau izoformunun (441 amino asit) fonksiyonel bölgelerinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 2. 12 Normal tau proteininin sağlıklı nöronlardaki görevlerinin şematize olarak gösterilmesi	31
Şekil 2. 13 Patolojik tau' nun etkilerinin şematize olarak gösterilmesi	32
Şekil 2. 14 Tau agregasyonunun aşamaları.....	33

Şekil 2. 15 Memelilerde bulunan GSK3' ün şematik olarak gösterilmesi.....	37
Şekil 2. 16 β -katenin kaynaklı Wnt sinyal yolağının şematik gösterimi	39
Şekil 2. 17 GSK3' ün AH' deki rolünün gösterilmesi	40
Şekil 2. 18 Bitkilerde EBR' nin varlığında (b) ve yokluğunda (a) brassinosteroid reseptörleri ve moleküler etkileşimleri.....	50
Şekil 3. 1 PC12 hücre hattına transfeksiyonu yapılan mutant tip PRK5-EGFP-P301L-TAU plazmiti	56
Şekil 4. 1 pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak (1 ve 10 μ M) EBR ve LiCl uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi. DMSO, EBR ve LiCl çözücüsü olarak kullanılmıştır, hücre canlılığına etkisi gözlemlenmemiştir.....	64
Şekil 4. 2 Doğal tip ve pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücre devri üzerindeki etkisinin gösterilmesi.	65
Şekil 4. 3 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR' nin hücre ölümü üzerindeki etkisinin Annexin-V/PI boyama yöntemi kullanılarak hücre akış sitometresinde gösterilmesi. Hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür.	66
Şekil 4. 4 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücre ölümü (PI), mitokondri membran potansiyeli ($DiOC_6$), DNA kırıkları (DAPI) ve ROS üretimi (DCFH-DA) üzerindeki etkisinin fluoresan mikroskopisi ile gösterilmesi.	68
Şekil 4. 5 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde EBR uygulamasının ROS üretimi üzerindeki etkisinin hücre akış sitometresi ile gösterilmesi. Farklı renklerle ifade edilen kondüsyonlardaki PC12 hücreleri kaldırılmış, DCFH-DA boyaması yapılarak karanlıkta inkübe edilmiş ve ardından hücre akış sitometresinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür.	69
Şekil 4. 6 pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmiti transfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR' nin AH biyobelirteci olan ve	

AH ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoiblottama yöntemiyle gösterilmesi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	70
Şekil 4. 7 Potansiyel GSK3 β inhibitörü olan EBR' nin taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde AH ile ilişkili kinazlar ve proteazlar üzerindeki etkisinin immünoiblottama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır.	71
Şekil 4. 8 EBR' nin, taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde β -katenin' in nuklear göçü üzerindeki etkisinin nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu yapılarak immünoiblottama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ekstraktta β -aktin, nuklear ekstraktta H3 (Histon3) kullanılmıştır.	72
Şekil 4. 9 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının GSK3 ilişkili PI3K/AKT/mTOR sağkalım yolağı üzerindeki etkisinin immünoiblottama yöntemi ile gösterilmesi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	73
Şekil 4. 10 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR' nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisinin immünoiblottama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır.	73
Şekil 4. 11 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının otofaji ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoiblottama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır.	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. AH riskini değiştiren faktörler (Mayeux and Stern 2012).....	8
Tablo 2. 2. EOAD' nin patogenezinde rol oynayan genler (Khanahmadi, Farhud et al. 2015).	13
Tablo 2. 3. Alzheimer Hastalığı patogenezinde direkt veya risk faktörü olarak etkili olan 20 önemli gen (Khanahmadi, Farhud et al. 2015).....	14
Tablo 7. 1 Kullanılan cihazların listesi	94
Tablo 7. 2 Hücre kültürü dananımları	95
Tablo 7. 3 Kullanılan kimyasalların listesi	96
Tablo 7. 4 %12' lik SDS-PAGE jel içeriği.....	97

ÖZET

Demansın en fazla gözlenen türü olan Alzheimer hastalığı (AH) nadiren ailesel, sıklıkla sporadik nedenlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. AH, serebral korteks ve hipokampüste geniş alanlara yayılan, nöron (sinir hücresi) ve nöronlar arasındaki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişen nörodejeneratif bir hastalıktır. AH patolojisinde hücre içerisinde tau ve hücre dışarısında biriken A β protein agregatlarının varlığı önemlidir. Tau kinaz inhibitörlerinin kullanımı AH tedavisinde terapötik strateji olarak önem taşımaktadır. AH patolojisinde otofaji temel hücreyel olay olmakla birlikte nöral sağkalım üzerindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. BR' ler sınıfından steroid türevli bir bitki büyüme düzenleyicisi olan EBR, tau kinazlardan olan GSK3 β 'nin potansiyel bir inhibitörüdür.

Bu tez çalışması kapsamında potansiyel GSK3 β (Glikojen sentaz kinaz 3 beta) inhibitörü olan EBR'nin tau plazmiti transfekte edilerek *in vitro* taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde nöral sağkalım üzerindeki etkisi otofaji yolağı ile ilişkili olarak gösterilmek istenmiştir. PC12 hücrelerinde EBR'nin uygun dozunu belirlemek amacıyla MTT analizi yapılmıştır. Sonuçta EBR'nin LiCl' ye kıyasla hücre sağkalımını daha anlamlı şekilde tetiklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte AH belirteci proteinlerin anlatımlarını veya fosforilasyon seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir. Tau kinazlardan, GSK3 β 'nin Ser9 inhibe edici fosforilasyonunun tetiklendiği, CDK5 anlatımının ve p70S6K'nın aktive edici Ser371 fosforilasyonu seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Taupati modeli PC12 hücrelerinde otofajinin EBR uygulaması ile hücre sağkalımını tetikleyecek şekilde düzenlendiği gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, potansiyel bir GSK3 β inhibitörü olan EBR'nin anti-nörodejeneratif etkisi AH biyobelirteci olan proteinler ve otofaji ile ilişkili proteinler üzerinde hücre sağkalımını tetikleyici etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle AH ve taupatilerde *in vivo* terapötik deneme çalışmalarında kullanımının mümkün olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), the most common type of dementia, is rarely seen for familial reasons, usually occurs due to sporadic reasons. AD is a neurodegenerative disease that occurs in the cerebral cortex and hippocampus due to dysfunctions both within and between the neurons. The presence of A β protein aggregates accumulating in the cell and the outside of the cell is important. The use of Tau kinase inhibitors is important as a therapeutic strategy in the treatment of AD. Although autophagy is the main cellular event in AD pathology, its role in neural survival has not been fully elucidated. EBR, a steroid derived plant growth regulator of the BR's is a potential inhibitor of GSK3 β from tau kinases.

In this study, the effect of the potential GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) inhibition of EBR using tau plasmid transfected *in vitro* taupati model generation with PC12 cells in relation to the autophagy pathway. For this purpose, MTT analysis was performed to determine the appropriate dose of EBR in the taupati model PC12 cells. As a result, EBR has been shown to trigger cell survival significantly. In addition, it has been shown that increase in the AD marker proteins was overcome following EBR administration. GSK3 β Ser9 inhibitory phosphorylation was increased, in contrary expression of CDK5 (Cyclin dependent kinase 5) and Ser371 phosphorylation of p70S6K (Ribosomal protein S6 kinase beta 1) were found decreased. Taupati model PC12 cells have been shown to regulate autophagy to trigger cell survival by EBR administration. Based on these results, it was shown that EBR is a GSK3 β inhibitor as well as anti-neurodegenerative effect in AD model. Therefore, it can be suggested that EBR can be used in *in vivo* experiments against AD models.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyadaki tüm demans vakalarının yaklaşık %70' ini teşkil eden AH genellikle sporodik, nadiren ailesel kökenli bir hastalıktır ve gelişiminde APP, APOE, PSEN1 ve PSEN2 olmak üzere yaklaşık 20 genin risk faktörü olduğu bilinmektedir. AH patolojisinde hücre içerisinde mikrotübül bağlanma proteinlerinden tau (tubulin ilişkili ünite)' nun hiperfosforilasyonu ile tetiklenen NFT' ler ve/veya hücre dışarısında ise biriken A β (amiloid beta) peptidlerinin oluşturduğu amiloid plaklar (senil plaklar) önemli rol oynamaktadır (Šerý, Povová et al. 2013, Erkinen, Kim et al. 2018). Tau protein fosforilasyonunun düzenlenmesini sağlayan başlıca enzimler GSK3 ve CDK5' tir. Bu enzimlerin aktivitesinde meydana gelebilecek bozukluklar NFT oluşumunu tetiklemektedir. Bununla birlikte hücre dışında A β peptidlerinin birikimi ve hücre içerisindeki tau hiperfosforilasyonu birbirlerini tetikleyebildikleri gibi hücredeki diğer protein birikimleri tarafından da tetiklenebilirler. Hücre içerisinde biriken proteinleri temizleme mekanizmalarının yetersiz kalması veya bu sistemlerdeki bozukluklar, apoptoz, otofaji ve nekroptoz gibi yollar aracılığıyla nöral hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle tau proteininin hiperfosforile olmasını tetikleyen GSK3 gibi enzimlerin anormal aktivitelerinin inhibi edilmesi AH' nin tedavisinde önemli bir terapötik yaklaşımdır (Mendiola-Precoma, Berumen et al. 2016, Cummings, Tong et al. 2019). Ancak klinik öncesi çalışmaları devam eden ve GSK3 β inhibitörü olan LiCl' nin sağlıklı hücrelerde toksisiteye neden olabildikleri gösterilmiştir (Hu, Begum et al. 2009). Bu sebeple AH' nin tedavisine yönelik çalışmalarda, kan beyin bariyerini (BBB) geçebilecek ve toksisitesi düşük tau kinaz inhibitörlerinin bulunması önem kazanmaktadır.

In vitro tau kinaz inhibitörleri ile ilgili çalışmalarda, sinir hücrelerinin bölünme yeteneklerinin kısıtlı olmasından dolayı genellikle nöral krest kökenli hücreler kullanılmaktadır. Nörona özgü endokrin özellikler gösteren PC12, insan kemik iliği nöroblastoma hücresi SH-SY5Y gibi hücre hatları ile çalışılmaktadır. Ancak bu hücrelerle

tau kinaz inhibitörlerinin çalışılmasındaki temel sorun tau anlatımlarının ve bununla ilişkili olarakta tau fosforilasyon seviyelerinin düşük olamasıdır. Bu nedenle bu hücelere tau anlatımını arttırmak amacıyla vektör transfeksiyonu veya sıcaklığın düşürülmesi gibi tau hiperfosforilasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak tetikleyecek uygulamaların *in vitro* AH modeli oluşturulmasında kullanılabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Bretteville, Marcouiller et al. 2012).

Brassinosteroid (BR) sınıfından steroid türevli bir bitki büyüme düzenleyicisi olan Epibrassinolid (EBR), tau kinazlardan olan GSK3 β ' nin potansiyel bir inhibitörüdür. Yapısal olarak memeli hücrelerindeki kolesterolden türevlenen ve etkileri bilinen; östrojen, testesteron ve progesterone vb. steroid hormonlar ile benzer işlevlere sahip oldukları düşünülmektedir (Steigerová, Rárová et al. 2012, Tang, Han et al. 2016). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda EBR'nin yapısal benzerliği nedeniyle steroid hormona bağımlı kanserlerde ve endoplazmik retikulum (ER) stresine bağılı olarak steroid hormon bağımsız kanserlerde hücre ölümünü tetiklediği ve sağlıklı hücrelerde toksisitesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda EBR'nin AH tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. PC12 hücrelerin de *in vitro* çalışmalarımız sonucunda EBR' nin tau kinazlardan olan GSK3' ün aktivitesini inhibe ettiği, ayrıca diğer tau kinazlar CDK5 ve mitojenle aktive edilen protein kinaz-44-42 (p44-42) anlatımları üzerinde de inhibe edici etkisi olduğu gözlenmiştir. Elde edilen ön bulgular ışığında yapılan bu projede potansiyel GSK3 β inhibitörü EBR'nin anti-nörodejeneratif etkisinin tau plazmiti aktarılmış sinir hücre modelinde gösterilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALZHEIMER HASTALIĞI

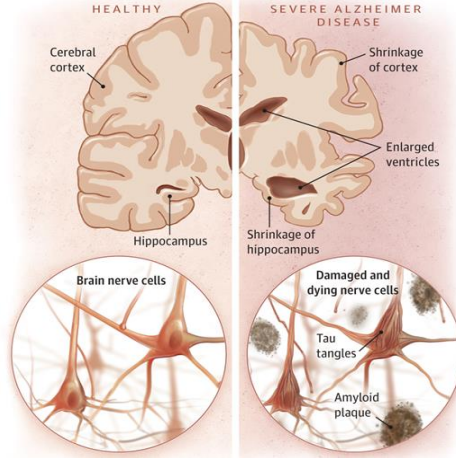
İlk kez 1906 yılında Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından “presenil demans” olarak adlandırılıp teşhisi konulan ve adını ondan alan AH dünyadaki tüm demans vakalarının %70’ ini kapsamaktadır (Šerý, Povová et al. 2013). AH, serebral korteks ve hipokampüste geniş alanlara yayılan, nöron ve nöronlar arasındaki fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gelişen nörodejeneratif bir hastalıktır. Anormallikler genellikle ilk önce frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda saptanmakta ve daha sonra bireyler arasında oldukça değişkenlik gösteren oranlarda yavaş yavaş nörokorteksin diğer bölgelerine ilerlemektedir. AH, nöronların içinde ve dışında artan çözünmeyen β -amiloid fibrillerinin (β -amyoid plakları) ve anormal tau (Tubulin-ilişkili birim) formlarının birikmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Jucker and Walker 2013, Jaunmuktane, Mead et al. 2015). Dünyada 60 yaş üstü yaklaşık 46,8 milyon kişiye AH tanısı konulmuştur. Demansın erken başlangıcındaki 4000 hastanın kişi başına % 1 den az olmasına rağmen, öngörülen rakamın 2050’ de 131,5 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Prince, Comas-Herrera et al. 2016). Demans prevalansındaki öngörülen artış, gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla daha yüksektir. Alzheimer Birliği, ABD (Amerika Birleşik Devleti)’ de 5,5 milyon kişiye AH teşhisi konulduğunu rapor etmiştir ve ABD’ de AH’ nin görülme sıklığının 2030’ da 7,7 milyon ve 2050’de 11-16 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Alzheimer's and Dementia 2018). Ülkemizde tahmini AH sayısının 250 bin dolayında olduğu öngörülmektedir ve yaşlı popülasyonun artmasına bağlı olarak bu sayının da artması beklenmektedir (Türk Geriatri Derneği, 2018).

2.1.1. Alzheimer Hastalığı Tanısı

AH'nin klinik tanısında genel medikal hikaye, nonkognitif ve davranışsal hikaye, psikiyatrik hikaye, toksik ilaç ve nütrisyon hikayesi, ailesel hikaye ile birlikte tıbbi kriterlere uygun olarak yapılan öğrenme, hafıza, işlevsel alandaki nöropsikolojik testler ve hastalığın prognozunda önemli olan genlerdeki mutasyonları belirleyen moleküler biyoloji yöntemleri oldukça önemlidir. Ayrıca hastalığın tanısında görüntüleme yöntemlerine sıklıkla başvurulmaktadır. Bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRG), pozitron emisyon tomografi (PET) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bununla birlikte serebrosipinal sıvı (CSF), kan veya plazmada hastalığa ait biyobelirteçlerin ölçülmesini sağlayan biyokimyasal teknikler de hastalığın tanısında kullanılmaktadır (Prince, Comas-Herrera et al. 2016, Faturrahman, Wasito et al. 2017, Erkinen, Kim et al. 2018).

2.1.2. Alzheimer Hastalığı Semptomları

AH'nin semptomları öncelikle, hatırlama kabiliyeti ve bellek, düşünme, konuşma ve oryantasyon için önemli olan beyin bölgelerindeki nöronların yavaş ve progresif bir şekilde ölmesidir. AH'nin patolojisi, semptomların ortaya çıkmasından çok önce başlar. A β -plaklarının hücre dışı birikimi, buna bağlı olarak nörofibrillerde anormal tau protein fosforilasyonu ve hücre içi birikimi (nörofibriler yumaklar-NFT) AH patogenezinin iki önemli nedenidir (Selkoe 1994, Selkoe 2001, Selkoe 2001). AH, progresif hafıza kaybı ve bilişsel bozulma ile karakterize edilmektedir. İleri evre AH hastaları, nöron inflamasyonundan nöron ölümüne kadar değişen semptomlar göstermektedir. Kardiyovasküler riske ek olarak, araştırmalar obezite, diyabet, depresyon, sigara ve yetersiz beslenme gibi yaşam tarzıyla ilgili çeşitli risk faktörleri, AH'nin klinik bulgularının başlamasından çok önce patolojik değişiklikleri teşvik eder. Hastalık süresi boyunca beyin hacmi %20' ye kadar azalır, beyin zarının kıvrımları derinleşir ve ventriküler sistem önemli ölçüde genişler (Şahin 2009, Barnes and Yaffe 2011) (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. AH' de beyindeki nörolojik ve fizyolojik değişimler (Jin 2015).

Artan hücre ölümü bir dizi nörobiyolojik proseslere yol açar; beyinde çok sayıda bilişsel becerilerde gerekli olan ve öğrenim süreçlerinde önemli rol oynayan ve bir nörotransmitter olan asetilkolin eksikliğine yol açar. Bu durum hastalık süresi boyunca beyinin diğer bölümlerini de etkiler ve çeşitli fonksiyon alanlarında zihinsel performansın artan bir şekilde bozulmasına neden olur (Jin 2015).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Evreleri

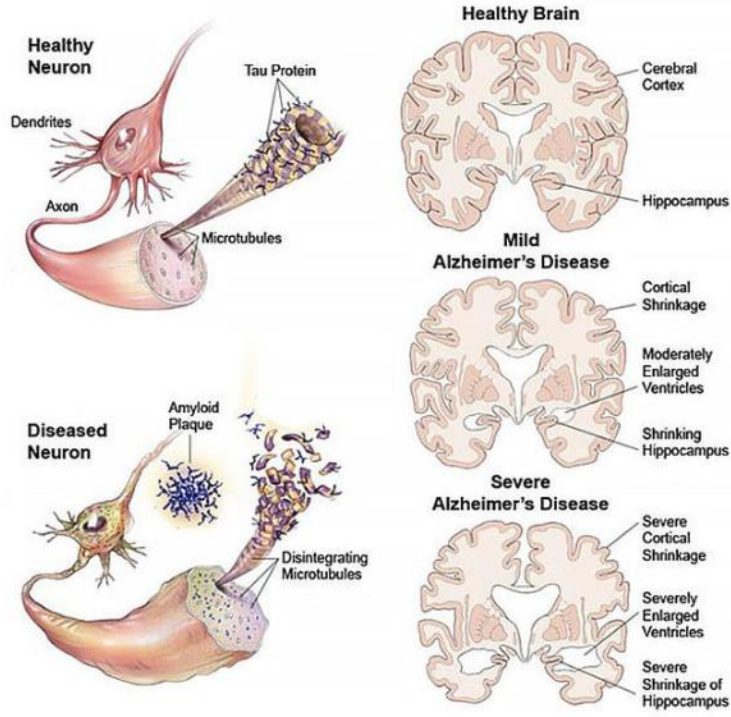
Hastalık ağırlık derecesine göre üç farklı evreden oluşmaktadır (Şekil 2.2). “Hafif bilişsel bozukluk” (Mild Cognitive Impairment, MCI) olarak tanımlanan ilk evre, uzun yıllar süren bir aşamayı öngörmektedir. Normal günlük yaşamda neredeyse fark edilmeyen ve sadece detaylı analizler sonucunda algılanabilen nöropsikolojik bozukluk ile karakterize edilmektedir. Ancak MCI tanısı, daha sonra zorunlu olarak Alzheimer tipi demans oluşacağı anlamına gelmemektedir; buradaki olasılık 5 yıl sonrasında yaklaşık %50 oranındadır (BrightFocus Foundation, 2017).

Hafif dereceli demans, hastalığın başlangıç evresidir. Hastaların mesleki yaşamlarında, sosyal aktivitelerinde ve kompleks görevleri yerine getirmede etkilenmiş olmaları, ancak günlük yaşantılarını bağımsız olarak idame ettirebilmeleri ile karakterize edilmektedir. Bu evrede ön planda olan, yeni bilgileri öğrenme ve hatırlama konusunda artan zorlukların yanı sıra sıklıkla hafif bazen de şiddetli depresif ruh hali ortaya çıkmaktadır. Hafif dereceli demansta beyinde dejenerasyon entorinal kortekste başlar ve daha sonra hipokampusa

ilerleyerek hastalığın seyrini ortaya koymaktadır. Bu dejenerasyon ile oluşan nöral kayıp beyinde büzölmeye dolayısıyla da beyin hacminde küçölmeye neden olmaktadır.

Orta dereceli demans evresinde bilişsel etkilenmeler, bağımsız yaşamın artık mümkün olmayacağı kadar şiddetli olabilmektedir. Bellek bozuklukları, konuşma sorunları, mantıklı düşünme, planlama ve hareket etme bozuklukları dolayısıyla tuvalet ihtiyaçlarını giderme de yardıma muhtaç olma gibi durumlar gittikçe artmaktadır. Günlük hafıza önemli ölçüde bozulmakta, hasta kendi biyografisini tam olarak hatırlayamamakta, tanıdık ortamlarda dahi oryantasyon zorlukları çekmekte ve artan bir şekilde zaman bilincini kaybetmektedir. Ayrıca şiddetli huzursuzluk, halüsinasyonlar ve saldırgan davranışlar gibi psikolojik belirtiler daha fazla artmaktadır.

Şiddetli dereceli demans evresinde ise hastalar günlük yaşantılarının tüm faaliyetlerinde yardıma ihtiyaç duymaktadırlar. Tüm bilişsel işlevlerin etkilendiğı ciddi bir ruhsal çöküntü yaşanmaktadır. Bu evrede özellikle nörolojik sorunlar, üriner ve fekal inkontinans, çiğneme ve yutma bozuklukları sıklıkla görölmektedir. Enfeksiyonlar, enflamasyonlar, epileptik nöbetler ve diğere hastalıklara karşı olan eğilim artmaktadır. AH kendi başına ölüme neden olmamakla birlikte sıklıkla rastalanan ölüm nedenleri, şiddetli bir şekilde zayıflamış olan genel durum ve mevcut yatalaklık sonucunda ortaya çıkan akciğere iltihabı, kalp krizi veya kan zehirlenmesidir (Mayeux and Stern 2012, Reitz and Mayeux 2014, Raskin, Cummings et al. 2015, Cummings, Tong et al. 2019).



Şekil 2. 2. AH' nin evreleri (BrightFocus Foundation, 2017).

2.1.4. Alzheimer Hastalığı Patolojisini Tetikleyen Olası Mekanizmalar ve Risk Faktörleri

AH ile ilgili çok sayıda risk faktörü mevcuttur (Şekil 2.3). Ancak bunlar arasında en iyi bilinen serebrovasküler hastalıklar ve öncülleridir. Diyabet, hipertansiyon, yüksek kolesterol, kötü beslenme, düşük fiziksel aktivite, sigara, alkol kullanımı, obezite, dislipidemi yüküsü, metabolik sendromlar, depresif belirtiler, psikolojik stres gibi diğer faktörlerde AH riskini arttırmaktadır (Jan, Azam et al. 2017).

Tablo 2. 1. AH riskini değiştiren faktörler (Mayeux and Stern 2012).

Faktör	Değişim	Muhtemel mekanizmalar
Kalp-damar hastalığı	Artan	Parankimal imha Stratejik konum ↑ Aβ biriktirme
Sigara içmek	Artan	Serebrovasküler etkiler Oksidatif stres
Hipertansiyon	Arttı ve azaldı	Mikrovasküler hastalık
Tip II diyabet	Artan	Serebrovasküler etki İnsülin ve Aβ temizleme için rekabet ediyor
Obezite	Artan	Tip II diyabet enflamatuvar riskinde artış
Beyin travması	Artan	↑ Aβ ve amiloid öncü protein birikimi
Eğitim	Azalmış	Bilişsel rezerv sağlar
Boş zaman etkinliği	Azalmış	Lipid metabolizmasını geliştirir, zihinsel stimülasyon
Akdeniz diyeti	Azalmış	Antioksidan, antiinflamatuvar
Fiziksel aktivite	Azalmış	Beyin plastisitesini harekete geçirir, beyin damarlanmasını artırır

Hemorajik enfarkt, küçük ve büyük iskemik kortikal enfarkt, vaskülopati gibi serebrovasküler değişiklikler demans riskini arttırmaktadır. İnmenin bilişsel bozulmaya ve AH' ye yol açabileceği çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. İlk olarak inme, talamus ve talamokortikal projeksiyonlar gibi hafıza fonksiyonunda önemli olan beyin bölgelerinin hasarına yol açabilmektedir. İkincisi inme, Aβ birikimini arttırabilir bu durumda bilişsel düşüşe neden olabilmektedir. Üçüncüsü inmenin, başlangıçlı bilişsel işlevi bozan inflamatuvar tepkilere neden olabilmektedir. Son olarak serebral hipoperfüzyon, Aβ birikimi, sinaptik ve nöral fonksiyon bozukluğuna neden olan

nörodejenerasyon kaskadını başlatabilir ve/veya hızlandırabilir ve bilişsel bozulmaya sebep olabilmektedir. Bununla birlikte sinaps oluşumu ve sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza için kritik olan bir serin-treonin kinaz olan CDK5' in aşırı ekspresyonuna yol açarak nöronal apoptoz ve ölüme yol açabilmektedir (Weishaupt, Kussmaul et al. 2003, Cheung, Gong et al. 2008). Bununla ilgili olarak yapılan deneylerde, kemirgen iskemi ve hipoksi modellerinde ortaya çıkan p25 ve CDK5 aşırı ekspresyonunun β sekretaz (BACE1, aspartil proteaz site-site amiloid prekürsör protein klevaj enzimi) seviyesini dolayısıyla da APP işlenmesini aşırı derecede arttırmaktadır (Jan, Azam et al. 2017). Kolesterol taşınımı ile bağlantılı olan *APOE* geni de AH' de vasküler risk faktörü olarak gösterilmektedir. Beyindeki kılcal damarların çeperlerinde A β birikmesi, risk faktörü olarak *APOE* ϵ 4 alleli ile ilişkilidir (Šerý, Povová et al. 2013).

Orta yaşta, yüksek kan basıncı bilişsel bozulma, demans ve AH riskini arttırmaktadır. Hipertansiyon, BBB' nin vasküler bütünlüğünü azaltarak, beyin dokusunda protein ekstrasvazasyonu ile sonuçlanan AH riskini arttırabilmektedir. Buna karşılık, protein ekstrasvazasyonu hücre hasarına, nöronal veya snaptik fonksiyonda azalmaya, apoptoza ve A β birikiminde artışa neden olabilir bu durum da bilişsel bozulma ile sonuçlanabilmektedir. Artan yaşla birlikte, yüksek kan basıncının AH riski üzerindeki etkisi azalır ve hatta tersine çevrilebilerek koruyucu bir etki göstermektedir. Bu sonuç, AH' nın başlamasının ardından damar sertleşmesi, kilo kaybı ve kan akışının otonom düzenindeki değişikliklere bağlı olarak kan basıncının düşmeye başlamasıyla açıklanabilmektedir (Glynn, Beckett et al. 1999, Knopman, Boland et al. 2001, Posner, Tang et al. 2002).

Gözlemsel çalışmalarda tip II diyabetin (T2D) AH riskini neredeyse iki katına çıkardığı bulunmuştur. Diyabete eşlik eden hiper-insülinemi vakalarında, insülin, insülin parçalayıcı enzim (IDE) için A β ile rekabet ederek A β ' nin beyinden ayrılmasını engellemektedir. Ayrıca AH ve sağlıklı hastalardan alınan hipokampal dokunun histopatolojik çalışmasında, IDE ekspresyonunda ve AH beyin dousundaki *IDE* mRNA seviyelerinde göreceli bir azalma göstermiştir. Diyabet ve glukoz toleransının bozulması, Gelişmiş glikozilasyon son ürünleri (AGE) oluşmasına neden olmaktadır. Amiloid plaklar

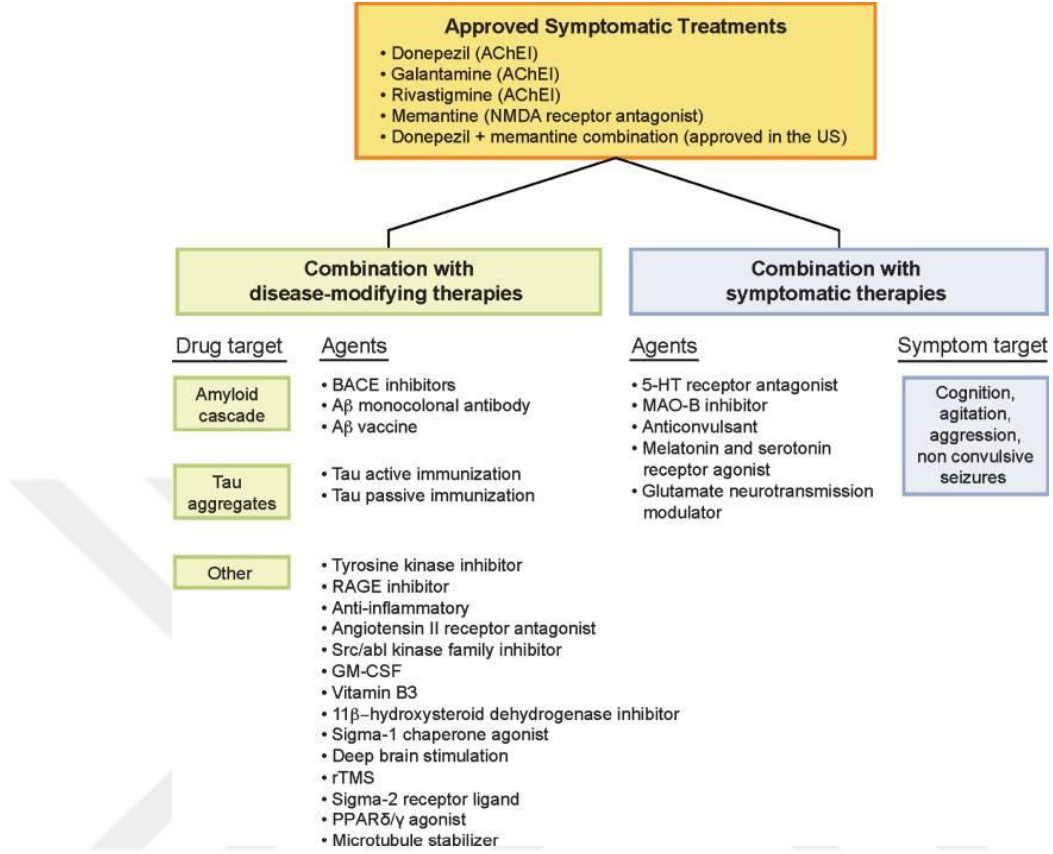
ve Nörofibriller yumak (NFT)' lar, AGE' ler için reseptör (RAGE)' ler içermektedir. RAGE' ler A β ' nin neden olduğu nöronal hasarı attırmaktadır. Adipoz doku, metabolizma ve inflamasyona katılan Adipokinler (adiponektin ve leptin gibi) ve sitokinler (resistin, tumor nekroz faktörü (TNF) ve interlökin (IL)-6 dahil) üretmektedir. Adipokin ve sitokin düzeyleri insülin direnci ve hiperinsülinemi ile artmaktadır (Cook, Leverenz et al. 2003, Craft 2007).

Plazma lipid seviyeleri (Dislipidemi) ile AH arasındaki ilişkiyle ilgili çelişkili veriler mevcuttur. APP, sekretaz olarak adlandırılan enzimler tarafından, amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollarla işlenmektedir. Amiloidojenik yolda APP, β sekretaz ve γ sekretaz enzimleri tarafından A β_{40} (A $_{1-40}$) ve A β_{42} (A $_{1-42}$) peptidlerine proteolitik olarak ayrılmaktadır. Membran kolesterolünün tükenmesinin APP' nin sekretaz bölünmesini engellediğine dolayısıyla A β_{40} ve A β_{42} ' nin azaldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bununla birlikte dislipidemi, artan AH riski ile ilişkili olan vasküler hastalık riskini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalardan elde edilen son bulgular MikroRNA (miRNA)' ların doğrudan AH ile ilişkili olduğunu göstermektedir. miRNA profilinin düzensizliği, beyindeki amino asitlerin metabolizmasını durdurarak AH patogenizi için bir mekanizma olarak araştırılmaktadır. miR-153' ün insan nöronlarında APP ifadesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Düşük miR-153 seviyesi ise AH hastalarında artmış APP ekspresyonuna neden olmaktadır. miR-339- 5p' nin insan beyni kültürlerinde BACE1 ve A β ' yı negatif olarak düzenlemektedir. Retrospektif çalışmalar travmatik beyin hasarı (TBH) öyküsü olan kişilerin, bu tür yaralanma öyküsü olmayan bireylerden daha yüksek damans riskine sahip olduğunu göstermiştir. Ölüm sonrası yapılan deneysel çalışmalarda beyin hasarı sonrası, beyin omurilik sıvısı (BOS) seviyesi, A β birikimi, tau patolojisi ve APP üretimi artmaktadır. Sigara içmek, AH riskini birkaç mekanizma ile etkilemektedir. Sigara içmek serbest radikal oluşumunu arttırabilir, yüksek oksidatif strese neden olabilir veya inflamatuvar bağışıklık sistemini etkileyerek fagositlerin aktivasyonuna ve daha fazla oksidatif hasara yol açabilmektedir (Raffaitin, Gin et al. 2009, Solfrizzi, Scafato et al. 2010).

Kadınların erkeklere kıyasla AH' ye yakalanma risklerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bunun nedenleri, kadınların erkeklere oranla ortalama yaşam sürelerinin daha uzun olması ve erkeklerin andropoza girmesinden daha önce kadınlarda başlayan menapozla östrojen seviyesinin azalmasıdır. Vasküler demans ve TBH' de ise erkeklerdeki risk kadınlardan daha fazla olmasına rağmen diğer demans tiplerinde risk oranı aynıdır (Mayeux and Stern 2012, Reitz and Mayeux 2014).

2.1.5. Alzheimer Hastalığında Tedavi/Yönetim

AH' li hasta popülasyonunun artmasına rağmen, son 15 yılda geliştirilmekte olan çoğu terapötik madde başarısız olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' de AH'nin bilişsel semptomlarını tedavisi için şu anda yalnızca 5 tedavi seçeneği onaylanmıştır. Bunlardan en sonuncusu (Memantin) on yıldan daha uzun bir süre önce onaylanmıştır. Beş standart bakım uygulamasından dördü Avrupa Birliği' nde lisanslıdır; bunlar arasında üç Kolinesteraz inhibitörü (Donepezil, Galantamin ve Rivastigmin) ve bir N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti (Memantin) bulunmaktadır. 2014' te, Donepezil ve Memantin ile sabit doz kombinasyonundan oluşan beşinci bir tedavi seçeneği, stabil Donepezil tedavisi alan orta ve şiddetli AH hastalarının tedavisi için onaylanmıştır (Frozza, Lourenco et al. 2018, Cummings, Tong et al. 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 AH ilaç geliştirme ve kombinasyon tedavileri. (Cummings, Tong et al. 2019).

AH' deki yeni terapötik ajanlar için yapılan denemelerin çoğu, kolinesteraz inhibitörleri, memantin veya her ikisini alan hastalarda gerçekleştirilmektedir. AH'nin karmaşıklığı, patolojisinin çeşitliliği ve hastalığı oluşturan bileşenlerin dinamik etkileşim ağı, başarılı AH tedavisi için kombinasyon şeklinde birden fazla hedefe yönelik tedavinin gerekli olduğunu göstermektedir. Tedavi kombinasyonları farmakodinamik veya farmakokinetik olarak tanımlanabilmektedir. Farmakodinamik kombinasyonlar, hastalık biyolojisi üzerinde birçok etki göstermek üzere tasarlanmıştır; farmakokinetik kombinasyonlar ilacın emilimini, dağılımını, metabolizmasını ve eliminasyonunu etkilemektedir (Cummings, Tong et al. 2019).

2.2. ALZHEIMER HASTALIĞININ GENETİĞİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMASI

AH' nin genetiği karmaşık ve heterojendir. Vakaların çoğu ailesel nüks görülmediğinden “sporodik” dir. Bununla birlikte AH vakalarının küçük bir yüzdesi (tüm vakaların %1-2' si) 65 yaşından önce ortaya çıkan semptomlarla erken başlangıçlı AH (EOAD)' dır. EOAD, otozomal dominant bir hastalık olmasından dolayı kalıtsaldır; yani etkilenen bir ebeveynin çocukları EOAD gelişimi için %50 risk altındadır. EOAD' nin nedeni olarak üç gendeki patojenik mutasyonlar gösterilmektedir. APP, presenilin 1 geni (PSEN1) ve presenilin 2 geni (PSEN2). Ayrıca tau mRNA' sının işlenmesi ve tau proteininde meydana gelen değişikliklerde EOAD patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Rogaeva 2002, Rademakers, Cruts et al. 2003) (Tablo 2.2).

Tablo 2. 2. EOAD' nın patogenezinde rol oynayan genler (Khanahmadi, Farhud et al. 2015).

Gen	Protein	Yer	Mutasyonlar	Moleküler etkiler / patojenik alaka
APP	Amiloid β -protein öncüsü	21q21	32	A β üretiminde veya A β 42 / A β 40 oranında artış
PSEN1	Presenilin 1	14q24	182	A β 42 / A β 40 oranında artış
PSEN2	Presenilin 2	1q31	14	A β 42 / A β 40 oranında artış

Hastalığın en yaygın, geç başlangıçlı (LOAD) ve sporodik şekli için iyi bilinen genetik risk faktörü apolipoprotein E (ApoE)' nin ϵ 4 allelidir. Ayrıca orta yaştaki yüksek kan basıncı ve kolesterol düzeyleri, obezite, diyabet dahil birçok yaşam tarzına bağlı risk faktörü bildirilmektedir. Bu dört AH geninin, EOAD ve LOAD' daki genetik varyansın %30' dan azını oluşturduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca hücre ölümü, hücre sağ kalımı, ekstrasellular matriks bileşenleri ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli proteinleri kodlayan farklı genlerde veya onların protein ürünlerinde işlevsel olarak meydana gelebilecek farklılıklarında AH gelişiminde birer risk faktörü olduğu belirtilmektedir (Guerreiro, Gustafson et al. 2012, Khanahmadi, Farhud et al. 2015) (Tablo 2.3).

Tablo 2. 3. Alzheimer Hastalığı patogeneğinde direkt veya risk faktörü olarak etkili olan 20 önemli gen (Khanahmadi, Farhud et al. 2015).

Gen'in sembolü	Kodladığı Protein	Kategori	Gen Numarası (ID)
APP	Amiloid beta (A4) öncü protein	Protein kodlaması	GC21M027252
COL25A1	Kolajen, XXV, alfa 1 yazın	Protein kodlaması	GC04M109731
BPTF	Bromodomain PHD parmak transkripsiyon faktörü	Protein kodlaması	GC17P065821
PSEN1	Presenilin 1	Protein kodlaması	GC14P073603
PSEN2	Presenilin 2	Protein kodlaması	GC01P227058
CLSTN1	Calsyntenin 1	Protein kodlaması	GC01M009789
APOE	Apolipoprotein E	Protein kodlaması	GC19P045408
GSK3B	Glikojen sentaz kinaz 3 beta	Protein kodlaması	GC03M119540
SOHBET	Kolin O-asetiltransferaz	Protein kodlaması	GC10P050817
APBB1	Amiloid beta (A4) prekürsör protein bağlanması, aile B, üye 1 (Fe65)	Protein kodlaması	GC11M006414
PSENEN	Presenilin arttırıcı gama sekretaz alt birimi	Protein kodlaması	GC19P036236
LRP1	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein 1	Protein kodlaması	GC12P057497
NCSTN	Nikastrin	Protein kodlaması	GC01P160313
CDK5R1	Sikline bağımlı kinaz 5, düzenleyici alt birim 1 (p35)	Protein kodlaması	GC17P030813
GSK3A	Glikojen synthasekinase 3 alfa	Protein kodlaması	GC19M042734
CASP3	Kaspaz 3, apoptozla ilişkili sistein peptidaz	Protein kodlaması	GC04M185548
APBA1	Amiloid beta (A4) prekürsör protein bağlanması, aile A, üye 1	Protein kodlaması	GC09M072042
APBA2	Amiloid beta (A4) prekürsör protein bağlanması, aile A, üye 2	Protein kodlaması	GC15P029213
CASP2	Kaspaz 2, apoptozla ilişkili sistein peptidaz	Protein kodlaması	GC07P142985
MAPT	Mikrotübüle bağlı protein tau	Protein kodlaması	GC17P043971

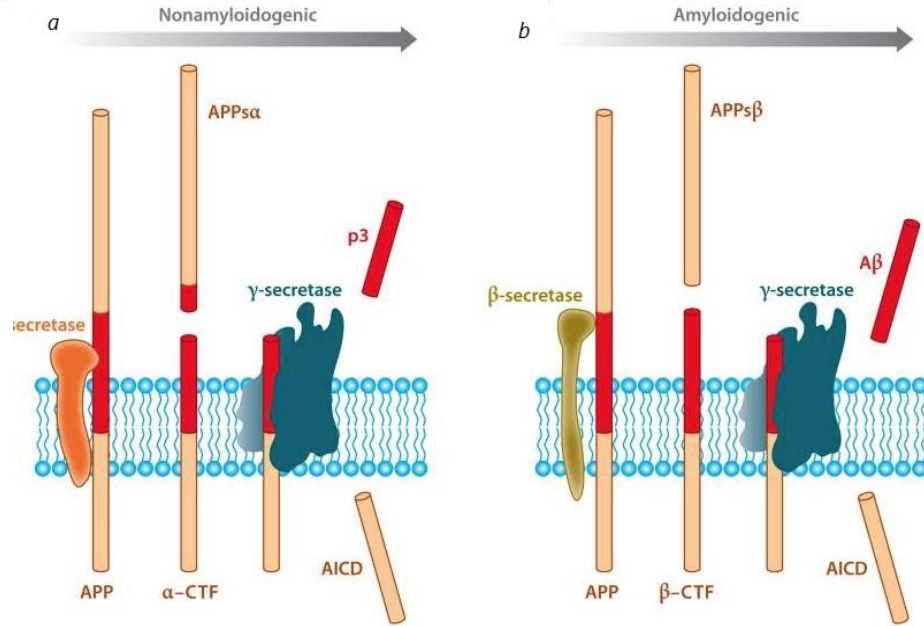
2.2.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığının Genetiği

2.2.1.1. Amiloid Prekürsör Proteini (APP)

Amiloid prekürsör (öncül) protein (Amyloid Precursor Protein, APP), memelilerdeki amiloid prekürsör benzeri proteinleri (APLP1 ve APLP2) ve *Drosophila melanogaster*'deki amiloid prekürsör protein benzeri (APPL) içeren ilgili protein ailesinin bir üyesidir. Hepsi büyük hücre dışı alanlara sahip tek geçişli (tip I) transmembran proteinlerdir ve APP'ye benzer bir şekilde işlenirler. Yalnızca APP, A β bölgesinde sekans ayrışması nedeniyle bir amiloidojenik fragman üretir. APP, ilk olarak 1987 de tanımlanmış olup insanda 21. kromozom üzerinde bulunan *APP* geni tarafından kodlanmaktadır. *APP* geninin 19 ekzon içerdiği ve 170 kb'dan daha geniş olduğu tespit edilmiştir. 1-13, 13a ve 14-18 ekzonlarının alternatif eklenmesiyle değişken amino asit uzunluğunda 8-11 *APP* protein izoformları (305, 639,677, 695, 696, 714, 733, 746, 751, 752, 770) üretilmiştir. Bu transkriptler arasında en baskın olanları ise *APP695* (695 amino asit formu), *APP751* (751 amino asit formu) ve *APP770* (770 amino asit formu)'dir. *APP751* ve *770* glial hücrelerde eksprese edilirken *APP695* nöronlarda eksprese edilmektedir (Haass, Kaether et al. 2012, Wilkins and Swerdlow 2017). *APP* nöronlarda büyük miktarlarda üretilir ve çok hızlı bir şekilde metabolize edilir. Endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenir ve daha sonra Golgi aygıtı boyunca TGN'ye taşınır. Buradan da önce aksonlara gönderilir sonrasında da hızlı aksonal taşıma ile sinaptik terminallere iletilmektedir (Haass, Kaether et al. 2012).

APP, bir hücre yüzeyi reseptörü olarak işlev görür ve nörit büyümesi, nöronal yapışma ve aksonojenezle ilgili nöronların yüzeyinde fizyolojik fonksiyonlar gerçekleştirir. Protein-protein etkileşimleri yoluyla hücre hareketliliği ve transkripsiyon düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Hücrelere geçici *APP* geni içeren vektör aktarımı deneyleri sonucunda hücre canlılığı ve bölünmesinde protein işlenmesi ile ilişkili olarak hücre sağkalımı, akson ve dentrit gelişimi ile hücre büyümesi üzerinde teşvik edici etkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *APP*'nin RNA aracılı susturulmasının embriyonik sıçanlarda nöronal göç üzerinde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (O'Brien and Wong 2011, Šerý, Povová et al. 2013, Sadigh-Eteghad, Sabermarouf et al. 2015).

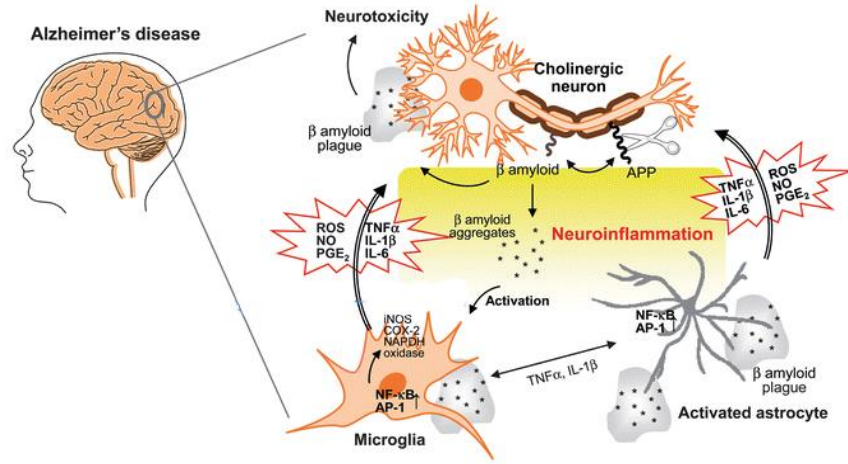
APP' nin görevlerini yerini getirebilmesi için proteolitik olarak işlenmesi önemlidir. APP, üzerindeki farklı bölünme bölgelerinde, farklı proteazlarla post-translasyonel proteolitik işleme tabi tutularak farklı biyolojik fonksiyonlara sahip birkaç peptide ayrılmaktadır (Şekil 2.4). Normal şartlarda hücre membranında lokalize olan APP' yi sırasıyla Alfa bölgesinden kesen enzim (α sekretaz), Beta bölgesinden kesen enzim (β sekretaz, β -site APP-klevaj enzimi 1) ve Gama bölgesinden kesen enzim (γ sekretaz) adlandırılmaktadır. APP' nin α sekretaz ve γ sekretaz tarafından ard arda proteolitik kesiliminin yapıldığı amiloidojenik olmayan yolak sonucunda APP' nin suda çözülebilen ürünleri olan ekstrasellüler Salgılanan APP-alfa (sAPP α), p3 (3 kDa peptid), APP intrasellüler domain (AICD) ve Alfa-C-ucu fragmenti (α -CTF) peptidlerini oluşturmaktadır. Bununla birlikte Beta bölgesinden APP' yi kesen enzim (β sekretaz veya BACE) aktivitesinin, γ sekretaz aktivitesi tarafından takip edildiği amiloidojenik proteolitik işlemde suda çözülebilen ürünler olan Salgılanan APP-beta (sAPP β) ve AICD dışında, suda çözünmeyen 39-43 amino asit uzunluğunda β -amiloid (A β) peptidleri oluşmaktadır (Zhang, Thompson et al. 2011, Wilkins and Swerdlow 2017).



Şekil 2. 4. APP' nin sıralı bölünmesi iki yolla gerçekleşir. (a) α -sekretaz içeren APP-amiloidojenik olmayan işleme ve ardından γ -sekretaz gösterilmektedir. (b) β -sekretaz (BACE1) ve ardından γ -sekretaz içeren APP' nin amiloidojenik işlemi gösterilmektedir. Her iki işlem de çözüner ektodomainler (sAPP α ve sAPP β) ve C-terminal fragmentleri (AICD) üretir (O'Brien and Wong 2011).

APP' nin C-terminal kuyruğundaki YENPTY alanı transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev görmektedir (Şekil 2.5). Bu alan tüm APP formlarında %100 korunmuştur. Bu bölgedeki mutasyon APP' nin endositozunu değiştirir ve amiloidojenik APP işlenmesini inhibe ederek A β üretimini azaltmaktadır. Thr668' in YENPTY bölgesinden uzakta, CDK5 ile fosforilasyonu, bu bölgenin mutasyona uğramamasına rağmen, YENPTY' nin protein-protein etkileşimlerinin en azından bazılarında müdahale ederek beyinde A β birikimini değiştirmektedir (Sano, Nakaya et al. 2006). APP' nin YENPTY alanı ile etkileşime giren proteinin üzerinde bir fosfotirozin bağlama alanının varlığı gerekmektedir. En iyi karakterize edilen iki APP bağlanma ortağı X11 ve Fe65' tir. Hem X11 hem de Fe65 beyinde yüksek oranda ifade edilir ve tüm APP' lerle etkileşime girmektedir (Feng and Zhang 2009). Doku kültürü çalışmaları, her iki bağlayıcı ortağın Trans-Golgi ağında (TGN) bulunan APP' yi SorLA/LR11' e bağladığını ve APP' nin BACE1 ile etkileşime girmesini önlediğini göstermiştir. Heterozigot X11 veya Fe65 nakavt fareler ile APP' yi aşırı eksprese eden fareler çaprazlandığında, beyinde A β birikimi önemli ölçüde artmaktadır. Ayrıca Fe65, AH ile ilgili yapılan çalışmalarda oldukça önemlidir. Fe65' in transkripsiyonu düzenlemek için APP' nin C-terminal bölgesi ile uyum içinde hareket ettiği düşünülüyordu ancak yapılan çalışmalarda Fe65' in bağımsız bir rolünün olduğu ve APP' nin Fe65' i çekirdekten uzak tutmak için bir kenetlenme istasyonu görevi görebileceği öne sürülmektedir (O'Brien and Wong 2011, Wilkins and Swerdlow 2017). APP ektodomaininin ölüm reseptörü (DR6) için bir ligand olarak davrandığı ve büyüme faktörü yoksunluğunda, APP' nin BACE1 tarafından bölünmesini tetiklediği bildirilmiştir. Buna göre DR6' ya bağlanan kaspaz 3 ve 6' yı aktive ederek sırasıyla aksonal ve hücre gövdesi apoptotik dejenerasyonuna neden olan ektodomain serbest bırakılmaktadır. APP' nin bölünmesini sağlayan büyüme faktörü yoksunluğu, nöronal dejenerasyonda birincil faktör olabilmektedir (O'Brien and Wong 2011).

nöronal hasara yol açarak nöron homeostazını değiştirmektedir (Thameem Dheen, Kaur et al. 2007, Glass, Saijo et al. 2010). Bu durumda tau hiperfosforilasyonu kaynaklı tau birikimini tetiklemektedir. Ayrıca tau birikimi ya da A β birikimi olan nöronlardan intrasellüler alana geçen ROS' da mikroglyal hücreler ve astrositler tarafından algılanmakta ve aktive olmalarına neden olmaktadır. Bu durumda sürekli pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezi döngüsüne neden olmaktadır. Ayrıca intersellüler alandan temizlenemeyen A β peptidleri BBB' den geçip kan akış hızını azaltarak serebral amiloid anjiyopatiye neden olmaktadır. Üretilen pro-inflamatuvar sitokinler ve A β peptidleri BBB' den beyine geçerek yada RAGE (İleri glikozilasyon son ürün reseptörleri) aracılığıyla beyindeki ROS seviyesini ve sinyal yollarını değiştirerek nöroinflamasyonun tetiklenmesine sonuç olarak da nöronal kayba neden olmaktadır (Pan, Lai et al. 2010, Wang, Tan et al. 2015, Wilkins and Swerdlow 2017) (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. AH' de nöroinflamasyonun şematize edilmesi (Pan, Lai et al. 2010).

2.2.1.3. APP' nin İşlenmesi

α sekratez ile APP işlenmesi, A β peptidlerinin üretimini önlemektedir. sAPP α nöral sağkalımda (plastisite) önemli bir role sahiptir ve eksitotoksisiteye karşı koruyucudur. Ayrıca nöral kök hücre proliferasyonunu da düzenler ve erken MSS gelişimi için önemlidir. α sekratez, tip I transmembran proteini olan bir çinko metaloproteinaz'dır. α sekratez etkinliğine sahip protein ailesi, ADAM9, ADAM10 ve ADAM17' yi içermektedir (Kuhn, Wang et al. 2010). Yapıcı α sekratez ADAM10' dur. ADAM10 aktivitesinin bozulmasının, çözünür olmayan amiloidojenik olmayan APP seviyesini

azalttığı, ADAM10 aktivitesinin sürdürülmesinin, AH' da α sekretaz yolu ile APP' nin işlenmesi için koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir. ADAM10' un biyolojik olarak önemli substratları epidermal büyüme faktörü (EGF), Notch (embriyonik gelişimde önemli) ve APP' i içerir. ADAM10 geninde LOAD için potansiyel olarak patojenik iki mutasyon tanımlanmıştır. ADAM10' un, kolesterolün (apolipoprotein E' nin etkisi) APP metabolizması üzerindeki etkisine aracılık eden bir sekretaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Moss, Bomar et al. 2007). Çeşitli periferik ve nöral insan hücre çizgilerinin bir kolesterolü özütleme maddesi veya bir HMG-CoA redüktaz (HMGCR) inhibitörü ile tedavisi, salgılanmış alfa-sekretazla ayrılan çözülebilir APP peptidlerinin sert bir şekilde artmasına neden olmaktadır. Kolesterol azalmasının, amiloidojenik olmayan alfa sekretaz yolunu ve nöroprotektif alfa sekretaz bölünmüş çözünebilir APP oluşumunu birkaç mekanizma ile desteklediği gösterilmiştir (Šerý, Povová et al. 2013).

APP' nin işlenmesinde yer alan bir diğer proteolitik enzim β sekretaz 1 (BACE1)' dir. β -sekretaz, terminaline yakın karakteristik tip I transmembran alanı ile zara bağlı bir aspartil proteazıdır. BACE geni, kromozom 11 üzerinde bulunur ve 501 amino asitlik bir protein kodlayan 9 eksondan oluşmaktadır. β sekretaz' ın pre-mRNA' sı, ekson 3 ve 4' te alternatif eklenmeye tabi tutulabilir; bu da 501, 476, 457 ve 432 amino asitli 4 alternatif varyantın üretilmesine neden olmaktadır (Mowrer and Wolfe 2008). Pro-BACE1 olarak adlandırılan BACE1' in öncüsü fosforilasyon, glikozilasyon ile modifiye edilir ve daha sonra olgun BACE1' i üretmek için furin benzeri bir endoproteaz ile bölünmektedir. Endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra, BACE1 salgılayıcı yoldan endozomal bölmelere sonrasında da plazma membranına taşınmaktadır. β sekretaz' ın optimum aktivitesi için asidik ortam gerekmektedir bu yüzden en uygun koşullar endozomlar tarafından sağlanmaktadır (Rajendran, Honsho et al. 2006).

B sekretaz ekspresyonu yaşa bağlı olarak artmaktadır ve özellikle AH hastalarının beyin korteksinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Bu artışı açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. BACE metabolizmasında, BACE hücre içi sıralamayı kontrol eden GGA' nın kaspaz degradasyonu veya BACE mRNA translasyonunun kontrolünün kaybı nedeniyle BACE ekspresyonunun yaşa bağlı artışını açıklayan mekanizmalar olarak

öne sürülmektedir (Hunt and Turner 2009). Ayrıca oksidatif stress ve hipoksi, iskemi ve enerji yoksunluğu diğer koşulların da hücrel modellerde BACE1 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur (Guglielmotto, Aragno et al. 2009).

α - ve β -sekretaz ayrılmasından sonra, α -CTF ve β -CTF olarak tanımlanan APP'nin karboksil terminal fragmanları (CTF' ler) membranla ilişkili kalır ve γ sekretaz ile daha da küçük parçalara ayrılmaktadır. α -CTF γ sekretaz tarafından işlevi henüz tanımlanmamış olan p83 peptidine işlenirken β -CTF A β 40 ve A β 42' ye bölünmektedir. APP' nin CTF' larının birikimi, cAMP' in hidrolizini tetikleyerek, cAMP/PKA/CREB yolağının bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca APP' nin subsellüler lokalizasyonunu ve Rab₁₁' in dağılımını değiştirip, LDL' nin endositoz ve soma-akson transsitozunu azaltarak aksonal vesikül kaçakçılığını etkilemektedir. Bu bulgular CTF birikiminin nöronal bozulmaya neden olduğu fikrini desteklemektedir. γ sekretaz, başlıca dört proteinden oluşan büyük bir kompleksdir: presenilin (PSEN, PSEN1 veya PSEN2), nicastrin, APH-1 (Ön Frekans Defektif-1) ve presenilin arttırıcı-2 (PSENEN-2). γ sekretaz kompleksi endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve trans-Golgi ağında bulunmaktadır (Šerý, Povová et al. 2013, Sadigh-Eteghad, Sabermarouf et al. 2015, Kametani and Hasegawa 2018).

2.2.1.4. PSEN Mutasyonları

İnsanda, presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genleri çok benzer bir genetik yapıya (%67 amino asit benzerliği) sahiptir. Serebellum ve hipokampüste daha yüksek seviyelerde olmakla birlikte çok sayıda dokuda eksprese edilmektedirler. Hidrofobiklik grafikleri, integral membran proteinleri olduğunu göstermektedir. Multimerik γ sekretaz kompleksinin önemli bileşenleridir. Çoğunlukla endoplazmik retikulum ve Golgi bölmelerinde bulunurlar. PSEN' lerdeki 1000' den fazla nokta mutasyonun çoğu EOAD sorumludur (Guerreiro, Gustafson et al. 2012).

EOAD' ye sebep olan üç genden PSEN1, otozomal dominant kalıtılan nörodejeneratif bir hastalık olan AH, Notch sinyal yolağı düzenlenmesi, hücre içi A β oluşumu ile karakterizedir ve diğer iki gene (APP ve PSEN2) göre hastalığın ortaya çıkmasında en

yüksek riske sahiptir. EOAD vakalarının % 18-50' sinde PSEN1 mutasyonu bulunmaktadır. AH' da gözlemlenen PSEN1 ile ilgili en az 185 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Otozomal dominant EOAD' ye sebep olan PSEN1 mutasyonları tek başına hastalık sebebi değildir. Başlangıç yaşındaki farklılıklar hastalığın gelişimini ve şiddetini değiştirmektedir.

PSEN1, 14. kromozom üzerinde yer alır, 12 eksondan oluşup, 467 amino asitlik bir serpantin proteindir ve en az iki izoformu vardır. PSEN1, γ sekretaz kompleksinin katalitik aktivitesinden sorumlu olduğundan PSEN1' deki AH ile ilişkili mutasyonlar γ sekretaz aktivitesini azaltarak A β 40 üretiminin azalmasına yol açmaktadır. Ancak A β 42 üretimi artar ve A β plaklar oluşur. A β 42 birikimi hastalığın erken dönemlerini yansıtan bir olaydır. Aynı zamanda γ sekretaz ile bölünmesi gereken APP C-terminal fragmanları ayrılmaz ve hücre zarında birikerek nörotoksisiteye sebep olmaktadır. Bu durumda hem EOAD hem de LOAD gelişmesini kolaylaştırmaktadır.

1. kromozom üzerinde bulunan, PSEN1 lokusu ile yüksek homoloji gösteren bu gen PSEN1' den sonra bulunduğu için PSEN2 adını almıştır. 12 eksondan oluşup, 448 amino asit içeren bir serpantin proteindir. Yapısal olarak PSEN2, PSEN1' e benzer ancak mutasyonlar PSEN1 ile karşılaştırıldığında farklı kodonlarda meydana gelmektedir. Çeşitli populasyonlarda yapılan çalışmalara göre, PSEN2 lokusundaki mutasyonlar LOAD ile sonuçlanmaktadır, nadiren EOAD' ye sebep olduğu bulunmuştur. APP ve PSEN1 mutasyonları ile karşılaştırıldığında hastalık yavaş ilerlemektedir. PSEN2 mutasyonuna sahip ailelerde hastalığın başlama yaşı 45-88' dir ve PSEN1 mutasyonu taşıyan ailelere oranla daha yüksektir. PSEN2 mutasyonu taşıyan aynı ailede ki farklı bireyler arasında hastalığın başlangıç yaşı çok farklılık göstermektedir. Bunun tam tersine PSEN1 mutasyonu taşıyan aynı aile bireylerinde başlangıç yaşı oldukça benzerdir. PSEN2 genindeki mutasyonlar, PSEN1 genine göre düşük penetransa sahip olup meydana getirdiği klinik tabloda değişken olabilmektedir. PSEN2, A β kesiminden sorumludur. PSEN2 mutasyonları A β 40 ve A β 42 oranlarını arttırmaktadır. Ayrıca mutant PSEN2, ekstrasellüler sinyalleri düzenleyen kinazlara bağlanıp Reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığı ile β sekretaz aktivitesini arttırmaktadır (Khanahmadi, Farhud et al. 2015).

2.2.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığının Genetiği

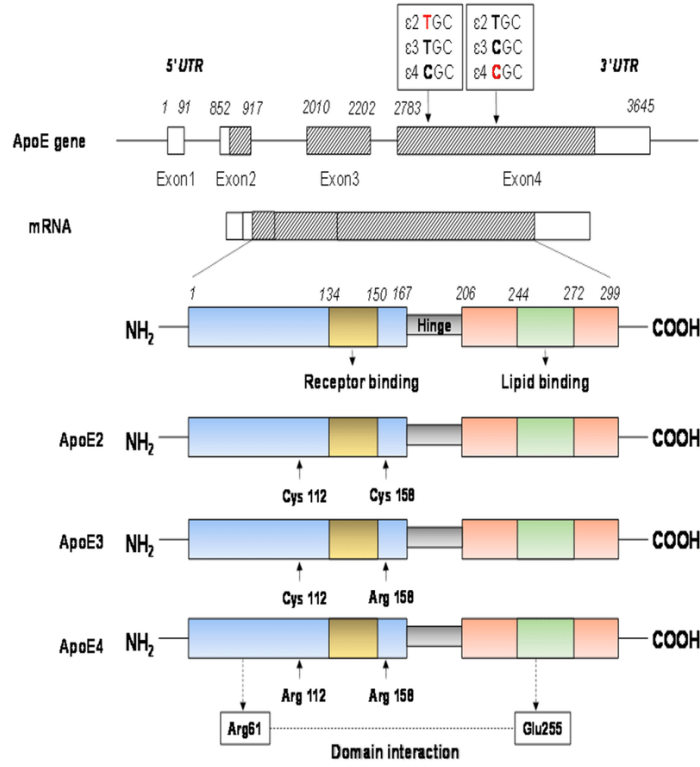
LOAD genetiği, EOAD' a göre çok daha komplekstir. LOAD' a sebep olduğu düşünülen pek çok gen, bu genlerin birbirleriyle ve çevresel faktörler ile etkileşimi bu hastalığın etiyojisini belirlemektedir. LOAD vakalarının çoğu sporodik olup, ailesel geçiş göstermez. Çok farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda ortak olarak bulunan, LOAD' da risk faktörü olarak tanımlanan APOE genidir.

2.2.2.1. Apolipoprotein E (APOE), TREM₂

Kandaki lipoproteinlerde bulunan APOE, yüksek trigliserit içerikli lipoproteinlerin katabolizmasından sorumludur. APOE geni, primer olarak karaciğerde, beyinde (öncelikle nöronlar ve astrositler tarafından) ayrıca makrofajlar ve monositler gibi hücreler tarafından sentezlenen glikoproteini kodlamaktadır. Kolesterol metabolizmasında aracı molekül olarak görevlidir. APOE lipoprotein kompleksinde ki iki anahtar lipoproteinlerden birisi olup, lipoliz ve lipid transferi ile bağlantılı proteinler APOE reseptörleri aracılığı ile bir dokudan diğerine ya da bir hücreden diğer hücelere taşınarak lipid metabolizmasını düzenlemektedir. Merkezi sinir sisteminde (MSS), astrositler ve mikrogial hücreler tarafından üretilen ve salgılanan APOE, lipoproteine bağlanır ve MSS' nin gelişim safhası ve nöronal hasardan sonra ki onarım periyodu sırasında APOE reseptörü vasıtasıyla sinir hücrelerine alınmaktadır. APOE proteini AH beyinlerinde senil plaklarda bulunur ve A β peptidine bağlanabilme özelliği göstermektedir. Glial hücre yüzeyindeki düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein 1 (LRP1)' in mutasyonu ve allel farklılıkları AH gelişimi için önemlidir. Ayrıca yeni bulgular APOE' nin A β ' den bağımsız olarak lipid metabolizması, tau patolojisi, nöroenerjistik, nörogelişim, sinaptik plastisite, nörovaskülerite ve nöroinflamasyon ile ilişkili olarak AH' da önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Guerreiro, Gustafson et al. 2012, Raskin, Cummings et al. 2015).

APOE geni 19. kromozom üzerinde bulunup, 4 ekson ve 3 introndan oluşmaktadır. APOE proteini 299 amino asitlik uzunluğa sahiptir. Ekson 4' te 2 tek nükleotid polimorfizmi (T2060C ve C2198T) ile ortaya çıkan üç APOE alleli (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) tanımlanmıştır (Şekil 2.7). Bu alleller üç farklı proteine (E2, E3, E4) kodlanmaktadır. APOE3 en sık bulunan

izoformudur. 112. ve 158. pozisyonların da sırası ile sistein ve arjinin amino asitleri içerirken, APOE2 yalnızca sistein, APOE4’ te yalnızca arjinin amino asiti içermektedir. APOE ε3 alleli tüm populasyonun %78’ inde bulunmasına karşılık APOE ε4 populasyonun %15’ inde, APOE ε2 ise %7’ inde bulunmaktadır (Khanahmadi, Farhud et al. 2015, Wu and Zhao 2016). APOE ε4 alleli sıklığı farklı etnik gruplar arasında değişkenlik göstermektedir. Down sendromu, kafa travmaları, felç hem insanda hem de transgenik farede APOE ε4 ekspresyonunu arttırmaktadır.

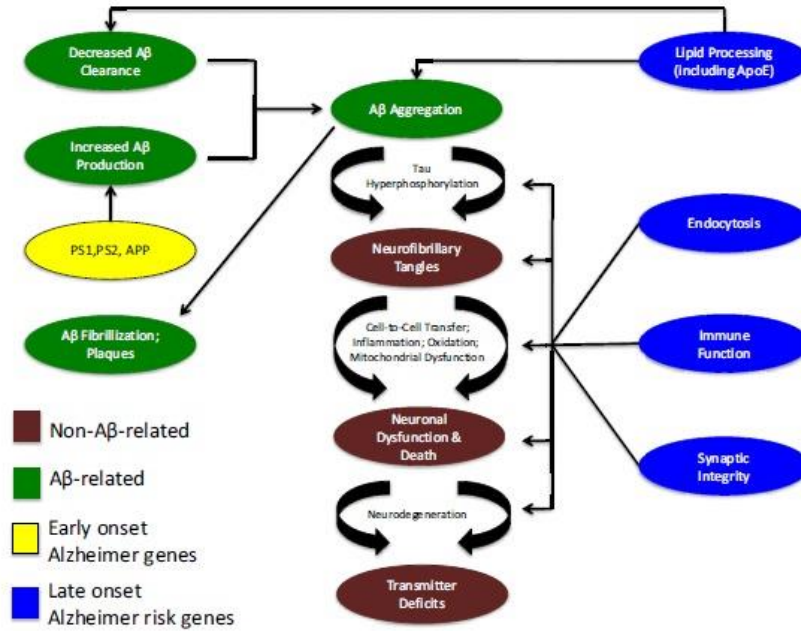


Şekil 2. 7 Apolipoprotein E’ nin alt izoformları (Wu and Zhao 2016).

APOE ϵ 4 allelinin LOAD için risk faktörü olduğu yapılan çalışmalarla doğrulanmış, farklı populasyonlarda EOAD ile de bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. İn vitro çalışmalarda belirlenen kontroller ile LOAD kıyaslandığında APOE' nin A β ' ya yüksek afinite ile bağlandığı ve LOAD' da APOE ϵ 4 allelinin genetik risk faktörü frekansını arttırdığını ortaya koymaktadır. Tek ϵ 4 alleli taşıyan kişilerde hastalık riski 2-4 kat, iki ϵ 4 alleli taşıyan kişilerde ise ortalama 12 kat artmaktadır. Aynı zamanda APOE ϵ 4 allelini taşıyan kişilerin, taşımayanlara göre yaklaşık 10-20 yıl önce bu hastalığa yakalandıkları görülmüştür. ϵ 4 allelini taşıyan ailelerde aynı anda APP ve PSEN1 mutasyonları da varsa demansın başlama yaşının daha da erken olduğu tesbit edilmiştir. APOE ϵ 2 alleli taşıyan bireylerde, APOE ϵ 4' ün tam tersine LOAD gelişme riski azalmaktadır. Çünkü APOE2 hidrofobik A β peptidlerine bağlanarak onları glial hücrelerin yüzeyindeki Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ilişkili reseptörler ve koreseptörler tarafından tanınarak endositozla hücre içine alınır ve bu şekilde intersellüler alanın A β 42' den temizlenmesine yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte ϵ 4 alleli diğer allelerden daha fazla A β agregasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca APOE ϵ 4' ün tau patolojisi bağlamında A β ve A β agregasyonundan bağımsız olarak nörodejenerasyonu etkilemektedir. APOE ϵ 4 geni, AH' ni (Kametani and Hasegawa 2018)n ortaya çıkmasında tek başına yeterli bir faktör olmadığı için hastalığın teşhisinde APOE polimorfizmleri tanı kriteri olarak kullanılmaktadır.

APOE' ye ek olarak, lipid işlemeyle ilişkili risk genleri arasında ABCA7, Clusterin (CLU) ve Sortilin ile ilgili reseptör L (SORL 1) bulunmaktadır. ABCA7, bir Adenozin Trifosfat (ATP)' ı bağlayan taşıyıcıyı kodlayarak hücre zarları boyunca substrat taşınması, APP işlenmesinin düzenlenmesi ve A β oluşumunun inhibisyonunda rol oynamaktadır. A β ' yı ters yönde ve spesifik olarak bağlayarak moleküler bir şaperon gibi davranan büyük bir beyin apolipoproteini olan CLU, A β birikimini, konformasyonunu ve toksisitesini etkilemektedir. SORL 1 ise hücre yüzeyinden Golgi-endoplazmik retikulumu kadar vezikül trafiğine katılmaktadır. APP' yi geri dönüşüm için endositik yollara yönderir ve A β oluşumda önemli rol oynamaktadır.

Mikroglia, makrofajlar, osteoklastlar ve olgunlaşmamış dendritik hücrelerin hücre yüzeyinde eksprese edilen doğal bir immün reseptör (immün yanıtların aktivasyonunu tetikleyen) olan TREM₂, AH patolojisinde önemlidir. TREM₂, APOE, fosfolipid ve apoptotik hücreleri içeren lipoproteinleri tanır ve mikroglial fagositoza neden olmaktadır. TREM₂ genindeki varyantlar AH riskini arttırmaktadır. Başlangıçta, bunun A β plaklarının ortadan kaldırılmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür ancak saf taupati ayarında TREM₂ eksikliği, gliozis, nöroinflamasyon ve beyin atrofisine karşı koruma sağlamanın yanı sıra tau patolojisine ve/veya tau aracılı hasara karşı mikroglial bir tepkiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar APOE içermeyen farelerde çarpıcı şekilde azalmış inflamasyon ve nörodejenerasyon bulguları ile de tutarlıdır. Bu nedenle TREM₂-APOE yolu, beyindeki hasara karşı mikroglial tepkinin kolaylaştırılması için önemlidir ve aktivasyonunun işlevsel bir sonucu, mikroglia' nın beyin hemeostazisini düzenleme yeteneğini kaybetmesidir. Mikroglial inflamasyon, A β ' dan bağımsız olarak tau' ya bağlı dejenerasyonu desteklemektedir (Raskin, Cummings et al. 2015, Kametani and Hasegawa 2018) (Şekil 2.8).

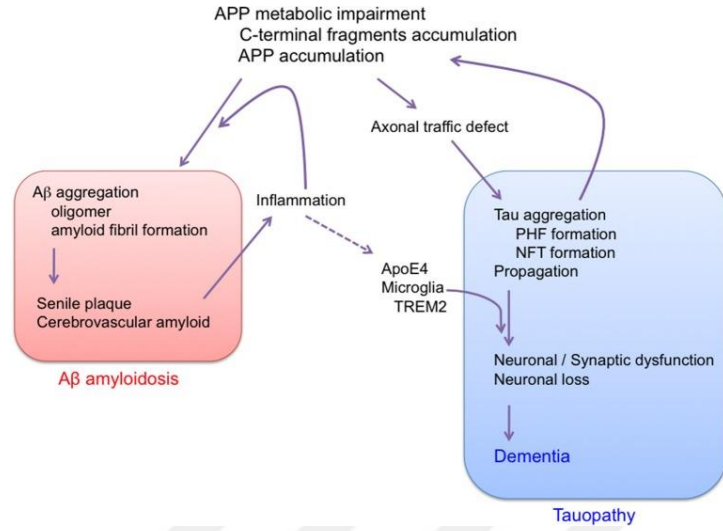


Şekil 2. 8 AH' nin genetik ve patolojik sebeplerinin şematize edilmesi(Raskin, Cummings et al. 2015).

2.2.3. APP Tetikleyici Taupati

APP hızla ve kolayca metabolize olan bir proteindir. Bu nedenle APP metabolizmasının bozulmasının hücreler üzerinde ciddi bir etkisi vardır. APP hücre içi taşınımı yönlendirmek için motora özgü bir şekilde hareketliliği modüle etmektedir. Artmış APP ve/veya CTF, aksonal ve sinaptik kusurları indükler böylece yanlış tau lokalizasyonu tetiklenir. Yanlış lokalize olan tau proteinleri birikerek agregatlar oluşturmaktadır. Biriken patolojik tau, daha fazla nakil işlev bozukluğunu indükler dolayısıyla kısır bir döngü oluşturarak aşırı tau birikimine yol açmaktadır. Sonuç olarak APP' nin aşırı ekspresyonu hücre içi tau birikimini desteklediğinden, APP' nin anormal tau fibrillerin bir reseptörü olarak işlev görebileceği ileri sürülmektedir. Bu nedenle APP artışı, patolojik tau çoğalmasını ve birleşmesini hızlandırmaktadır.

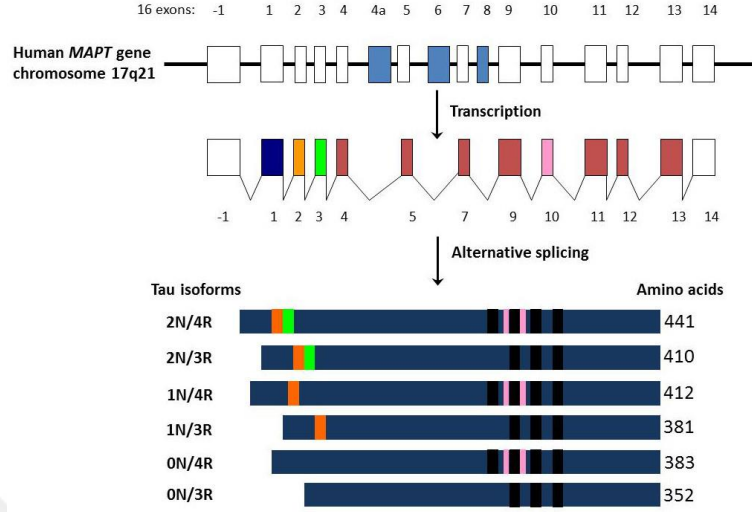
Genel olarak AH, APP metabolizma bozukluğu ile tetiklenen bir hastalık olarak gösterilmektedir. APP metabolik bozukluğuna bağlı A β birikiminin, tau patolojisini daha da etkileyebilen nöroinflamasyona yol açtığı iyi bilinmektedir. Şimdiye kadar, A β ' nin tau patolojisini doğrudan etkilediğine dair kanıt olmamakla birlikte LOAD' nın APP metabolik bozukluğunun ve tau patolojisinin bağımsız olarak başlama olasılığı gözardı edilmemektedir. Her durumda, AH' nin ilerlemesine neden olan ana faktörün A β birikimi ve tau patolojisinin bağımsız patolojik olaylar olarak kabul edilmesi gerektiğine dair ikna edici kanıtlar vardır (Şekil 2.9). Son zamanlarda AH risk faktörleri APOE4 ve TREM2' nin tau patolojisine bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca primer yaşa bağlı taupatisi (PART) olan hastaların beyinleri incelendiğinde, A β plaklarının yokluğunda AH' dan ayırt edilemeyen NFT' leri içermektedir. Bu nedenle tau, AH' li hastalarda bilişsel ve metabolic değişikliklere katkıda bulunabilmektedir. AH' nin tedavisinde, A β ' yı hedefleyen ilaçların tüm denemelerinin başarısızlıkları, AH' nin ilerlemesine neden olan ana faktörün tau proteini olduğunu göstermektedir. Gerçekten de tau' nun baskılanmasının veya silinmesinin, beyin hasarına ve nörolojik eksikliklere karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, patolojik tau üretiminin baskılanması, AH terapötik ilaçlarının gelişimi için hedef olarak görünmektedir (Kametani and Hasegawa 2018).



Şekil 2. 9 AH patolojisinin şematize olarak gösterilmesi (Kametani and Hasegawa 2018).

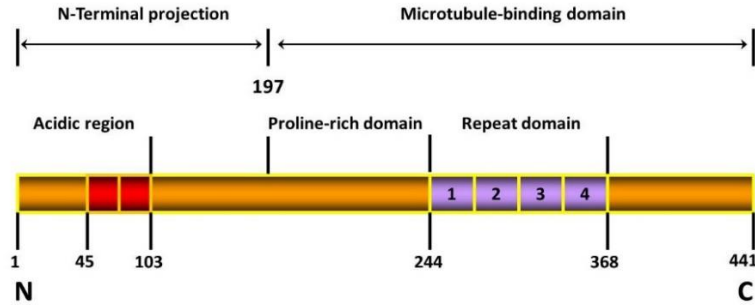
2.2.4. MAPT Geni ve Tau Proteinini

Mikrotübül ilişkili (asosiye) proteinler (MAP), hücre iskeletinin elemanlarından biri olan mikrotübüllerin yapısal ve işlevsel olarak düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. MAP' ların en önemli çeşitleri MAP-2 ve tau proteinleridir. Bunlar yapısal olarak farklılıklar göstermektedir. MAP-2 geniş yapısı nedeniyle, içi boş silindirik yapılar olan mikrotübüllerin yanyana dizilmesini sağlamaktadır. Tau proteini ise N-terminal domainlerinin daha kısa olması nedeniyle mikrotübüllerin akson boyunca sıkı bir şekilde demetlenmesinde rol oynamaktadır. Tau proteini, yetişkin insan beyninde 352-441 amino asit arasında değişen altı tau protein izoformu üretmek için ökaryotik organizmalarda gen ifadesinde çeşitliliği arttıran bir post-transkripsiyonel modifikasyon olan alternatif RNA ekson eklenmesi (alternative spliced) ile ekson 2,3 ve 10' a eklenmiş 16 eksondan oluşan 17q21.31(1) kromozomu üzerindeki *MAPT* geni tarafından kodlanmaktadır (Luna-Muñoz, Harrington et al. 2013, Wang and Mandelkow 2016, Wu, Piña-Crespo et al. 2017) (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10 MAPT geni ve tau mRNA' sının alternatif eklenme ürünleri. Ekson 2,3-10' un alternatif eklenmesiyle tau proteininin MSS' de yaygın olarak bulunan 6 izoformunu oluşturmaktadır. Tau izoformları, amino (N-terminal) ucu (0N, 1N ve 2N) ve mikrotübül bağlanma domaini (MTD) tekrar dizilerine (3R ve 4R) göre adlandırılmaktadır (Luna-Muñoz, Harrington et al. 2013).

İnsan tau proteini yapısal olarak dört bölgeden oluşmaktadır. N-terminal (amino ucu) bölgesi (0N, 1N ve 2N), prolin bakımından zengin bölge (PRD), tekrar dizileri (3R ve 4R) ve C-terminal (karboksi ucu) bölgesidir (Luna-Muñoz, Harrington et al. 2013) (Şekil 2.11).

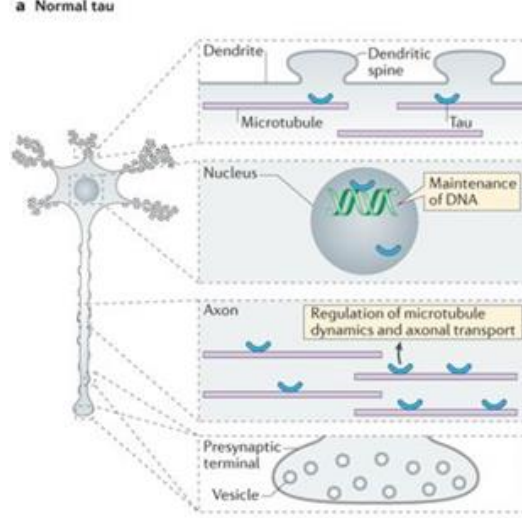


Şekil 2. 11 En büyük tau izoformunun (441 amino asit) fonksiyonel bölgelerinin şematik gösterimi (Luna-Muñoz, Harrington et al. 2013)

Yetişkin insan beyinde, N-terminal bölgesi (ekson 2 (E2) ve E3) ve MTD (E10)' nun alternatif mRNA eklenmesi ile oluşan altı ana tau izoformu vardır. E10' nun alternatif eklenmesi, her biri üç mikrotübüle bağlanma tekrarı (3R) ve her biri dört mikrotübüle bağlanma tekrarı (4R) içeren üç izoforma yol açmaktadır. Tekrarlar 31-32 amino asit uzunluğundadır ve C-terminal bölgesine doğru konumlandırılmıştır. Bununla birlikte, N-terminal bölgede 29-58 amino asit ilavesinin olması veya olmaması, her 3R ve 4R tau'

nun 1N, 2N veya 0N formuna yol açmaktadır. Tam uzunluktaki tau, eşleşmiş helikal ve düz filamentlerin çekirdeğini oluşturan tekrarlar boyunca birleşmektedir. Gelişmekte olan insan beyinde, 3R tau baskındır, yetişkin beyinde ise 3R ve 4R tau konsantrasyonları yaklaşık olarak eşdeğerdir, ancak bu oran nörodejeneratif hastalıklarda sıklıkla değişmektedir. MBD artı yüklü lizin amino aside bakımından zengindir. Bu nedenleeksi yüklü olan mikrotübüllerle ilişki kurabilmektedir. 4R izoformu 3R izoformuna göre mikrotübüllerle etkileşimde daha yüksek afinite göstermektedir. N-terminal bölge ise tau proteininin hücrel lokalizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Ghetti, Oblak et al. 2015, Guo, Noble et al. 2017, Wu, Piña-Crespo et al. 2017).

Beyinde tau esas olarak nöronlarda bulunmakla birlikte çok az miktarda glia hücrelerinde ayrıca hücre dışı ortamda tespit edilmektedir (Bukar Maina, Al-Hilaly et al. 2016). Tau hidrofilik bir proteindir. Fizyolojik koşullar altında, tau sitoplazmada çözünür ve doğal olarak tekrar katlanır. Ayrıca asidik koşullar altında ve yüksek sıcaklıklarda kararlıdır. Tau genel olarak bazik bir protein olmakla birlikte N-terminal bölgesi asidik ve C-terminal bölgesinde nötrdür. Yüklerin bu asimetrisi, katlanmalarını, mikrotübüllerle olan etkileşimlerini ve agregat oluşturmalarını etkilemektedir. Tau proteininin normal şartlarda agregat oluşturma eğilimi çok azdır ancak N-terminal, C-terminal ve tekrar alanları birbirine yaklaşarak ataç benzeri bir şekil oluşturmaktadırlar. Ataç yapısının oluşumu tau'yu agregat oluşumuna karşı korumaktadır. Tau'nun kesilmesi, bu yapının oluşumunu engeller ve agregat oluşumunu teşvik eder. Hücrel düzeyde, tau akson boyunca mikrotübül dinamiklerini düzenler ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlar. Akson uzamasını, olgunlaşmasını ve aksonal iletimi düzenlemekle beraber NF'ler ile birlikte akson bütünlüğüne de yardımcı olmaktadır. Dentritlerde çok az miktarda tau protein lokalize olmasına rağmen, sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Thies and Mandelkow 2007, Hoover, Reed et al. 2010, Tai, Wang et al. 2014). Ayrıca nükleer tau genomik DNA, sitoplazmik RNA ve nükleer RNA'nın bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Bukar Maina, Al-Hilaly et al. 2016, Guo, Noble et al. 2017) (Şekil 2.12).

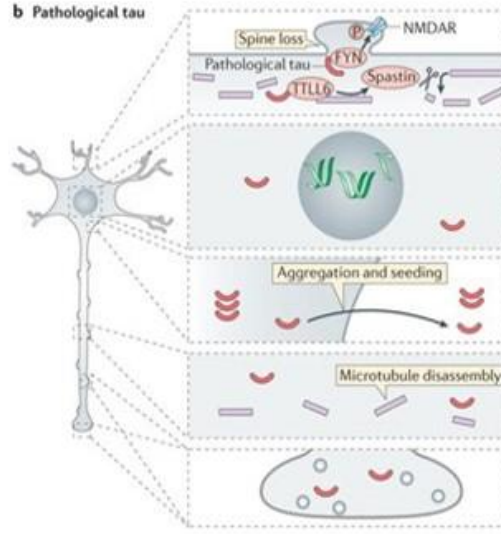


Şekil 2. 12 Normal tau proteininin sağlıklı nöronlardaki görevlerinin şematize olarak gösterilmesi (Wang and Mandelkew 2016).

2.2.5. Tau' nun Post-Translasyonel Modifikasyonları

Tau genellikle hücre içerisinde konumlanan bir protein olmakla beraber nöral aktivite sırasında sinaptik alandan ekzositozla interselüler alana geçebilmektedir. Bu nedenle sağlıklı bireylerde Serebrospinal sıvı (CSF)' de veya beyin interstisyel sıvısı (ISF)' nda tau' ya rastlanabilmektedir. Hiperfosforilasyon, asetilasyon, glikasyon, metilasyon, ubikuitinasyon ve kesilim gibi post translasyonel modifikasyonlar tau' nun mikrotübüllerden serbestlenmesine neden olmakla birlikte patolojik etkiler gözlemlenmektedir. Bu patolojik etkilerin başında nöronlarda aksonal iletimde bozulma, tau agregasyonu ve patolojik tau' nun eksozomlar veya ekzositoz yoluyla ISF' ye geçmesi gelmektedir. Patolojik tau' nun yanlış lokalizasyonu pre-sinaptik bölgelerde sinaptik vesikül sayısında azalmaya, dentritlerde ve post-sinaptik bölgelerde disfonksiyonu indükleyerek post-sinaptik iletimin bozulmasına buna bağlı olarak nöronlar arasında sinapsların kaybına ve patolojik tau' nun sağlıklı nöronlarda birikimine bağlı toksisiteye neden olmaktadır. Örneğin A β oligomerleri gibi strese neden olan çeşitli faktörler, tau' nun dentritlerdeki yanlış lokalizasyonunu indükleyerek tubulin tirozin ligaz benzeri enzim 6 (TTLL6) ve ardından da spastin enziminin ATPaz aktivitesi ile mikrotübül bütünlüğünün bozulması uyarılmaktadır (Spillantini and Goedert 2013, Zempel, Luedtke et al. 2013). Tau agregatları nöronların dışına salınabilir ve tau patolojisinin yayılmasına yol açan diğer nöronlar tarafından tekrar alınabilir. Ayrıca patolojik tau' nun nukleusta

DNA ile bağlantı kuramaması nedeniyle DNA koruyucu işlevini yerine getirememektedir (Bukar Maina, Al-Hilaly et al. 2016, Wang and Mandelkow 2016) (Şekil 2.13).

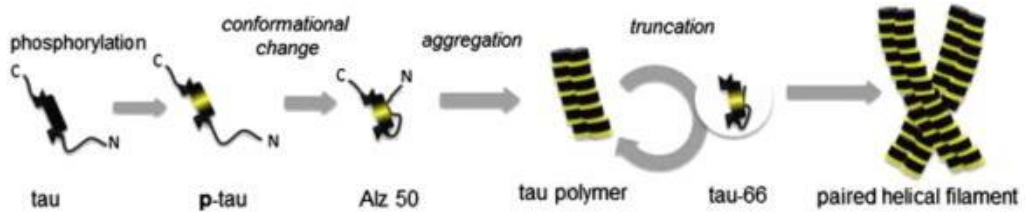


Şekil 2. 13 Patolojik tau' nun etkilerinin şematize olarak gösterilmesi (Wang and Mandelkow 2016).

Tau fosforilasyon, izomerizasyon, glikasyon, asetilasyon, oksidasyon ve ubikuitinasyon dahil olmak üzere çok çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara tabi tutulur. Bu nedenle, protein kinazlar ve fosfatazlar gibi birçok farklı tau bağlanma ortağı translasyon sonrası modifikasyonun düzenleyici bileşenleri olma özelliğini paylaşır. Tau aynı zamanda ubikuitinasyon-proteazom sistemi (UPS) ve şaperon aracılı otofaji için bir substrattır. Fosforilasyon en sık tarif edilen post-translasyonel tau modifikasyonudur. Tau üzerinde 85 kadar potansiyel fosforilasyon bölgesi bulundurmaktadır. Bu fosforilasyon bölgelerinin 45'i Serin (Ser), 35' i Treonin (Thr) ve 5' i Tirozin (Tyr) kinazlar tarafından hedeflenmektedir. Patolojik koşullar altında tau fosforilasyonu artar, bu durumda nöronlarda tau' nun mikrotübüllere olan afinitesini azaltır ve sito-iskelet stabilizasyonunun bozulmasıyla sonuçlanır. Mikrotübül bağlanma tekrarlarının her birinde eşit olarak bulunan Ser262, Ser293, Ser324 ve Ser356' nın fosforilasyonu, tau' nun mikrotübüllere bağlanma afinitesini azaltır. In vitro çalışmalar Thr214, Thr231 ve Ser235' in fosforilasyonunun tau' nun mikrotübüllerden ayrılmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgular MBD dışında kalan tau bölgelerinin, tau' nun hücre iskeleti ile

ilişkinin de etkilediğini göstermektedir (Šimić, Babić Leko et al. 2016, Wang and Mandelkew 2016).

Tau patolojik olarak değiştirildiğinde, mikrotübülleri stabilize edemez ve çözünmeyen agregatlar halinde birikir. AH hastalarında üç tür tau agregatları oluşmaktadır; nöronal somatadaki nörofibriller yumaklar (NFT), nöronal dentritlerdeki nöropil iplikler (NT) ve nöritik plaklar (NP). Anormal tau fosforilasyonu ve NFT oluşumu arasında bir bağlantı vardır. Tau' nun MBD' si bir dizi pozitif yüklü lizin kalıntısı içerdiğinden dolayı negatif yüklü mikrotübüllere bağlanma afinitesi çok yüksektir ancak mikrotübüllere göre daha fazla yoğun olan negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girerek mikrotübüllere tau' nun bağlanmasını ve dolayısıyla mikrotübül stabilitesini azaltmaktadır. Mikrotübüllerden serbestlenen tau proteinleri bir dizi yapısal değişikliğe uğrayarak, Alz50 olarak adlandırılan kompakt yapıyı oluşturmaktadır. Sonrasında proteolitik yıkımlar sonucu Tau-66 olarak adlandırılan kesilmiş tau, doğal halinden çok daha hızlı toplanarak Eşleşmiş Helikal Filament (PHF)' lerin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. NFT' ler de genellikle helikal şekilde bükülmüş 10-nm filamentlerden yapılmış PHF' lerden oluşmaktadır. Yeni yapılan çalışmalarda, çözünmeyen filamentlerin yerine, çözülebilir tau agregatlarının, NFT kaynaklı nörotoksisite gelişmeden önce hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde daha kritik roller oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle NFT oluşumundan önce hiperfosforile edilmiş tau, nöronlarda mikrotübül demontajına, aksonal taşımanın bozulmasına ve organel disfonksiyonlarına yol açarak nöronal hücre apoptosisine yol açmaktadır (Lim, Haque et al. 2014, Šimić, Babić Leko et al. 2016) (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14 Tau agregasyonunun aşamaları (Lim, Haque et al. 2014).

Sağlıklı bir hücrede mikrotübül stabilizasyonunun düzenlenmesi için tau sürekli olarak fosforile edilmektedir. Denge bozulduktan sonra tau' nun anormal fosforilasyonu, tau ve mikrotübüller arasındaki yük dengesini bozar, sonuçta tau' nun

mikrotübüllerden serbestlenmesine neden olur. Tau fosforilasyonu, protein kinazlar ve fosfatazlar arasındaki denge tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Tau'yu fosforile eden 20' nin üzerinde kinaz vardır. Bunlar arasında Glikojen Sentaz Kinaz (GSK) 3 α/β , insan beynindeki en etkili tau kinazdır. Tau'daki 40' dan fazla fosforilasyon bölgesi, GSK3' ün hedefi olarak tanımlanmaktadır. Taupatilerdeki GSK3' ün hem toplam protein miktarı hem de aktivitesi, nörodejenerasyonun ilerlemesiyle bağlantılı olup GSK3 β ' nın aşırı aktivasyonu, tau fosforilasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Siklin bağımlı kinaz 5 (CDK5) tau fosforilasyonu ve nörofibriller dejenerasyonla ilişkilidir. Mitojenle aktive edilen kinaz (MAPK) ailesinden p38, Kasein kinaz (CK) lar; CK1 ve CK2, Kalsiyum-kalmodülün bağımlı protein kinaz-2 (CaMK2), Protein kinaz A (PKA), p70S6K, Mikrotübül afinite düzenleyici kinaz (MARK), Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK), Fyn kinaz, İkili spesifik protein kinaz-1A (DYRK1A)' dır. Özellikle DYRK1A' nın tau üzerinde Thr212' yi fosforile etme kabiliyeti, DYRK1A' yı potansiyel bir primer kinaz haline getirir. DYRK1A' nın inhibe edilmesi yakın zamanda AH için terapötik bir yaklaşım olarak önerilmektedir. GSK3 β ' ya benzer şekilde, TAOK1 ve 2' de tau üzerinde 40' dan fazla fosforilasyon bölgesine sahiptir ve AH' da tau patolojisinin gelişiminde potansiyel rol oynamaktadırlar.

Tau, Tyr18, Tyr29, Tyr197, Tyr310 ve Tyr394 olmak üzere beş tirozin üzerinden fosforile edilmektedir. Bunların bir kısmı, Src, Lck, Syk, Fyn ve c-Abl gibi Src aile kinazları tarafından da fosforile edilmektedir. Fyn kinaz tarafından hedeflenen Tyr18' in fosforilasyonu aksonal taşımayı düzenlemektedir. Tau fosforilasyonunun düzenlenmesiyle ilgili bir diğer enzim grubunda protein fosfotazlar (PP)' dir. Bunlar PP1, PP2A, PP2B, PP2C ve PP5' tir. Protein fosfataz 2A (PP2A), beyindeki hücrel fosfataz aktivitesinin %70' den fazlasını gerçekleştirmesi nedeniyle tau'yu defosforile eden başlıca enzimdir (Wang and Mandelkow 2016). PP2A aktivitesi AH beyinde yaklaşık %50 oranında azalır ve bu da tau fosforilasyonunun artmasına katkıda bulunmaktadır. AH beyinlerinden izole edilmiş yanlış katlanmış tau' nun PP2A ile inkübasyonu, mikrotübüllere rekombinant 2N4R tau' nunkiye benzer bir seviyede tau bağlanmasını sağlamaktadır. Başka bir protein fosfataz olan PP5' in aktivitesi AH beyinde %20 oranında azalmaktadır. Bazı durumlarda, PP2A aktivitesinin tau ile ilgili

olarak GSK3 β ve CDK5' in kinaz aktivitelerini geçersiz kılabilceği beirtilmektedir. Bu bulgular, hem tau fosforilasyonunun aşığı regüstasyonunu hem de tau' nun aşırı fosforilasyonunun, taupati beyninde gözlenen tau' nun anormal fosforilasyonunda rol oynadığını göstermektedir.

PP2A' a Ser9' da GSK3 β ' yı fosforile ederken bunun tersine GSK3 β aktivasyonu PP2A' yı inhibe etmektedir. Ömenli olarak, Akt GSK3 β ' yı inhibe eder ve bu nedenle GSK3 β ve PP2A' nın aktiviteleri arasındaki dengenin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Böylece AH beyninde PI3 K/Akt sinyalinin zayıflaması GSK3 β aktivitesini artırır dolayısıyla tau fosforilasyonunu ve agregat oluşumunda arttırmaktadır. Ayrıca mTOR PP2A' nın aktivitesini düzenler. Çünkü mTOR' un inhibe edilmesi PP2A' nın aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu bulgular, tau fosforilasyon durumunun korunmasını sağlayan PP2A, mTOR, Akt ve GSK3 β ' yı içeren bir düzenleme döngüsünün varlığını göstermektedir (Šimić, Babić Leko et al. 2016, Gao, Wang et al. 2018).

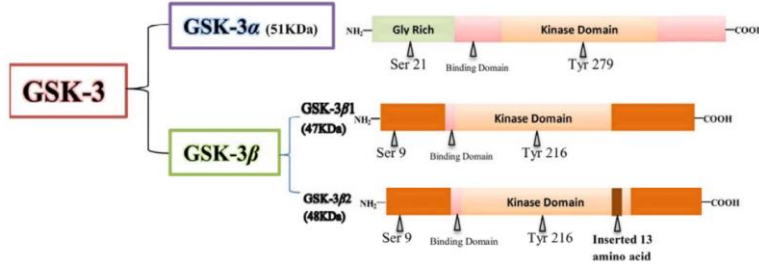
2.2.6. Glikojen Sentaz Kinaz 3

GSK3, hücre büyümesi ve bölünmesi, hücre devrinin ilerlemesi, glikojen metabolizması, gen transkripsiyonu, protein sentezi, mikrotübül stabilitesi, apoptoz, hücre sağkalımı, stress durumuna karşı cevap ve immün sistem hücrelerinin aktivitesi ile ilişkili proteinleri düzenleme gibi çeşitli fizyolojik işlemlerde rol oynayan, yaygın olarak eksprese edilmiş, yapısal olarak aktif, prolin yönelimli bir serin/treonin kinaz' dır (Hooper, Killick et al. 2008, Li and Jope 2010, Beurel, Grieco et al. 2015). AD' nin LOAD ve EOAD formlarının patogeneğinde önemli ve merkezi bir rol oynamaktadır. GSK3' ün aşırı aktivitesi hafıza bozukluğunu, tau hiper fosforilasyonunu, A β üretimi ve plak oluşumu ile ilişkili mikrogial aracılı inflamatuvar tepkilere neden olmaktadır. Yüksek oranda korunmuş olan GSK3 bitkilerde, mantarlarda, solucanlarda, sineklerde ve omurgalılarda ortologlara sahiptir. Memelilerde GSK3 α ve GSK3 β olmak üzere iki paroloğu vardır ve genel olarak kinaz bölgelerinde %98 amino asit dizisi özdeşliği de dahil olmak üzere %85 genel dizilim homolojisi gösterirler. Katalitik alan benzerliklerine rağmen C-ucu amino asit dizilimleri ve GSK3 α ' nın N-ucu bölgesinde glisin (Gly) amino aside açısından zengin bir alan içermesi bakımından farklılıklar bulunmaktadır. GSK3 α , insanda 19. kromozom

üzerinde bulunan *GSK3 α* geninden sentezlenir ve molekül ağırlığı 51 kDa' dır. Yetişkin insan beyinde *GSK3 α* , özellikle hipokampus, serebral korteks, striatum ve serebellum da bol miktarda bulunmaktadır (Li and Jope 2010, Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Cai, Zhao et al. 2012).

GSK3 β ise insanda 3. kromazom üzerindeki *GSK3 β* geninden sentezlenir, ancak ekson 8 ve 9 arasındaki alternatif eklenme, kinaz domaininde 13 amino asitlik bir ilave bölge içeren uzun formunun (*GSK3 β 2*) oluşturulmasına neden olmaktadır. Molekül ağırlığı 48 kDa olan *GSK3 β 2* sentez edilen toplam *GSK3 β '* nın %15' ini kapsar ve ağırlıklı olarak nöronal dokularda ifade edilmektedir. *GSK3 β '* nın kısa formu olan *GSK3 β 1* ise 47 kDa ağırlığında olup gelişen ve yetişkin sinir sistemi de dahil olmak üzere, vücutta hemen hemen her yerde bulunmaktadır (Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Cai, Zhao et al. 2012).

GSK3, substratları *GSK3'* e alan primer bir substrat bağlama alanı ve substratı fosforile eden bir kinaz alanı olmak üzere iki ana fonksiyonel alana sahiptir. Eksi yüklü alan, önceden fosforile edilerek hazırlanmış olan çoğu *GSK3* substratı için bir bağlanma bölgesi sağlamaktadır. *GSK3'* ün aktivitesinin düzenlenmesinde fosforilasyon önemli bir post-translasyonel modifikasyondur. *GSK3'* ün fosforilasyonu bazı kinazlar veya otofosforilasyonla düzenlenebilmektedir. *GSK3'* ün her iki paraloğunda bağlanma bölgeleri spesifik substratların seçiminde oldukça önemlidir. *GSK3'* ün düzenlenmesinde en iyi tanımlanmış mekanizma Ser9 ve Ser21' in fosforilasyonudur. *GSK3 α '* nın Gly (Glisin) bakımında zengin N-terminal alandaki Ser21 ve *GSK3 β '* nın N-terminal alandaki alternatif izoformlarının Ser9 fosforilasyonları enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bununla birlikte kinaz domainlerindeki *GSK3 α '* da Tyr279 ve *GSK3 β '* nın alternatif izoformlarında Tyr216 fosforilasyonu ise substrat bağlanma kanalından çıkan ve substrat erişebilirliğini teşvik eden tirozin yan zincirinin dönüşümü indükleyerek enzim aktivitesini arttırmaktadır. Ancak *GSK3'* ün Tyr216/279' daki düzenlenmesinin, Ser9/21' deki düzenlenmesi kadar yaygın olmadığı düşünülmektedir (Hooper, Killick et al. 2008, Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Cai, Zhao et al. 2012, Beurel, Grieco et al. 2015) (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15 Memelilerde bulunan GSK3' ün şematik olarak gösterilmesi (Cai, Zhao et al. 2012).

GSK3' ün aktivitesi düzenleyen çok sayıda sinyal yolağı mevcuttur. Bunlar arasında en önemlileri, büyüme faktörleri, hormonlar ya da sitokinlerin bağlanmasıyla aktive olan Reseptör TyrK (RTK) (Reseptör Tirozin Kinaz), G protein reseptörleri veya hücre içi steroid hormon reseptörlerinin aktive ettiği Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Protein Kinaz-B (PKB veya AKT) sinyal yolağı, çok sayıda sinyal yolağıyla etkileşim halinde olan ve hücre içi yapıtaşlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak gerçekleştirilen protein sentezi gibi pek çok metabolik olayların düzenlenmesinde görev alan Rapamisinin memelilerde mekanistik hedefi (mTOR) sinyal yolağı ve embriyonik gelişim, hücre sağkalımında önemli olan Wnt/ β -Katenin sinyal yolağıdır (Hooper, Killick et al. 2008, Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011).

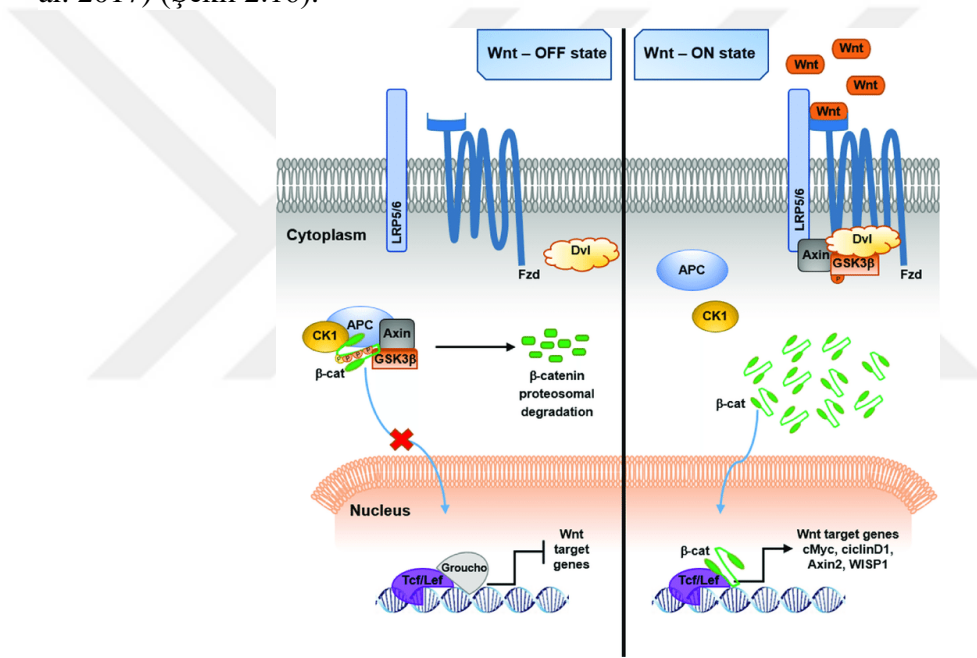
GSK3, kinaz sinyal yollarıyla inaktive edilebilmektedir. İnsülin ve çeşitli büyüme faktörleri (IGFs)' nin, nörotrofinler ya da morfojenlere varlığına bağlı olarak fosforile olan RTK' ler ile etkileşime giren adaptör proteinler aracılığıyla PI3K' yı aktive etmektedir. Bununla birlikte hücre membranının sitosolik yüzeyine bakan kısmında konumlanan PIP₂ (Fosfotidilinositol (3,4)- bifosfat) PIP₃ (Fosfotidilinositol (3,4,5)-trifosfat)' e fosforile olmuştur. Sonuç olarak fosforilasyon bölgesini tanıyıp aktive olan PDK1 (Fosfoinositide Bağımlı Kinaz-1) ve mTORC₂ (Rapamisinin memeli hedefi (mTOR) dirençli Rictor/mTOR kompleksi) tarafından AKT' yi T308 ve S473 amino asitleri üzerinden fosforile ederek aktivasyonuna yol açmaktadırlar. AKT etkinleştirildiğinde GSK3' ün izoformları olan GSK3 α ' yı Ser21 ve GSK3 β ' yı Ser9 pozisyonunda fosforile etmektedir. Bu iki izoformun N-terminal domainlerinin fosforilasyonu GSK3' ü inaktive etmektedir. Bununla birlikte AKT, Protein Kinaz-A (PKA), Protein Kinaz-C (PKC), Ribozomal

Protein S6 Kinaz Beta-1 (p70S6K) gibi birçok kinazın GSK3' ün serin fosforilasyonunu arttırmak için aracılık edebileceği sinyal yolağı vardır. Bu nedenle, bu kinazları aktive eden birçok sinyal yolu, GSK3 üzerinde inhibe edici serinleri fosforile ederek GSK3'ü inaktive etmektedir. Ancak bu düzenleyici mekanizmada istisnai bir durum mevcuttur; AKT' nin AMPK' nin aktivitesini inhibe etmek için GSK3' ü fosforile etmesidir (Hooper, Killick et al. 2008, Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Bedse, Di Domenico et al. 2015).

GSK3' ün inaktivasyonunu sağlayan başka bir sinyal yolağıda G-Protein Bağlı Reseptör (GPCR)' lere bağlanan büyüme faktörleri, peptid hormonları ya da nörotransmitterlerin uyardığı Fosfolipaz-C (PLC), PP2A/Arestin-2 ve adenilil siklaz enzimleriyle birlikte PKA, PKC ve AKT' yi etkinleştirerek GSK3' ün inhibe edici fosforilasyonuna neden olmaktadır. PI3K/AKT veya Ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinaz (ERK, p44/42) aracılığı ile aktif olan ancak hücre içi stres durumunda (besin yetersizliği vb.) AMPK gibi proteinler aracılığı ile inaktif olan mTOR' un Rapamisine dirençli olmayan (duyarlı) Raptor/mTOR kompleksi (mTORC₁) normal şartlarda nükleotid, protein sentezi, lipid sentezi ve ribozom biyogenezi gibi metabolik olayların tetiklenmesini sağlayan bazı proteinleri etkinleştirerek otofajiyi inhibe etmektedir. mTORC₁' in aktifleştirdiği ve ribozom biyogenezi teşvik eden p70S6K' de GSK3' ün paraloglarının aktivitesini N-terminal domainlerinin Ser9 ya da Ser21 fosforilasyonu ile inhibe etmektedir (Maurer, Preiss et al. 2014, Hermida, Kumar et al. 2017, Manning and Toker 2017).

GSK3' ün aktivitesini düzenleyen bir başka sinyal yolağı olan Wnt/ β -katenin embriyonik gelişim ve yetişkin homeostazında kilit bir rol oynamaktadır. Wnt sinyal molekülünü ligand olarak tanıyan tek geçişli LRP-5/6 (Lipoprotein Reseptörü İlişkili Protein 5/6) ve çok geçişli frizzled eş-reseptörleri tarafından algılanmaktadır. Wnt proteininin yokluğunda sitozolde iskele proteinleri aksin ve Adenomatous poliposis koli (APC) tarafından tutulan CK1 α (Kazein Kinaz 1, α -izofomu) ve GSK3' den oluşan protein kompleksinin birbirlerinden ayrılmalarını sağlayamamaktadır. Bu durumda GSK3 ve CK1 α kinazları tarafından β -katenin fosforile edilerek, aynı komplekste yer alan β TRCP (β -transdüsün tekrarı içeren Ubikuitin ligaz E-3 sınıfına ait protein) tarafından ubikuitin

aracılı proteozomal yıkılımına sebep olmaktadır. Sonuçta β -katenin nukleusa göç edemez ve hedefi olan genler inaktif durumda kalır. Wnt sinyalinin varlığında ise, aktive olan frizzled reseptörüne bağlanan disheveled yapı-iskele proteini vasıtasıyla aksinin tutulması sağlanarak APC, GSK3 ve CK1a' yı içeren kompleks dağıtılır veya GSK3, aktive olan LRP5/6 ve disheveled tarafından tutularak inaktive edilir. Bu durumda GSK3 tarafından fosforlanamayan β -katenin nukleusa geçerek TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) ile birlikte hedef genlerinin anlatımını sağlar (Hooper, Killick et al. 2008, Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Metcalfe and Bienz 2011, Lorenzon, Calore et al. 2017) (Şekil 2.16).

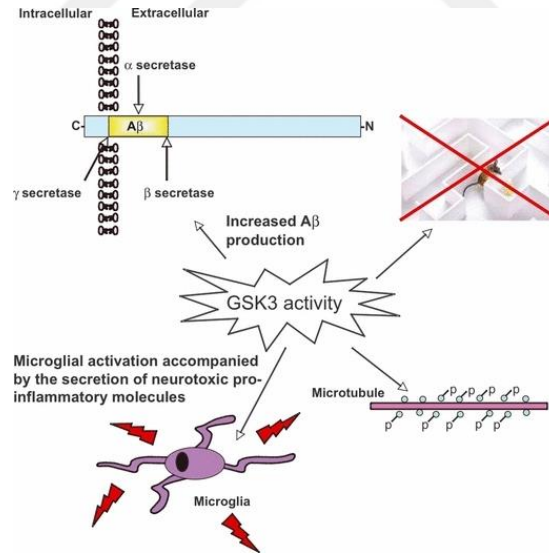


Şekil 2. 16 β -katenin kaynaklı Wnt sinyal yolağının şematik gösterimi (Lorenzon, Calore et al. 2017).

2.2.7. GSK3' ün Alzheimer Hastalığındaki Rolü

Hem ailesel hem de sporadik AH' da önemli rol oynayan GSK3, hafıza bozukluğu, tau hiperfosforilasyonu, A β üretiminin artması ve inflamatuvar cevapların artması ile yakından ilişkilidir. Genetik ve epidemiyolojik çalışmalar, AH' de GSK3'ün regülasyonunda, Wnt ve insülin sinyal yolağı ara maddelerinde meydana gelen değişiklikler yoluyla düzensizlikler olduğunu göstermektedir. Wnt sinyalinin ko-reseptörü olan düşük yoğunluklu LRP6, APOE $\epsilon 4$ negatif bireylerde LOAD için bir risk geni olarak tanımlanmaktadır. AH patolojisinin anormal Wnt sinyalleşmesine ek olarak diyabet ve

insülin direnci ile ilişkisi olduğuda bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda insülin sinyali gen bölgelerinin AH için duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Yetersiz insülin sinyali PI3K sinyal yolağının çalışmaması vasıtasıyla tau hiperfosforilasyonuna neden olmaktadır. PI3K/mTOR/AKT sinyal yolağı aracılığıyla aktive olan p70S6K tau proteinini Ser262/214 ve Thr212 amino asitlerinden fosforile eder ve tau mRNA'sının sentezini arttırarak PHF oluşumunu tetiklemektedir. Bununla birlikte PSEN1 mutasyonları, PI3K/AKT sinyalini inhibe ederek GSK3' ün aktivitesini kolaylaştırarak tau hiperfosforilasyonuna dolayısıyla da nörodejenerasyona sebep olmaktadır. İnsülin direnci ise, A β ' yı yıkan enzimlerden biri olan IDE' in anlatımını azaltır ve PI3K/AKT sinyal yolağının çalışmamasını sağlayarak nöral sağkalım, büyüme, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızayı negatif yönde etkilemektedir. GSK3' ün izoformlarından biri olan GSK3 α ' da A β üretiminin artmasıyla sonuçlanan APP kesilimini düzenlemektedir. Nöronlarda A β birikimine bağlı olarak plak oluşumu, PI3K sinyalinin inhibisyonu aracılığıyla GSK3 β aktivitesi artmaktadır (Hooper, Killick et al. 2008, Hur and Zhou 2010, Maurer, Preiss et al. 2014, Hermida, Kumar et al. 2017) (Şekil 2.17).



Şekil 2. 17 GSK3' ün AH' deki rolünün gösterilmesi (Hooper, Killick et al. 2008).

2.3. OTOFAJİ

Mayadan insana kadar tüm ökaryotik hücrelerde işlev gösteren ve hücre içi dengenin sağlanmasında gerekli olan vesikül ve lizozom aracılı bir yıkım yolağıdır (Ichimura and Komatsu 2010, Kodiha and Stochaj 2011, Mizushima, Yoshimori et al. 2011). Hücre içi

yanlış katlanmış ve hasar görmüş proteinlerin, işlevsiz veya hasarlı organellerin (mitokondri, endoplazmik retikulum, peroksizom vb.) temizlenmesinin yanısıra metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili rol oynamaktadır. Bu hücrel yıkım yolağı besin açlığı, inflamasyon, hipoksi, oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve nöronal eksitotoksisite dahil olmak üzere çeşitli sinyallerle indüklenerek hasarlı veya gereksiz bileşenlerin geri çevrimini yapar böylece hücre metabolizmasına alternatif yapı taşları ve enerji kaynakları sağlamaktadır. Hücre içindeki bu geri dönüşüm, tüm hücre tipleri için önemlidir ancak hasarlı hücrel içereker hücre bölünmesi sırasında bir miktar seyrelebildiklerinden, otofaji nöronlar bigi tamamen farklılaşmış ve normalde bölünemeyen hücrelerde daha büyük bir öneme sahiptir. Özellikle diğer hücrelere kıyasla nöronlar hayatta kalmak için yüksek bazal otofajiye bağımlıdırlar (Zare-Shahabadi, Masliah et al. 2015). Otofaji işlevlerindeki en küçük anormallik, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar, enfeksiyonlar ve daha pek çok hastalığın gelişim ve seyrini etkileyebilmektedir. Tüm hücreler ve özellikle nöronların sağlığı açısından büyük önem taşıyan mitokondrilerin, hasar görmeleri durumunda ana yıkım yolağının mitokondriyel otofaji olması nedeniyle otofaji nörodejeneratif hastalıklar açısından çok önemlidir (Li, Zhang et al. 2010, Singh and Cuervo 2011, Murrow and Debnath 2013).

Memeli hücrelerinde protein yıkımında görevli iki ana sistem vardır; ilki ubikuitin-proteozom sisteminde, hücre içerisinde çözünür halde bulunan veya kısa ömürlü proteinler, E1, E2, E3 enzimlerinin sıralı işlemleri sonrasında ubikuitin olarak adlandırılan küçük protein zincirleri ile işaretlenir ve yıkım için proteozoma gönderilmektedirler. İkinci sistem olan otofaji ise, uzun ömürlü proteinler, yanlış katlanmış veya mutasyon sonucu biriken proteinler, hasarlı organeller, vb. lizozomlarda yıkımını sağlayan bir mekanizmadır (Klionsky, Schulman et al. 2014). Otofaji yolağında, sitosolde yıkıma uğrayacak içerik, vesiküller aracılığı ile lizozoma taşınır ve lizozom içerisindeki hidrolazlar tarafından yıkım işlemi gerçekleştirilir. Otofaji lizozomal sistemi, hücrel yeniden şekillenme için substrat ve hücrel homeostazı koruyan enerji sağlamak amacıyla gerçekleştirdiği yıkım görevinin yanı sıra membran biyogenezine ve vesiküler

taşımayada katkıda bulunmaktadır. Bu hücre içi yıkım mekanizması birkaç basamakta gerçekleşmektedir; sırasıyla otofajik keseciğin (otofagozom) çekirdeklenmesi, otofajik zarların uzaması ve yıkıma uğrayacak hedeflerin zar ile çevrilmesi, otofagozomların lizozomlarla birleşmesi ve lizozomal enzimlerin yardımıyla yıkımın gerçekleşmesidir. Memelilerde şaperon aracılı otofaji, mikrootofaji ve makrootofaji olarak üç farklı otofaji yolağı üzerinde durulmaktadır (Li, Zhang et al. 2010, Murrow and Debnath 2013).

- Şaperon-aracılı otofaji (CMA), pentapeptid KFERQ (Lizin, Fenilalanin, Glutamat, Arjinin, Glutamin) motifine sahip okside olmuş veya yanlış katlanmış proteinler, sitoplazmada HSC70 (ısı-şok proteinleri) tarafından tanınır. Şaperon-KFERQ içeren protein kompleksi daha sonra lizozomal membrandaki LAMP-2A (Lizozomla ilişkili membrane proteini) reseptörlerini bağlar ve hedef proteinleri bozunma için lizozomlara translokasyonunu gerçekleştirir (Bejarano and Cuervo 2010, Kaushik, Bandyopadhyay et al. 2011).
- Mikrootofaji ise sitoplazmik bileşenlerin doğrudan lizozom üzerindeki küçük kesecikler tarafından sarılıp sindirilmesidir (Li, Li et al. 2012).
- Otofaji ile bağlantılı proteinlerin (ATG) hiyerarşik olarak aktivitesini düzenleyen makrootofaji, sitoplazmik bileşenlerin otofaji vakuölü (AV) tarafından yutulması ve lizozomlarla füzyondan sonra proteazlar tarafında parçalanması olayıdır (Li, Zhang et al. 2010, Johansen and Lamark 2011, Tung, Wang et al. 2012). Makrootofaji, üzerinde en çok çalışılmış ve moleküler mekanizması daha fazla aydınlatılmış otofaji yolağı olmakla birlikte yakın geçmişe kadar seçici olmayan, toplu yıkım mekanizması olarak bilinirken, yeni yapılan çalışmalar seçici türlerinin varlığını da kanıtlamıştır. Seçici olmayan otofaji genellikle açlık, büyüme faktörü eksikliği ve hipoksi gibi stres koşullarında uyarılırken, seçici otofaji ise hasarlı organellerin ve hücrel parazitlerin tespit edilip yok edilmesinde görevlidir. Seçici otofaji içinde en çok çalışılanı mitofaji olarak adlandırılan ve mitokondrilerin yıkımından sorumlu olan özel türdür. Bununla birlikte bazı organellerin (peroksifaji, ribofaji, ERfaji), yağ damlacıklarının (lipofaji), patojenlerin (ksenofaji) ve protein agregatlarının (agrefaji) seçici olarak otofaji tarafından yıkımı gerçekleştirildiği kanıtlanmıştır (Shaid, Brandts et al. 2013).

2.3.1. Otofajinin Aşamaları

Otofajinin ilk adımı, zar uzamasının ardından küçük bir zar kesesinin (otofagozom) oluşumudur. Hücrede ofofagozomlar ofofajı oluşum merkezi (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde ER ile Golgi yapılarının aralarına serpiştirilmiş olan yapılarda ortaya çıkmaktadırlar. Otofagozom zarının kökeni tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli araştırmacılar tarafından mitokondri, ER, Golgi aygıtı veya hücre zarından türediği düşünülmektedir. Ancak birçok araştırma ofofajik zarların öncelikle ER' den kökenlendiğini öne sürmektedir (Kroemer, Mariño et al. 2010). Otofagozom zarının uzamasında ubikuitin benzeri hücre içi iki farklı moleküler mekanizma rol almaktadır. Bunlar yanı zamanda, ATG5-ATG12 ve MAP1LC3 (mayada ATG8, memelilerde kısaca LC3) bağlanma sistemleri olarakta bilinmektedirler. İlk ubikuitin benzeri mekanizmada ATG12, ATG7 (E1 benzeri protein) ve ardından ATG10 (E2 benzeri protein) protein aracılığıyla taşınarak ATG5 proteinine kovalent olarak bağlanmaktadır. Daha sonra ATG5-ATG12 protein kompleksi ATG16 (memelilerde ATG16L1) ile birleşerek daha büyük moleküler ağırlıkta bir kompleks oluşturarak ofofagozom zarı üzerinde konumlanıp zarın uzayıp kapanmasının ardından zardan ayrılmaktadır (Fujita, Itoh et al. 2008, Itakura and Mizushima 2010).

İkinci ubikuitin benzeri mekanizmada ise, sentezi tamamlanan LC3 proteini sitoplazmada ATG4 proteazı tarafından C-ucundaki Glisin amino asiti ortaya çıkacak şekilde enzimatik kesilime uğrayarak serbest halde kalmaktadır. LC3-I olarak adlandırılan bu proteinin ATG7 (E1 benzeri protein) tarafından aktivasyonu sağlanmaktadır. Daha sonra ATG3 (E2 benzeri protein) ve ATG5-ATG12-ATG16 protein kompleksi (E3 benzeri kompleks) aracılığıyla, serbest kalan Glisin amino asiti Fosfatidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Bu olay PAS' a zar taşınması ve uzaması için gereklidir. FE' ye bağlanan LC3 proteininde LC3-II olarak adlandırılır ve ofofagozomlar üzerinde konumlanmaktadır. LC3-II proteininde ofofagozomlarda birikmesi ofofajiyi tetiklediğinden, bu olay bir ofofajı belirteci olarak görülmektedir. ATG4 proteazı ise, ofofagozom oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini FE' den kopararak

yeniden kullanımlarını sağlamaktadır (Satoo, Noda et al. 2009). LC3' nin FE' ye bağlanması hem otofagozom zar yapısı için hem de otofaji mekanizması aracılığıyla yıkıma uğrattılacak olan hedeflerin seçilmesinde önemlidir. Otofagozom ikili zar sisteminin iç yüzeyinde konumlanan LC3 proteinleri p62/SQSTM1, NBR1, OPTN, NIX ve NDP52 gibi otofaji reseptörleri ile LIR (LC3 bağlanma bölgesi)' ye bağlanarak yıkıma uğrayacak protein, organellerin otofajiz zar tarafından sarılması sağlanmaktadır (Lamark, Kirkin et al. 2009, Kim and Do Hoon Kwon 2016).

Otofagozom içerisindeki sitoplazmik içeriğin sindirimi ve geri dönüşümü için otofagozomun yıkıcı enzimlerin kaynağı olan lizozom ile birleşmesi gerekmektedir. Bu birleşmede, küçük GTPazlar (RAB proteinleri) ve V-ATPazlar ile lizozomal zar proteinleri (LAMP ve SNARE proteinleri) gibi çok sayıda protein rol oynamaktadır. Ayrıca ATG proteinleri ve hücre yapı-iskelet temel bileşenleri arasındaki ilişkide, mikrotübüller üzerindeki otofagozomları lizozomlara yönlendirmektedir. Artık geç endozoma dönüşen otofagozom ile lizozom füzyonunun ardından geç endozom içeriği lipazlar, katepsin proteazlar ve diğer hidrolitik enzimler tarafından yapı taşlarına (nükleik asitler, amino asitler, yağ asitleri, şekerler, vb.) ayrılır ve biyolojik moleküllerin yeniden sentezlenmesi için sitoplazmaya gönderilmektedirler (Birgisdottir, Lamark et al. 2013).

2.3.2. Otofajinin Regülasyonu

Otofajik aktivitenin kontrolünde mTOR protein kompleksi önemli rol oynamaktadır. mTOR, büyüme faktörleri ve amino asitler gibi bol miktarda hücre besin varlığında aktive olan kinazdır ve ATG13' ün fosforilasyonu ile otofajinin başlatılması basamağını önlemektedir. Açlık, hipoksi gibi stress koşulları hücredeki otofajik aktiviteyi uyararak, otofagozomal formasyona yol açan mTOR inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. mTOR aktivitesinin düşmesi sonucunda ATG13, ULK (Unc-51 benzeri kinaz) ve FIP200 (200 kDa fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) defosforile olarak otofajinin uyarılmasına neden olmaktadır (Kundu and signaling 2011). Yakın zamanda yapılan çalışmalar memelilerde ULK1 ve ULK2 proteinlerinin mTOR ve AMPK ile direkt etkileşerek otofajiyi tetiklediği gösterilmiştir. Bu durumun aksine p70S6K' nin fosforilasyonu ise otofajiyi baskılamaktadır (Scott, Schuldiner et al. 2004).

Sınıf I PI3K, mitojenik uyarılarla tetiklenen hücre büyümesinin kontrolünden sorumlu en etkili sinyal yollarından birisidir. Hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzeyinde konumlanan PIP₂' yi PIP₃' e fosfatlayarak AKT/PKB yolağının aktivasyonu aracılığıyla mTOR kompleksini etkinleştirerek otofajiyi bloke etmektedir. Bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN ise PI3K/AKT yolağı ile ters yönde çalışarak otofajinin aktivasyonunda görev yapmaktadır. Nitekim *PTEN* geninde meydana gelen mutasyonların otofajiyi baskıladığı bilinmektedir.

PI3K' lara ait farklı bir kinaz olan Sınıf III PI3K Vps34 ve ürünü PIP₃ otofajinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. PI3K kompleksi, Beclin1, ATG14L, Vps15 ve PI3K Vps34 proteinlerinden oluşmaktadır ve PI3K bağlayıcı proteinlerle otofagozom oluşumunu başlatmaktadır. Memelilerde, Vps34-Beclin1 aktivitesini düzenleyen, Ambra1, Bif-1, UVRAG, Rubicon vb. proteinler de PI3K kompleksinin birer üyesidir. UVRAG proteinini içeren kompleks otofagozom olgunlaşmasında görev almaktadır. PI3K protein kompleksi, otofajinin uyarılmasında otofagozom zarının başlayacağı bölgelerin belirlenmesinden sorumludur. Bununla birlikte otofaji ile bağlantılı PIP₃ yağ molekülleri otofagozom başlangıç yerinde birikerek, otofajinin ilerlemesinde görev yapan ve FYVE (Fenilalanin-Tirozin-Valin-Glutamat) motifine ya da WIPI/ATG18 proteinindeki gibi PH (Prolin-Histidin) alt birimine sahip otofaji proteinlerine bağlanarak, onların ER' nin dış zarına yönlendirilmesini sağlamaktadır (Cheung and Ip 2011, Dou, Pan et al. 2013) .

Makrotofajinin düzenlenmesinde rol oynayan moleküller arasında 5` AMP ile aktive olan protein kinazı (AMPK) ve ölüme bağlı protein kinazı (DAPK) yer almaktadır (Grotemeier, Alers et al. 2010, Eisenberg-Lerner and Kimchi 2012). AMPK' nın aktivasyonu, otofajiyi kolaylaştırmak için mTOR sinyal aktivitesini azaltarak, Aβ' nin lizozomal bozulmasını arttırmaktadır. Ayrıca sitosolik Ca⁺²' deki artış, AMPK' nin CaMKKβ (Ca⁺²/CaM' ye bağımlı protein kinaz β) aktivasyonu yoluyla mTOR' u inhibe ederek otofajiye neden olmaktadır (Grotemeier, Alers et al. 2010, Cai, Yan et al. 2012). Oksidatif stres tümör baskılayıcı protein olan DAPK' nın aktivasyonunu indükleyerek, stres koşullarında

DAPK fosforilasyon yoluyla hem otofagozom hem de otolizozomların oluşumunu tetikleyen PKD (Protein kinaz D)' yi aktive etmektedir (Shoval, Berissi et al. 2011, Eisenberg-Lerner and Kimchi 2012).

2.3.3. Sinir Hücrelerinde Otofaji

Hücre içerisinde yanlış katlanmış veya hasarlı protein birikimleri pek çok nörodejeneratif hastalığın ortak özelliğidir. Bu birikimler hastalığın özelliklerine bağlı olarak farklı proteinlerden oluşup farklı sinir hücre tiplerinde ve farklı hücre içi organellerde görülebilmektedir. Bazı durumlarda bu birikimlerin oluşmasına tek bir nokta mutasyonu sebep olmakla birlikte bazı amino asit tekrarları veya polimerizasyona eğilimi olan üç boyutlu yapılarda (Senile plakları gibi) neden olabilmektedir. Bu değişiklikler sadece ilgili proteini değil, sinir hücrelerindeki birçok yolağı da doğrudan etkileyerek, sinaps kaybı ve hücre ölümüne yol açabilen anormalliklere sebep olmaktadır.

Otofaji için temel genler olduğu düşünülen *ATG5* ve *ATG7* üzerinde yapılan sinir sistemi ve otofaji ile ilgili çalışmalar, bu genlerin silindiği fare modellerinde nörodejenerasyonun görülmesi sonucunda daha da önem kazanmıştır. Bu çalışma sonucunda, otofajinin aksanal iç dengenin sağlanmasından sorumlu olduğu ve otofaji yolağındaki aksamaların akson dejenerasyonuna neden olduğu görülmüştür. Ayrıca otofaji mekanizması, nörodejeneratif hastalıklara neden olan hücre içerisinde agregat oluşturan proteinlerin (Parkinson hastalığında; mutant α -synuclein, Huntington hastalığında; çoklu glutamin uzantılı huntington ve pek çok demansta; normal ve mutant tau) seviyelerini düzenlemektedir. Otofaji yolakları biriken proteinleri temizleyemediğinde, nörodejeneratif hastalıklar tetiklenmektedir (Nishida, Arakawa et al. 2009, Shimizu, Arakawa et al. 2010, Kocatürk and Gözüaçık 2017).

2.3.4. Alzheimer Hastalığı ve Otofaji

AH bilişsel bozukluk, hafıza kaybı, bunama gibi semptomlarla ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın en bilinen biyobelirteçleri beyin dokusunda APP' den kökenlenen A β plaklar ve hücre içerisinde NFT birikimidir. APP' nin sırasıyla BACE1 ve γ -sekretaz enzimleri tarafından proteolitik işlenmesi sonucunda oluşan A β 40 sinaps

oluşumunda rol oynarken, A β 42 patolojik özellik gösterecek şekilde birikim oluşturma eğilimindedir. γ -sekretaz aktivitesi PSEN1 ve PSEN2 tarafından sağlanmaktadır. Bu şekilde hücre içi anormal protein birikimlerine bağlı olarak tetiklenen protein temizleme temel yollarındaki (ubikuitin-proteozom sistemi ve otofaji) aksaklıkların, AH' nin oluşumu ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. PSEN1, γ -sekretaz aktivitesinin yanısıra lizozomal H⁺-ATPazın V0a1 alt biriminin (v-ATPase) N-ucundan glikozillenmesinde ve lizozoma yönlendirilmesinde rol oynayarak lizozom asidifikasyonunu etkilemektedir. *PSEN1* ve *PSEN2* gen mutasyonları, amyloid plak oluşumunu, sinir hücresi ölümünü ve lizozomal patolojiyi indükleyerek EOAD' ye neden olmaktadır. Asidifikasyon sağlanamadığından lizozomlar otofagozomlar ile birleşemez ve hücre içerisinde işlevini yerine getiremeyen otofagozomlar birikmeye başlamaktadır. Sonuçta sadece anormal protein birikimlerinin temizlenememesinde değil aynı zamanda bu hücrelerde otofaji mekanizmasının fizyolojik görevlerinde de (stres cevabı, uzun ömürlü proteinlerin geri dönüşümü, hasarlı mitokondrilerin temizlenmesi gibi) aksaklıklar görülmektedir (Neely, Green et al. 2011, Zheng and Koo 2011).

AH' nin bir diğer önemli biyobelirteci olan tau proteininin hiperfosforilasyonu hücre içerisinde birikimler oluşturma yanında mikrotübül yapısındaki kararlılığı bozması, mitokondri ve nörotransmitter içeren kesecikler dahil olmak üzere bir çok organelin taşınamamasına neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda, hasarlı protein birikimi, organel taşınmasındaki sorunlar, hasarlı mitokondriler ve yüksek ROS seviyesinin, nöronların işlevlerini bozarak toksik olacak şekilde otofagozom birikimini arttırdığı gösterilmiştir. Aslında hücrelerde korunan otofaji mekanizması, tau ve A β ' nin patolojik birikimlerinin yıkımını sağlamaktadır. Örneğin *ATG7* geninin susturulduğu farelerin ön beyinlerinde fosforile olmuş tau proteini birikmektedir (Nishida, Arakawa et al. 2009, Shimizu, Arakawa et al. 2010).

Otofaji mekanizması, tau ve A β protein birikimlerinin yıkımını sağlamaktadır. Ancak otofagozomların A β oluşumuna katkıda bulunduğunu gösteren kanıtlarda vardır. AH' de nöronlarda biriken otofagozomların APP ve PSEN1 içerdiği ve otofajinin A β üretilmesinde ve plak oluşturulmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Otofaji yolağının

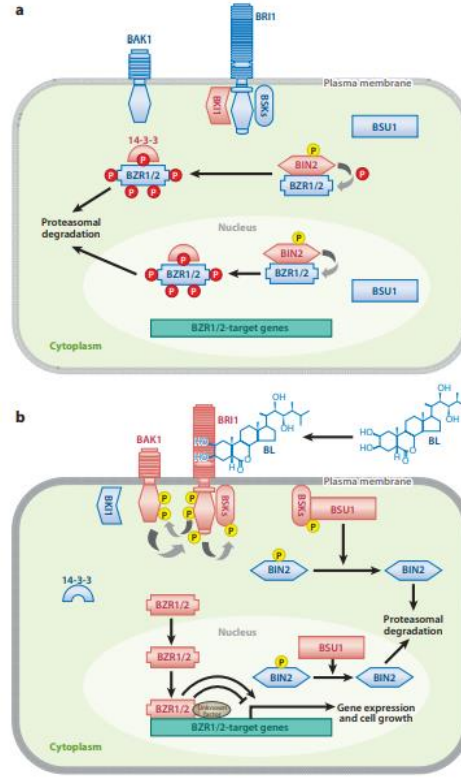
regülasyonunu sağlayan proteinlerden biri olan Beclin1' I kodlayan *BECN1* geninin mRNA anlatımının AH' li beyinlerde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca hastalıklı nöronlarda aktive olan kaspaz 3' ü Beclin1' i parçalayarak otofagozom yapısının oluşmasını engellediği düşünülmektedir. Sonuç olarak AH' de otofaji, protein agregatlarına karşı koruyucu etki gösterirken, anormal derecede otofagozom birikiminin otofaji mekanizmasını bozması ve nöronlar için toksik olması da AH' nin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Kocatürk and Gözüaçık 2017) .

2.4. EPİBRASSİNOLİD (EBR)

Brassinosteroid (BR) ailesinden olan 24-Epibrassinolid (EBR) 480,345 g/mol molekül ağırlığına ve C₂₈H₄₈O₆ kapalı formülüne sahip steroid türevli bir hormondur. BR' ler hücre uzaması ve bölünmesi, kök büyümesi ve yer çekimine karşı cevap, fotomorfogenez, stomatal ve vasküler farklılaşma, tohum çimlenmesi, üreme, bağışıklık, oksidasyon ürünlerinin eliminasyonu, etilen sentezi, biyotik ve abiyotik stres cevabı gibi pek çok olayda rol oynayan fitohormonlardır (Carange, Longpré et al. 2011, Tang, Han et al. 2016). Genellikle ER' de sentezlenen BR' ler, yapısal olarak memeli hücrelerindeki kolesterolden türevlenen ve etkileri bilinen; östrojen, testosteron ve progesterone vb. steroid hormonlar ile benzer işlevlere sahip oldukları düşünülmektedir (Steigerová, Rárová et al. 2012, Tang, Han et al. 2016). Ancak steroid hormonlar bitki ve hayvan hücrelerinde farklı moleküler etkileşimlere sahiptirler. Hayvanlardaki steroid hormonlar hücre dışında taşıyıcı proteinlere bağlı halde bulunur ve hücre içerisine ya plazma membranındaki bazı reseptörlere bağlanarak alınırlar ya da hidrofobik yapılarından dolayı plazma membranında çözünerek geçmektedirler. Plazma membranından difüze olan steroid hormonlar sitoplazma veya nukleusta kendilerine özgü olan steroid hormon reseptörlerine (SR) bağlanarak, hedef genlerini aktive ya da inhibe etmektedirler (Vukašinović and Russinova 2018).

Bitkilerde ise stress koşullarında EBR gibi steroid hormonlar plazma membranındaki Brassinolid duyarlı reseptörlere (BRI1) bağlanmaktadır. BRI1 sitosolik bölgesinde Ser/Thr ve Tyr kinaz özelliğine sahiptir. EBR' nin BRI1' e bağlanması, eş reseptörü olan BRI1 ilişkili reseptör kinaz-1 (BAK1)' i aktive ederek, çeşitli fosforilasyon ve

defosforilasyonlardan oluşan sinyal mekanizması tetiklenmektedir. Hayvan ve bitki hücrelerinde yüksek oranda korunan bir fosforerin bağlanma protein olan PKC inhibitör protein-1, EBR varlığında ilk önce BRI1' e bağlı BRI1 kinaz inhibitör-1 (BKI1)' in fosforile olarak, PKC inhibitör protein-1 tarafından inhibe edilmesi sağlanmaktadır. Bu durum da BRI1' in aktivitesi artırılarak EBR ile etkileşime girmesi sonucu BR sinyali kinaz-1 (BSK1) ve temel dönüşümsel büyüme-1 (CDG1) kinazların fosforilasyon aracılı aktivasyonları tetiklenmektedir. Bu aktifleşme sonucu fosforile olan BRI1 baskılayıcı-1 (BSU1) fosfatazi aktive olmaktadır. BSU1 ve PP2A' nın aktivasyonu GSK3benzeri bir kinaz olarak adlandırılan BR duyarlı-2 (BIN2) kinazın fosforile gruplarının uzaklaştırılarak inaktivasyonu sağlanmaktadır (Kim and Wang 2010, Kim, Guan et al. 2011). EBR sinyalinin yokluğunda hücrelerdeki Brassinazol direnç-1 (BZR1) ve BR duyarlı Etil metansülfonat baskılayıcı-1 (BES1) proteinlerinin BIN2 tarafından fosforilasyonu ve PKC inhibitör protein-1 tarafından tutulumu aracılığıyla inaktive olarak bu iki proteinin DNA' ya bağlanması durdurularak transkripsiyon yapması engellenmektedir. EBR' nin fazla olması durumunda ise BIN2 proteinin BSU1 tarafından proteozomal yıkımla inaktivasyonu sağlanarak PP2A aracılığıyla BZR1 ve BZR2 proteinleri defosforile olup nukleusa göçmeleri ve hedef genlerini aktive etmeleri sağlanmaktadır (Peng, Yan et al. 2008, Yu, Li et al. 2011, Tang, Han et al. 2016).



Şekil 2. 18 Bitkilerde EBR' nin varlığında (b) ve yokluğunda (a) brassinosteroid reseptörleri ve moleküler etkileşimleri (Kim and Wang 2010).

EBR bitkilerdeki tirozin kinaz reseptörleri açısından incelendiğinde memeli hücrelerinde benzer işlevlere sahip olan tirozin kinaz inhibitörleriyle etkileşebileceği düşünülmektedir. Buna göre EBR' nin bitkilerde GSK3 benzeri protein BIN2' nin inhibisyonundaki reseptör-ligand ilişkisine bakıldığında memeli hücrelerindeki tirozin kinaz reseptörleri ile zıt etkili olarak çalışarak memelilerdeki GSK3' ün hücre çoğalmasını üzerindeki etkisinin inhibisyonunu tetiklediği düşünülmektedir (Ehsan, Ray et al. 2005, Vukašinić and Russinova 2018) .

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 3.1’de sunulmuştur.

3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 3.2’de sunulmuştur.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3.3’te sunulmuştur.

3.1.4. Kullanılan Tamponlar

3.1.4.1. 10X TBS

87,6 gr NaCl 12,11 gr Tris-Baz 800 ml distile sui le çözdürülür. pH 8’ e ayarlandıktan sonra distile sui le 1000 ml’ e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için; 500 µl 10X TBS, üzerine 500 ml hacminde olacak şekilde distile su eklenerek 1X TBS’ e dönüştürülür.

3.1.4.2. 1X TBS-Tween

1X TBS-Tween; 500 ml 10X TBS ve 500 µl Tween-20, 500 ml hacimde olacak şekilde üzerine distile su eklenerek hazırlanır.

3.1.4.3. 10X PBS

80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14.4 gr Na₂HPO₄, 2.4 gr KH₂PO₄ 800 ml distile su ile çözdürülür.

pH 7,4 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml 'e tamamlanır. Hazırlanan 10X PBS kullanılmak için; 500 µl 10X PBS, üzerine 500 ml hacimde olacak şekilde distile su eklenerek 1X PBS'e dönüştürülür.

3.1.4.4. Besiyeri Hazırlanması

450 ml negatif besiyeri içerisine 50 ml FBS ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (10,000 U/ml) eklenir. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek 50 ml'lik falkonlara süzülür.

3.1.4.5. Protein Standardı (Bovine Serum Albumin = BSA)

0,015 gr Albumin 10 ml distile suda çözündürülüp 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek süzülür.

3.1.4.6. Bradford Reagent

100 mg Comassie Brilliant Blue (6-250) 50 ml %95 etanol de çözündürülür. 100 ml %85 Fosforik asit eklenir hepsi 1 litreye tamamlanır. Filter kağıdı ile süzülür.

3.1.4.7. Hücre Lizis Tamponu (CLB)

100 µl Proteinaz inhibitörü 10 ml CLB içerisinde karıştırılır.

3.1.4.8. Harsh Strip Buffer

200 ml %10'luk SDS, 125 ml Tris-HCl (pH=6,8), 8 ml β-merkaptan etanol üzerine 675 ml distile su eklenerek karıştırılır ve 1 litreye tamamlanır.

3.1.4.9 Mild Strip Buffer

15 gr glisin, 1 gr SDS, 10 ml Tween-20 eklenerek 800 ml distile suda çözündürülür. pH 2,2'ye ayarlandıktan sonra distile suyla 1 litreye tamamlanır.

3.1.4.10. %10 Ammonium Persulphate Solution (APS)

100 mg Ammonium persulfate 1 ml distile suda çözündürülür.

3.4.1.11. Coumaric Asit (CA)

0,15 gr P-Coumaric asit 10 ml DMSO'da çözdürülür.

3.4.1.12 Luminol

0,44 gr Luminol 10 ml DMSO'da çözdürülür.

3.4.1.13. Yürütme tamponu

30,3 gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 1 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözdürülür. pH: 8.3 e ayarlanır. Hazırlanan 10X yürütme tamponu, 100 ml 10X yürütme tamponu ve 900 ml distile suyla 1000ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür ve jel yürütmesi sırasında kullanılır.

3.4.1.14. Transfer Tamponu

33,3 gr Tris-base ve 144 gr Glisin tartılarak 1000 ml distile su içinde çözdürülür. pH: 8.3 e ayarlanır. Hazırlanan 10X transfer tamponu, 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile suyla 1000 ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür ve jelin transferi sırasında kullanılır.

3.4.1.15. Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinleri ağırlıklarına göre ayırmak için %12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütüldü. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo 4'te sunulmuştur.

3.4.1.16. Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması

9 ml FBS ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılır ve hücre kültürüyle uyumlu olan 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek dondurma medyası hazırlanmıştır. Dondurma medyasıyla hücreler uzun süreli sıvı azot tankları içinde saklanabilir.

3.4.1.17. LB Agar

20 gr LB agar 1 litre suda çözdürülür ve otoklavlanır.

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücrelerin Yetiştirilmesi

Taupati modeli oluşturmak üzere kullanılan PC12 (Feokromasitoma-12) hücre hattı American Tissue Culture Collection' dan (ATCC) temin edilmiştir. PC12 hücre hattı, *Rattus norvegicus* (sıçan) böbreküstü bezindeki kromafin hücrelerinden köken alan nöroendokrin bir tümör olan feokromasitomadan elde edilmiştir. Hücreler %10 Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS), 10U/ml penisilin ve 100µg/ml streptomisin eklenen RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerinde %5 CO₂ içeren 37°C' de inkübatörde büyütülmüştür.

3.2.1.2. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması

75 cm²' lik hücre kültürü petri kabındaki hücre sayısının artması sebebiyle hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Petri kabında bulunan besin ortamı uzaklaştırılır. 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkama işlemi yapılır. 75cm² petri kabına 2 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve CO₂ içeren etüvde 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonrasında tripsin –EDTA' nın etkinliğinin durdurmak için tripsin-EDTA miktarı ile eşit miktarda RPMI besi ortamına eklenerek hücreler falkona aktarılır. +4°C' de 2000 rpm (dakikadaki dönüm sayısı birimi)'de 5 dakika santifüj işlemi yapılır ve süpernatant (üst faz) uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine 1 ml RPMI besi ortamı eklenerek pipetaj yapılır ve hücreler homojenize edilir. Hücre süspansiyonunda 10 ul alınır, Neubauer hemositometresi kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilir. Bir mililitredeki hücre sayısının öğrenilebilmesi için 10⁴ ile çarpılır. 1x10⁶ hücre, 75cm²'lik petri kabına eklenerek pasajlama işlemi yapılır.

3.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Pasaj sayıları erken olan hücreleri 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, +4°C' de 2000 rpm' de santrifüj edildikten sonra sayılmış ve yaklaşık 1x10⁶ hücre

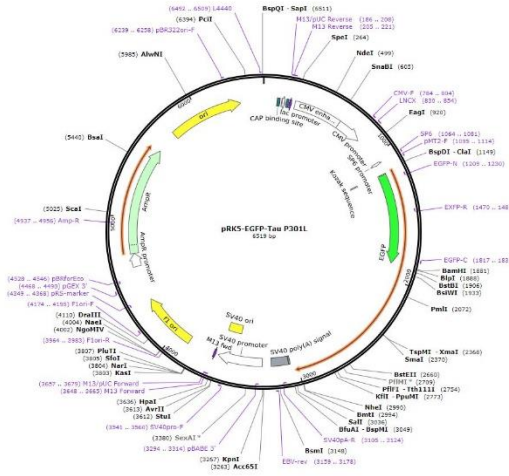
kriyovial tüplerde dondurulmuştur. Dondurma işlemi için % 10'luk DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. Gerekli görüldüğünde hücreler sıvı azottan çıkartıldıktan sonra, hızlı bir şekilde çözdürülmüş ve önceden ısıtılarak 37 °C'ye getirilmiş besiyerinde 45 cm² lik petri kaplarına alınmışlardır. Hücreler petri kabına yapıştıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve DMSO uzaklaştırılmıştır.

3.2.1. Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılık Testi (MTT)

İlk olarak PC12 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim gerçekleştirildikten sonra hücreler bir gece %5 CO₂ içeren 37°C' lik etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelerin üzerine 0-50 µM EBR uygulanmıştır. İkinci olarak aynı şekilde ekimi yapılan PC12 hücrelerine bir gece sonra 0-1 µg PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilmiştir. Tranfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücrelere 0 µg, 1 µg ve 10 µg EBR uygulaması yapılmıştır. Her iki deneyde de EBR uygulamasından 24 saat sonra hücrelerin besiyerine her kuyuya 10 µ 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) tuzu eklenmiştir. Hücrelerin 4 saat inkübasyonu sonrasında sadece canlı hücreler hidrojenaz enzimi vasıtasıyla mitokondrilerinde metabolize ettiği MTT tuzunu formazan kristallerine dönüştürmüştür. Daha sonra MTT tuzu içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve 100 µl DMSO (Dimethyl sulfoxide) uygulanıp, 10 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Formazan kristallerinin DMSO' da çözünmesiyle Bio Rad Eliza okuyucusunda 570-655 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak hücre canlılığı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların Graphpad programı kullanılarak istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Bakterilerden Plazmit İzolasyonu

pRK5-EGFP-P301L-Tau ekspresyon vektörü (Şekil 3.1) transfekte edilmiş *E.coli* (*Escherichia coli*) bakterileri ampisilin içeren Luria Bertani (LB) besiyerine ekilip 37°C de 16-18 saat boyunca çalkalayıcıda büyütülmüştür. Daha sonra bakteri süspansiyonlarının NanoDrop (Nanophotomer spectroscopy) cihazı kullanılarak OD₂₆₀ (optical density) değerleri ölçülmüş ve uygun bulunanlar ZymoPURE™ Plazmid Miniprep Kit (Catalog Nos. D4208, D4209, D4211 & D4212)' i kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitler -20°C' de saklanmıştır.



Şekil 3. 1 PC12 hücre hattına transfeksiyonu yapılan mutant tip PRK5-EGFP-P301L-TAU plazmiti (<https://www.addgene.org/browse/sequence/123033/>).

3.2.3. Plazmit Transfeksiyonu

PC12 hücreleri 60 mm' lik hücre kültürü petrilere 2×10^5 olacak şekilde ekilip, 24 saat boyunca 37°C ' de %5 CO_2 içeren inkübatörde büyütülmüştür. Ardından hücrelere membran yapılarından kolaylıkla geçebilecek lipide çözünebilir bir transfeksiyon ajanı yardımıyla PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidini aktarılmıştır. Konsantrasyonu $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ olan PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidinden 1:3 plazmid transfeksiyon ajanı (FuGENE® HD Transfection Reagent, PROMEGA) oranında hazırlanarak transfeksiyon yapılmıştır. Bu işlem için iki ayrı mikrotüp alınarak birincisinin içerisine antibiyotik (penisillin-streptomisin) ve %10 FBS içermeyen 47 μl RPMI ve 3 μl transfeksiyon ajanı, ikincisinin içerisine yine antibiyotik ve % 10 FBS içermeyen RPMI ve $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PRK5-EGFP-P301L-TAU plazmidini konularak bu karışımlar 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu iki mikrotüp içerisindeki tek bir tüpe aktararak 15 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bu karışım 1900 μl % 10 FBS ve antibiyotik içeren RPMI besiyeri bulunduran 60mm' lik hücre kültürü petrilere bulunan PC12 hücreleri üzerine damla damla olacak şekilde verilmiştir.

3.2.4. İmmunoblotlama

3.2.4.1. Total Protein İzolasyonu

PC12 hücreleri 60mm'lik hücre kültürü petrilere 200.000/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve uygun miktarda besiyeri ortamı (RPMI besiyerinde %10 sığırcı fetüsü serumu ve 10 U/ml

penisilin/streptomisin) eklenmiştir. Bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücelere 24 saat boyunca PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidini ve 10µM EBR uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri atılmış, hücreler soğuk izotonik tuz çözeltiler olan Tris-tamponlu tuz çözeltisi (1X TBS) ya da Fosfat-tamponlu tuz çözeltisi (1X PBS) ile bir kez yıkanmış ve tekrar 1X PBS (1X TBS) eklenmiştir. Fosforile olmayan proteinlerin elde edilmesi için PBS, fosforile proteinlerin elde edilmesi için ise TBS kullanılmaktadır. Atıldan kazıyıcı yardımı ile hücreler kaldırılmış ve 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine alınmışlardır. Tüpler +4°C' de 1 dakika 13200 rpm' de santrifüj edildikten sonra, süpernatant (üst faz) atılmıştır. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Çökeltinin üzerine hücre protein özütleme tamponu, %10 proteaz inhibitörü ilavesi (CLB-Cell Lysis Buffer) eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra +4°C'de 20 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar yeni mikrotüplere alınarak total protein tayini için -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. Sitoplazmik ve Nükleer Protein İzolasyonu

PC12 hücreleri 60mm'lik hücre kültürü petrilere 200.000/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı (RPMI besiyerinde %10 sığır fetüsü serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin) eklenmiştir. Bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücelere 24 saat boyunca PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidini ve 10µM EBR uygulanarak Thermo Scientific, Ne-Per™ kiti protokolüne göre nükleer-sitoplazmik protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Bradford Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin miktar tayinini yapabilmek amacıyla Bradford tekniği kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5ug/ul olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart bir eğri elde edilmiştir. Bu eğri şu şekilde oluşturulmuştur: 96 kuyucuklu hücre kültüre petrisine 1,5ug/ul, 3ug/ul, 4,5ug/ul, 6ug/ul, 7,5ug/ul BSA ve 24 saat boyu PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidini ve EBR ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen proteinlerden 1ug/ul eklenmiştir. Üzerlerine 200ul Bradford çözeltisi eklenerek 5 dakika karanlıkta inkübe edilip Bio Rad Eliza okuyucusunda 595nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu

grafığın eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.4.4. Proteinlerin SDS-PAGE Jelde Yürütülmesi

Konsantrasyonları hesaplanan proteinler, içeriğinde; Sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanı, gliserol, 2-merkaptoetanol, bromofenol mavisi ve pH 6,8 Tris-Hidroklorik asit bulunan 5X Laemli boyası eklenerek 95 °C' de 5 dakika ısıtıcıda denature edilmiştir. Hazırlanan proteinler hedef kDa' ya göre %10, %12 veya %15' lik akrilamid/ bis-akrilamid konsantrasyonuna sahip jelle Bradford protein miktar tayinine göre belirlenen konsantrasyonlarda yüklenerek yürütme tamponu olan tankta SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrılmışlardır. Jeller hedeflenen proteinlerin kDa' larına göre farklı sürelerde ve farklı voltaj uygulanarak yürütülmüştür.

3.2.4.5. Membrana Transfer ve Bloklama

Jelde yürütülen proteinler farklı kalınlardaki (0,2 mm veya 0,45 mm) Poliviniliden diflorür (PVDF) membranlar kullanılarak transfer edilmiştir. Bu amaçla önce kullanılacak PVDF membran metanol ile aktif hale getirilmiştir. Jeldeki proteinler, wet veya semi transfer yöntemleri kullanılarak membrana transfer edilmiştir. Proteinlerin transfer olduğu membran, Tween deterjanı içeren TBS solüsyonu (1X TBS Tween, 1X TBS-T) ve %5 yağsız süt kullanılarak hazırlanmış olan bloklama solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

3.2.4.6. Birincil ve İkincil Antikor İşaretlemeleri

İnkübasyon sonrası membranlar hedef proteine özgün 1:1000 oranında 1X TBS-T ve %5 yağsız süt ile dilüe edilmiş birincil antikorda bir gece boyunca +4°C' de inkübe edilmiştir. Birincil antikorda bekleyen membran *Armoracia rusticana* (bayır turpu) bitkisinden izole edilen peroksidaz (HRP) enzimi ile konjuge edilmiş olan birincil antikora özgün 1:3000 oranında 1X TBS-T ve %5 yağsız süt ile dilüe edilmiş ikincil antikora alınmadan önce 3 kez 1X TBS-T çözeltisi ile yıkanır ve ikincil antikorla 1 gece boyunca +4°C' de inkübe edilmiştir. Ardından birincil ve ikincil antikorların spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek için 3 kez 1X TBS-T ve 1 kez de 1X TBS solüsyonu ile muamele edilerek Tween deterjanından arındırılmıştır. Hedef proteine özgü antikorlar ile muamele edilen PVDF

membranlar daha sonra içeriğinde; HRP' nin substratı Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ve kemilüminesans bir madde olan lumünol bulunan solüsyonla muamele edilerek Bio-Rad ChemiDoc™ Imaging System cihazı kullanılarak UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.2.5. Floresan Boyama

3.2.5.1. Diheksilokarbosiyanin İyodür ($DiOC_6$) Boyama

PC12 hücre hattında mitokondri membran potansiyelindeki değişiklikleri göstermek amacıyla $DiOC_6$ boyama yapılmaktadır. İçsel (Intrinsic) yolak üzerinden gerçekleşen apoptotik hücre ölümünde mitokondri membran potansiyelinin bozularak membrana ait bazı bileşenler sitosole salınmaktadır. $DiOC_6$ (482/504 nm) lipofilik özellikte bir boya olup floresan mikroskobu altında mavi renge ait dalga boyundaki ışığı absorbe ederek yeşil renkte dalga boyuna sahip ışık yaymaktadır. Bu özelliği nedeniyle canlı hücrelerin mitokondrilerine seçici olarak bağlanarak floresan mikroskobu altında canlı hücrelerin tayininde kullanılmaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilip 24 saat beklenmiş ve sonrasında 10 µg EBR (5mM) ile bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 1nM $DiOC_6$ (ana stok: 4mM) boyası uygulanarak 10 dakika boyunca etüvde bekletilip floresans mikroskobunda mavi filtre altında canlı hücreler belirlenmiştir.

3.2.5.2. Propidyum İyodür (PI) Boyama

PI, canlı hücrelerin membranlarından geçemeyen ancak ölü hücrelerde membran yapısının bozulmasından dolayı hücre içine nüfuz ederek DNA' ya bağlanabilen bir boyadır. Bu özelliği sayesinde floresan mikroskobu altında canlı ve ölü hücrelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Floresan mikroskobunda yeşil renkli dalga boyuna ait ışığı absorbe ederek kırmızı renkli dalga boyuna ait ışığı yaymaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilip 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra yine 24 saat boyunca 10 µg EBR (5mM) uygulaması gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 2 µg/ml PI (485/535 nm) (ana stok: 50 mg/ml) boyası uygulanarak 15 dakika etüvde bekletildikten sonra floresan mikroskobunda yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir.

3.2.5.3. 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

PC12 hücre hattında apoptotik hücre ölümüne bağlı olarak DNA' nın çeşitli endonukleazlar ile kesilmesi sonucu oluşan DNA kırıklarının gösterilmesinde DAPI boyası kullanılmaktadır. DAPI boyası oluşan DNA kırıklarına bağlanarak apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu altında gösterilmesini sağlamaktadır. DAPI boyası floresan mikroskobunda açık mavi renk (aqua) dalga boyundaki ışığı absorbe ederek mavi renkte bir ışık yaymaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilmiştir. 24 saat sonra hücrelere 10 µg EBR (5 mM) uygulaması yapıp bir gün süresince inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1 µl/ml DAPI (350/470 nm) (ana stok: 1mM) boyası uygulanarak 30 dakika etüvde bekletildikten sonra floresan mikroskobunda mavi filtrede DNA kırıkları gözlemlenmiştir.

3.2.5.4. Dikloro-Dihidro-Fluoreskein Diasetat (DCFH-DA) Boyama

PC12 hücre hattında, tau anlatımını arttırmak amacıyla pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi ve EBR uygulamasına bağlı olarak hücrel stresin bir göstergesi olan ROS oluşumu DCFH-DA boyası kullanılarak gösterilmektedir. DCFH-DA boyası fluoresans mikroskobunda mavi renkli dalga boyuna ait ışığı absorbe ederek yeşil renkte bir ışık yaymaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilip 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Sonrasında yine 24 saat boyunca 10 µg EBR (5mM) uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuktaki 1 ml RPMI besiyerine 2 µg/ml DCFH-DA (495/529 nm) boyası uygulanarak 15 dakika etüvde bekletilmiştir. Ardından floresan mikroskobu altında mavi filtrede ROS gözlemlenmiştir.

3.2.6. Hücre Akış Sitometresi

3.2.6.1. Hücre Akış Sitometrisinde PI Analizi

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi ve EBR uygulamasına bağlı olarak PC12 hücre popülasyonunun hücre devri fazlarındaki dağılımını DNA içeriğine göre analiz etmek için PI boyası kullanılmaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilip 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra yine 24 saat boyunca 10 µg EBR (5mM) uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler Tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp +4°C' de 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri 1X PBS ile yıkandıktan sonra 500 µl %70' lik soğuk etanol ile muamele edilip 1 hafta boyunca -20°C' de inkübe edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler +4°C' de 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Ardından 1X PBS ile yıkanan hücre pelletleri santrifüjlenerek PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelletler önce 245 µl (BD Pharmingen™ kiti) bağlama solüsyonunda çözülüp sonrasında ise 2,5 µl RNaz (10 mg/ml) ve 2,5 µl PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilen hücreler FL-2A filtresi (585/40 nm) kullanılarak 10^3 hücrenin (BD Accuri™ C6) hücre akış sitometresi cihazında analizi yapılmıştır.

3.2.6.2. Annexin V/PI Boyama

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi ve EBR uygulamasına bağlı olarak PC12 hücre popülasyonundaki sağlıklı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreleri göstermek amacıyla FITC Annexin V ve PI boyası kullanılmıştır. Sağlıklı hücrelerin membranlarının sitoplazmaya bakan yüzeylerinde konumlanmış olan fosfatidilserinler apoptotik hücrelerde flip-flop olarak tanımlanan bir hareketle membranın ekstrasellüler yüzeyine göçetmektedir. Annexin V boyası da bu fosfatidilserinlere bağlanarak apoptotik hücrelerin tayininde rol oynamaktadır. PI boyası ise membrane yapısı bozulmuş olan geç apoptotik ve nekrotik hücreleri boyamaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce PRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi

transfekte edilip 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Sonrasında yine 24 saat boyunca 10 µg EBR (5mM) uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler Tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp +4°C' de 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 1X PBS ile yıkanan hücre pelletleri santrifüjlenerek PBS uzaklaştırılmıştır. Ardından 245 µl bağlama solüsyonunda çözünen hücre pelletlerine 2,5 µl (50 µg/ml) Annexin V (535/617 nm) ve PI (485/535 nm) boya eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücre akış sitometresi cihazında FL-1A filtresi kullanılarak 10³ hücrenin analizi yapılmıştır.

3.2.6.3. Reaktif Oksijen Türleri Analizi

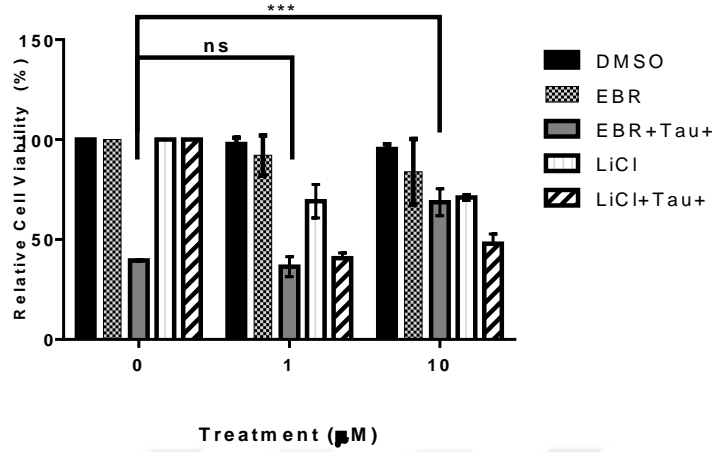
PC12 hücre hattında pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi ve EBR uygulaması sonucunda ortaya çıkan ROS seviyesini göstermek için DCFH-DA boyası kullanılmaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilip 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Ardından 24 saat boyunca 10 µg EBR (5mM) uygulanmıştır. Tripsin/EDTA ve 1X PBS uygulama işlemlerinden sonra elde edilen hücre pelletlerine 2 µg/ml DCFH-DA (495/529 nm) boyası eklenip hücre akış sitometresi cihazında FL-2A filtresi kullanılarak 10³ hücrenin analizi yapılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. PRK5-EGFP-P301L-TAU PLAZMİDİ AKTARILMIŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilmiş ve edilmemiş PC12 hücrelerinde potansiyel GSK3 β inhibitörü olan EBR' nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini göstermek için MTT testi yapılmıştır. EBR' nin toksisitesi çok düşük olan ve hücre sağkalımını tetiklediği düşünülen 1 ve 10 μ M dozları seçilerek hem plazmit aktarılmış hem de doğal tip PC12 hücrelerine uygulanmıştır. Ayrıca EBR gibi potansiyel bir GSK3 β inhibitörü olan LiCl' de EBR ile aynı dozlarda uygulanarak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Buna göre doğal tip PC12 kontrol hücrelerindeki canlılık 100 olarak kabul edilerek diğer kondüsyonların uygulandığı hücrelerin bağıl hücre canlılıkları belirlenmiştir.

Doğal tip PC12 hücrelerine 1 ve 10 μ M EBR uygulaması ile aynı dozlardaki LiCl uygulamasının hücre canlılığı oranı üzerindeki etkisinin paralel olduğu tespit edilmiştir. pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmit transfeksiyonu ile hücre canlılığının, doğal tip PC12 kontrol grubuna göre büyük oranda düştüğü ancak 1 μ M EBR uygulaması ile anlamlı bir değişiklik olmazken, 10 μ M EBR uygulaması ile hücre canlılığının büyük oranda arttığı gösterilmiştir. pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi aktarılan hücrelere 1 ve 10 μ M LiCl uygulandığında ise hücre canlılığı EBR uygulaması kadar etkin bir şekilde artmamıştır. Sonuç olarak MTT analizine göre EBR' nin doza bağlı uygulaması LiCl' nin doza bağlı uygulaması ile benzer toksisite göstermekle birlikte EBR' nin anti-nörodejeneratif etkisinin LiCl' ye göre daha az olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak (1 ve 10 µM) EBR ve LiCl uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi. DMSO, EBR ve LiCl çözücüsü olarak kullanılmıştır, hücre canlılığına etkisi gözlemlenmemiştir.

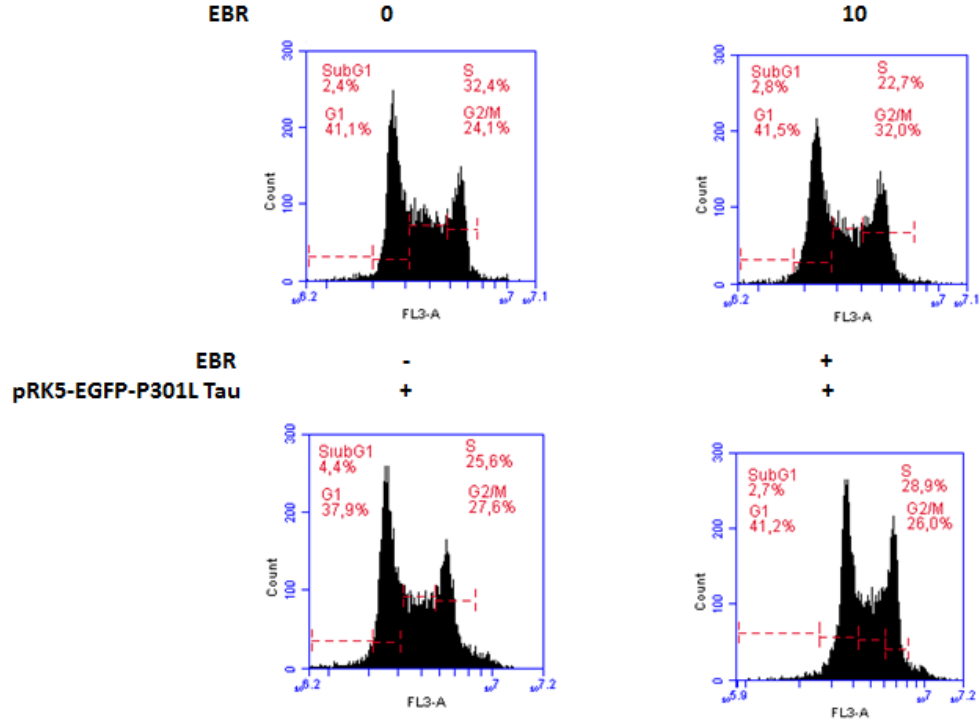
4.2. PRK5-EGFP-P301L-TAU PLAZMİDİ TRANSFEKTE EDİLEREK TAUPATI MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN DOZA BAĞLI OLARAK HÜCRE DEVRİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi aktarılmış ve doğal tip PC12 hücrelerine 10 µM EBR uygulamasının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin gösterilmesi için PI boyası uygulanarak hücre akış sitometresi tekniği kullanılmış ve analizi gerçekleştirilmiştir.

Doğal tip PC12 hücrelerinde ölü hücreleri gösteren Sub-G1 fazındaki popülasyon kontrol grubunda %2,4 iken, 10 µM EBR uygulaması ile %2,8' e yükselmiştir. Kontrol grubunda %41,1 olan G1 fazındaki hücre popülasyonu, 10 µM EBR uygulaması ile %41,5' e yükselmiştir. S fazı popülasyonu ise kontrol grubunda %32,4 iken 10 µM EBR uygulaması ile %22,7' ye gerilemiştir. Kontrol grubunda %24,1 olan G2/M fazı popülasyonu ise 10 µM EBR uygulaması ile %32' ye yükselmiştir.

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilmiş PC12 hücreleri ile doğal tip PC12 kontrol grubu karşılaştırıldığında; Sub-G1 fazı popülasyonu %4,4' e yükselirken G1 fazı popülasyonu %37,9' a gerilemiştir. S fazı %25,6' ya düşerken G2/M fazındaki hücre popülasyonu %27,6' ya yükselmiştir. pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi aktarılmış PC12 hücrelerine 10 µM EBR uygulaması ile Sub-G1 fazı %2,7' ye gerilerken G1 fazı

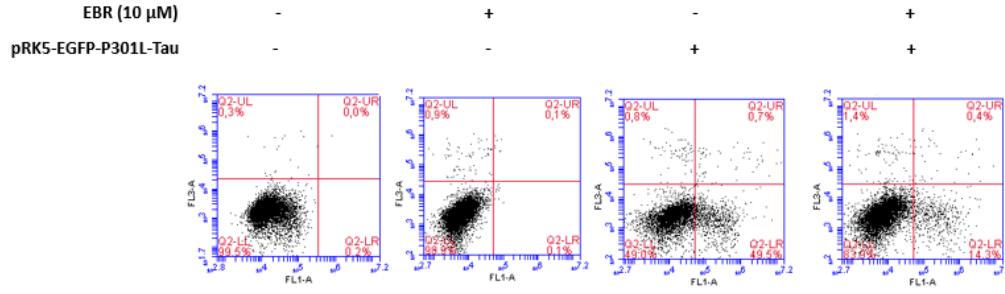
popülasyonu %41,2' ye yükselmiştir. Bununla birlikte S fazındaki hücre popülasyonu %28,9 çıkarken G2/M fazındaki popülasyon %26' ya gerilemiştir.



Şekil 4. 2 Doğal tip ve pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilen PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücre devri üzerindeki etkisinin gösterilmesi.

4.3. *İN VİTRO* TAUPATİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidi transfekte edilen ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisini göstermek amacı ile farklı kondüsyonlara ait hücreler kaldırılarak Annexin-V/PI boyası uygulanmış ve hücre akış sitometresinde analizleri yapılmıştır.



Şekil 4. 3 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 µM EBR' nin hücre ölümü üzerindeki etkisinin Annexin-V/PI boyama yöntemi kullanılarak hücre akış sitometresinde gösterilmesi. Hücre akış sitometresinden elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür.

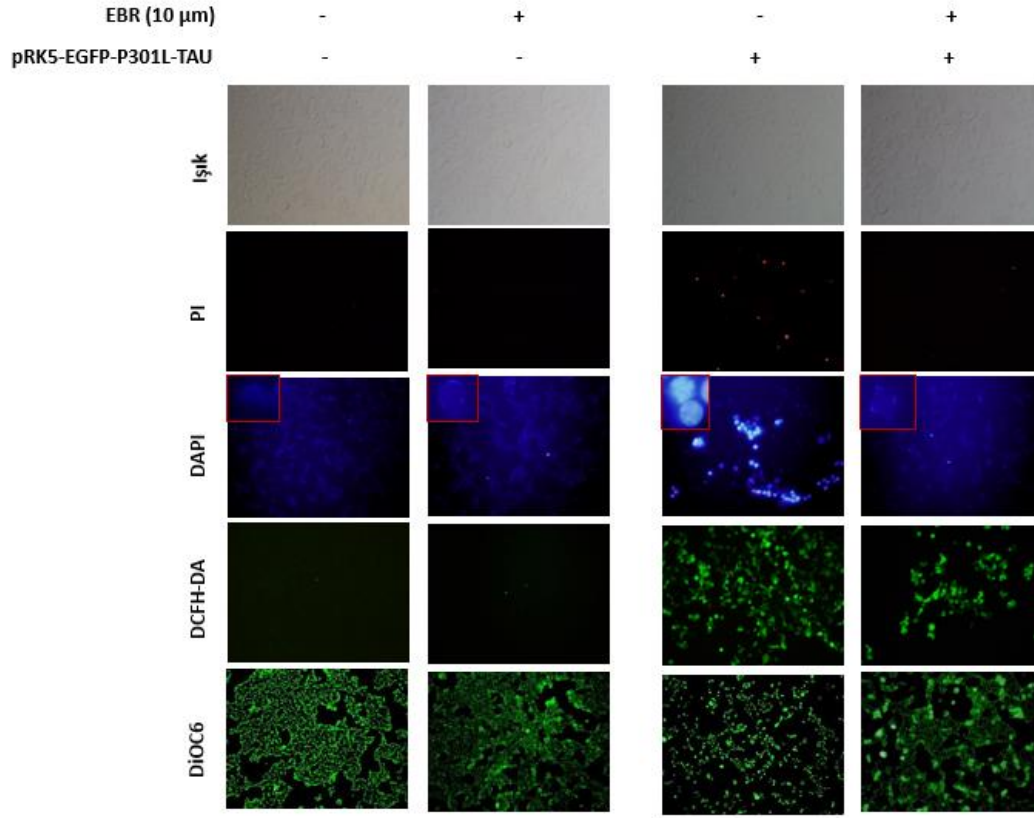
Buna göre canlı hücre popülasyonunu temsil eden sol alt bölmedeki hücre miktarı oranı, kontrol grubunda %99,5 sadece 10 µM EBR uygulamasıyla %98,9 iken pRK5-EGFP-P301L-TAU plazmiti tranfekte edilerek tau anlatımının arttırıldığı hücrelerde %49' a gerilerken sağ alt bölmedeki erken apoptotik hücre popülasyonu oranı %0,1' den %49,5' e yükselmiştir. Geç apoptotik hücreleri temsil eden sağ üst bölmedeki hücre popülasyonu oranı %0' dan %0,7' ye, sol üst bölmedeki nekrotik hücreleri gösteren hücre popülasyonu oranı da %0,3' den %0,8' e yükselmiştir. Plazmit transfeksiyonuna bağlı olarak tau anlatımının arttırıldığı hücrelere 10 µM EBR uygulandığında canlı hücre popülasyonununun %83,9' a yükseldiği görülmüştür. Erken apoptotik bölmedeki hücre popülasyonu oranında belirgin bir düşüş olurken geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler, doğal tip PC12 hücrelerinde 10 µM EBR uygulaması kontrol grubu ile kıyaslandığında toksik etki görülmemektedir ancak pRK5-EGFP-P301L-TAU plazmiti aktararak tau anlatımı arttırılmış hücrelerde EBR uygulaması nörokoruyucu etki göstermektedir.

4.4. *İN VİTRO* TAUPATI MODELİ OLUŞTURULMUŞ VE DOĞAL TİP PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN APOPTOTİK ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidini tranfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 µM EBR uygulamasının hücre ölümü (PI), mitokondri membran potansiyeli (DiOC₆), DNA kırıkları (DAPI) ve ROS üretimi (DCFH-DA)

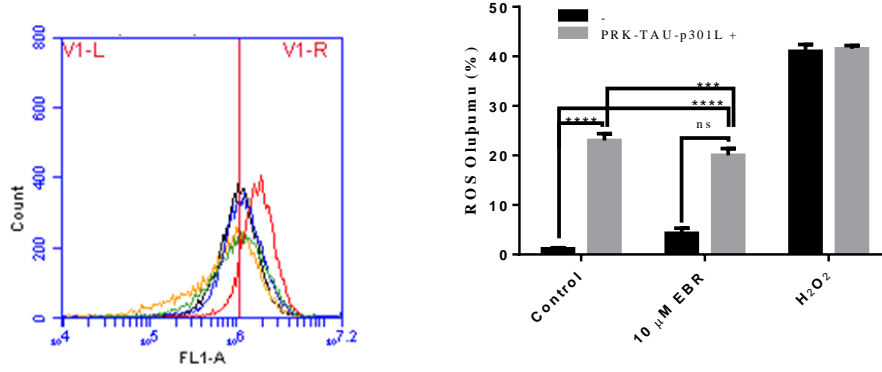
üzerindeki etkisi çeşitli boyamalar ile fluoresan mikroskobunda gösterilmiştir. İlk olarak ışık mikroskobu çekimleri incelendiğinde , tau anlatımının arttırıldığı PC12 hücrelerinde, hücre yoğunluğu azalırken, bu hücelere 10 µM EBR uygulaması nörokoruyucu etki gösterdiğinden hücre yoğunluğunun belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir.

Tau anlatımı arttırılmış ve doğal tip PC12 hücrelerinde PI, DiOC₆, DAPI ve DCFH-DA boyamaları yapılarak fluoresan mikroskobunda uygun filtreler altında görüntülenmiştir. Buna göre kontrol gruplarında ve sadece 10 µM EBR uygulanan doğal tip PC12 hücrelerinde, hücre yoğunlukları değişmezken PI boyamasının yapıldığı taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde, nekrotik ve geç apoptotik hücre miktarı artmış ve bu hücelere 10 µM EBR uygulamasıyla bu miktar azalmıştır. DAPI boyamasında da, tau anlatımının arttırıldığı hücrelerde DNA kırıkları kontrole göre daha fazlayken bu hücelere 10 µM EBR uygulamasıyla gerilediği gözlenmiştir. DCFH-DA boyaması ile tau anlatımının arttırıldığı hücrelerde kontrole göre hücresele ROS miktarı önemli oranda artarken, 10 µM EBR uygulaması ile tekrar azalmıştır. DiOC₆ boyamasında, taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde kontrol grubuna kıyasla oldukça azalan mitokondri membran potansiyelinin, 10 µM EBR uygulamasıyla tekrar arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 4 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücre ölümü (PI), mitokondri membran potansiyeli (DiOC₆), DNA kırıkları (DAPI) ve ROS üretimi (DCFH-DA) üzerindeki etkisinin floresan mikroskopisi ile gösterilmesi.

Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının hücrel ROS üretimi üzerindeki etkisinin DCFH-DA boyaması aracılığıyla hücre akış sitometresi ile analizi gerçekleştirilerek sayısal olarak gösterilmiştir. Sonuçta floresan mikroskopu görüntüleri ile paralel veriler elde edilmiştir. ROS miktarının tau anlatımının arttırılması ile tetiklendiği ancak bu hücreler 10 μ M EBR uygulaması ile geri çekildiği gözlenmiştir.

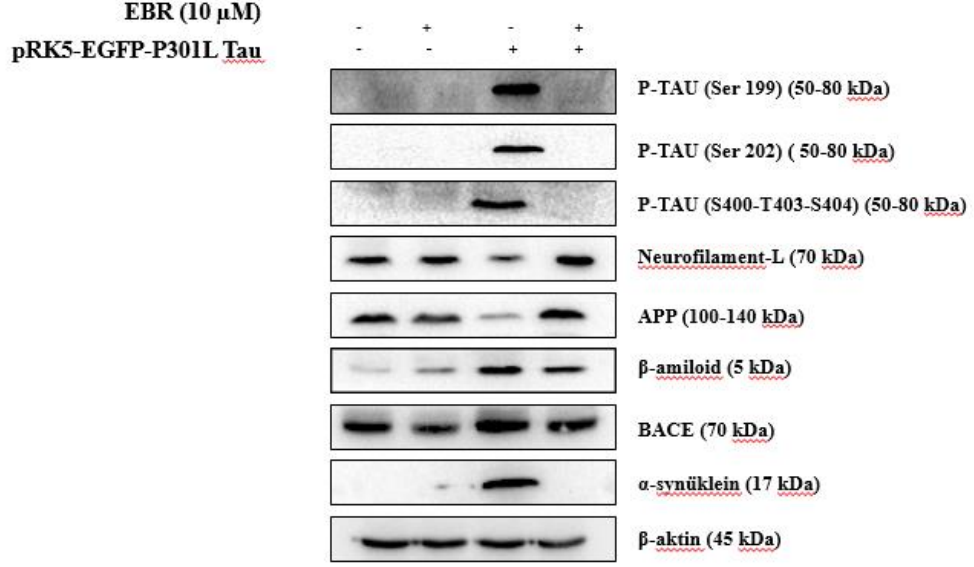


Şekil 4. 5 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde EBR uygulamasının ROS üretimi üzerindeki etkisinin hücre akış sitometresi ile gösterilmesi. Farklı renklerle ifade edilen kondüsyonlardaki PC12 hücreleri kaldırılmış, DCFH-DA boyaması yapılarak karanlıkta inkübe edilmiş ve ardından hücre akış sitometresinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler BD C6 Biosciences programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür.

4.5. POTANSİYEL GSK3B İNHİBİTÖRÜ EBR' NİN TAUPATI MODELİ OLUŞTURULMUŞ PC12 HÜCRELERİNDE AH BİYOBELİRTECİ PROTEİNLERİN ANLATIMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

pRK5-EGFP-P301L-Tau ekspresyon vektörü transfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerine 10 μ M EBR uygulamasının çeşitli AH biyobelirteci veya hastalıkla ilişkili proteinlerin anlatımı ve fosforilasyonu üzerindeki etkisi immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde, p-tau (Ser 199, Ser 202 ve S400-T403-S404) seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artarken bu hücrelere 10 μ M EBR uygulaması ile anlatımlarının tamamen gerilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca tau anlatımının artırılması ile Nörofilament-L seviyesinin kontrole göre azaldığı, 10 μ M EBR uygulamasına bağlı olarak Nörofilament-L anlatımının kontrol grubuna kıyasla daha fazla arttığı tespit edilmiştir. AH' ın bir diğer önemli biyobelirteci olan APP' nin taupati modeli oluşturulan hücrelerde kesilimine bağlı olarak anlatımının azaldığı ancak 10 μ M EBR uygulaması ile anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. APP' nin kesilim ürünlerinden olan β -amiloidin anlatımı ise plazmit transfekte edilmiş hücrelerde kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artarken 10 μ M EBR uygulaması ile anlatımı azalmıştır. APP' nin kesiliminden sorumlu enzimlerden biri olan total BACE anlatımının, taupati modelinde kontrole göre artarken, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulaması ile geri çekildiği gösterilmiştir. A β ile etkileşime

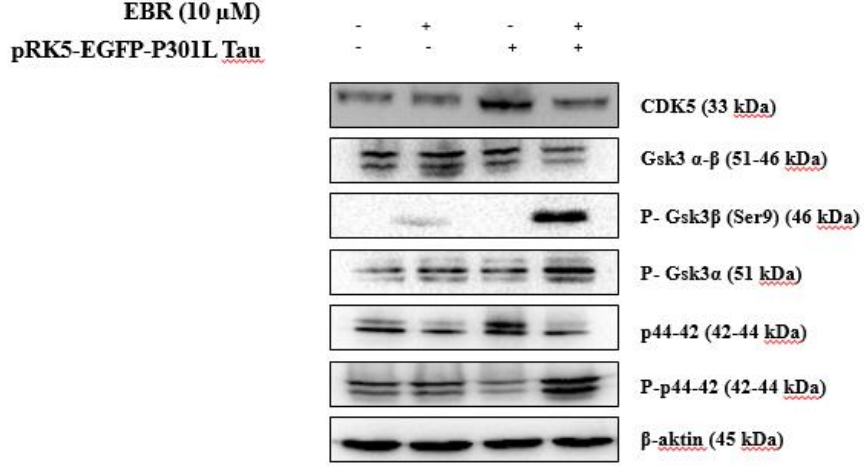
girerek Amiloid plak oluşumu ve tau birikiminin tetiklenmesinde rol oynayan α -synüklein anlatımı taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde kontrol grubuna kıyasla artarken 10 μ M EBR uygulaması ile tamamen geri çekilmiştir.



Şekil 4. 6 pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmiti transfeke edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR' nin AH biyobelirteci olan ve AH ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immünoblotlama yöntemiyle gösterilmesi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmış olup bu sonuçlar en az 3 bağımsız tekrarı temsil etmektedir.

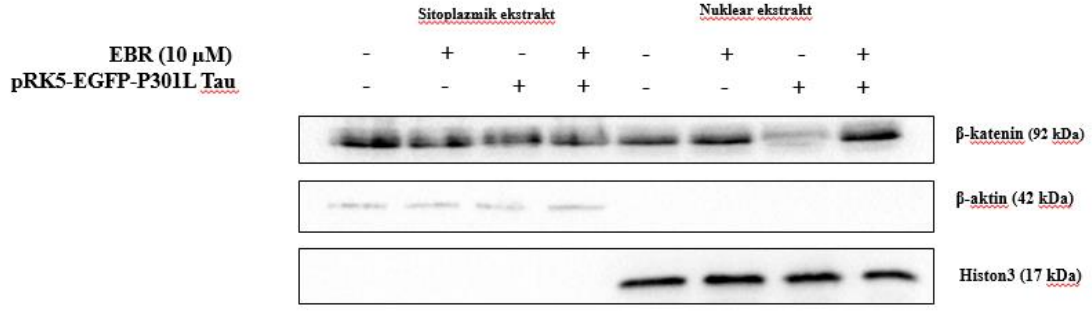
Tau kinazlardan CDK5' in anlatımı taupati modelinde artarken bu hücrelere 10 μ M EBR uygulaması ile belirgin olarak azalmıştır. pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmidini transfeke edilerek tau anlatımının artırılması ile kontrole göre artan GSK3 α ve GSK3 β seviyelerinin, potansiyel GSK3 β inhibitörü olan EBR uygulamasıyla azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte GSK3 β ' nin Ser9 inhibe edici fosforilasyonu seviyesinin, taupati modelinde total GSK3 β miktarındaki artışa bağlı olarak arttığı fakat bu hücrelere 10 μ M EBR uygulanması ile total GSK3 β anlatımının düşmesine karşın Ser9 fosforilasyonunun daha fazla arttığı gösterilmiştir. MSS' de GSK3 β kadar etkin rol oynamayan GSK3 α ' nın Ser21 inhibe edici fosforilasyonunun, taupati modelinde total GSK3 α anlatımında, kontrol grubuna belirgin bir değişiklik olmazken, bu hücrelere 10 μ M EBR uygulaması ile total GSK3 α anlatımı düşmesine karşın GSK3 α Ser21 fosforilasyonunun daha fazla arttığı gözlenmiştir. Bu sınıfa ait bir başka protein olan p44/42 nin anlatımı ise taupati modelinde artarken 10 μ M EBR uygulaması ile kontrol

grubuna göre oldukça azalmıştır. Bununla birlikte p44/42' nin aktive edici fosforilasyonları Thr 202/Tyr 204' ün anlatımı ise pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmiti transfekte edilmiş PC12 hücrelerinde kontrol grubuna göre azalırken 10 µM EBR uygulaması anlatımını çok yüksek seviyede tetiklemiştir.



Şekil 4. 7 Potansiyel GSK3β inhibitörü olan EBR' nin taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde AH ile ilişkili kinazlar ve proteazlar üzerindeki etkisinin immüno blotlama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır. Sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 tekrarı temsil etmektedir.

NPC (nöral öncül hücre)' lerde nöral gelişim ve farklılaşmada, post-mitotik nöronlarda ise hücre sağkalımında önemli rol oynayan β-katenin' in nuklear göçüne 10 µM EBR uygulamasının etkisi, taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinden nuklear-sitoplazmik izolasyonla elde edilen ekstratların anlatımı immüno blotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Sonuç olarak sitoplazmik ekstrakta β-katenin' in anlatımı, kontrol grubuna göre taupati modeli oluşturulmuş ve ardından 10 µM EBR uygulaması yapılmış hücrelerde çok değişmemiştir. Nuklear ekstrakta ise kontrol grubuna kıyasla β-katenin' in nukleusa göçü taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde belirgin şekilde azalırken bu hücrelere 10 µM EBR uygulaması ile önemli ölçüde artmıştır.

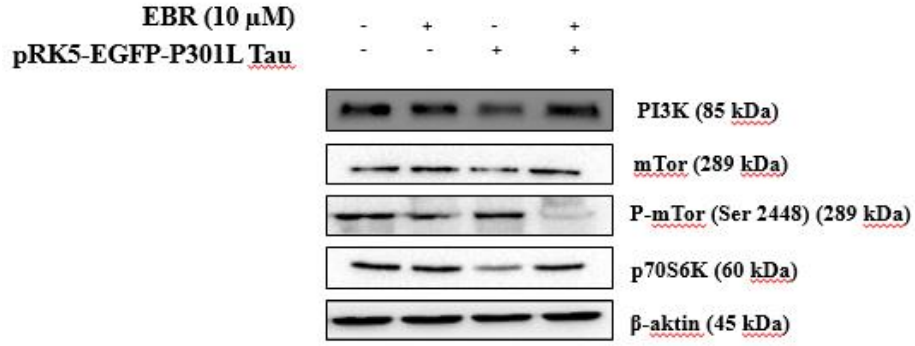


Şekil 4. 8 EBR' nin, taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde β -katenin' in nuklear göçü üzerindeki etkisinin nuklear-sitoplazmik protein izolasyonu yapılarak immünoiblota tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak sitoplazmik ekstraktta β -aktin, nuklear ekstraktta H3 (Histone3) kullanılmıştır. Bu sonuç birbirinden bağımsız en az 3 tekrarı temsil etmektedir.

Buraya bölüme kadar elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, potansiyel GSK3 β inhibitörü olan EBR' nin AH patolojisini tetikleyen biyobelirteçleri üzerinde genel anlamda geri dönüşümü sağladığı, GSK3' ün inhibisyonunu artırarak β -katenin' in nukleusa göçünü teşvik ederek hücre sağkalımını tetiklediği ve EBR' nin nöral sağkalım üzerindeki etkisinin Wnt sinyal yolağından bağımsız olduğu bulunmuştur.

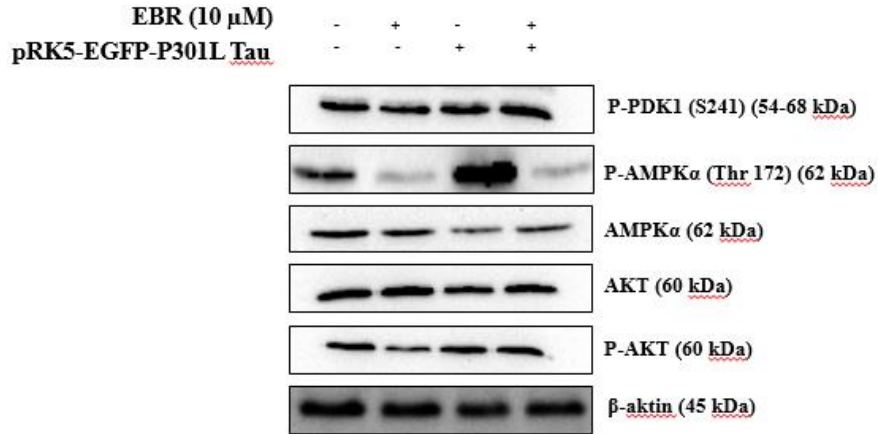
4.6. TAUPATI MODELİ OLUŞTURULMUŞ VE DOĞAL TİP PC12 HÜCRELERİNDE EBR' NİN PI3K/AKT/MTOR SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

pRK5-EGFP-P301L-Tau vektörü transfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde PI3K' nin düzenleyici alt ünitesi, mTORC₁ protein kompleksinin elemanlarından mTOR' un anlatımı ile protein sentezinin düzenlenmesinde önemli bir kinaz olan p70S6K' nin GSK3 tarafından gerçekleştirilen aktive edici Ser371 fosforilasyonu seviyesinin 10 μ M EBR uygulaması sonucunda gerçekleşen değişimler immunoblota yöntemi ile gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde p70S6K, PI3K' nin düzenleyici p85 alt ünitesinin ve mTOR anlatımlarının azaldığı, p-mTOR anlatımının ise arttığı gözlenmiştir. Bu hücelere 10 μ M EBR uygulaması ise p70S6K, PI3K' nin düzenleyici p85 alt ünitesi ve mTOR anlatımları artarken p-mTOR anlatımı belirgin şekilde azalmıştır.



Şekil 4. 9 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının GSK3 ilişkili PI3K/AKT/mTOR sağkalım yolağı üzerindeki etkisinin immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu sonuçlar birbirinden bağımsız en az 3 tekrarı temsil etmektedir.

AKT ve p70S6K' nin aktive edici fosforilasyonlarını sağlayan PDK1' in aktivasyonundan sorumlu Ser241 fosforilasyonu, taupati modeli oluşturulmuş ve ardından 10 μ M EBR uygulanmış hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Hücrede ATP' nin azalmasına bağlı olarak AMP' nin artması gibi stress koşullarında aktive olan, otofajiyi tetikleyici AMPK' nin α alt ünitesinin Thr172 aktive edici fosforilasyon seviyesi, taupati modelinde kontrol grubuna göre belirgin şekilde artarken bu hücelere 10 μ M EBR uygulaması p-AMPK α ' nın anlatımı azalmıştır.



Şekil 4. 10 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR' nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisinin immünoblotlama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır. Bu sonuçlar en az 3 bağımsız tekrarı temsil etmektedir.

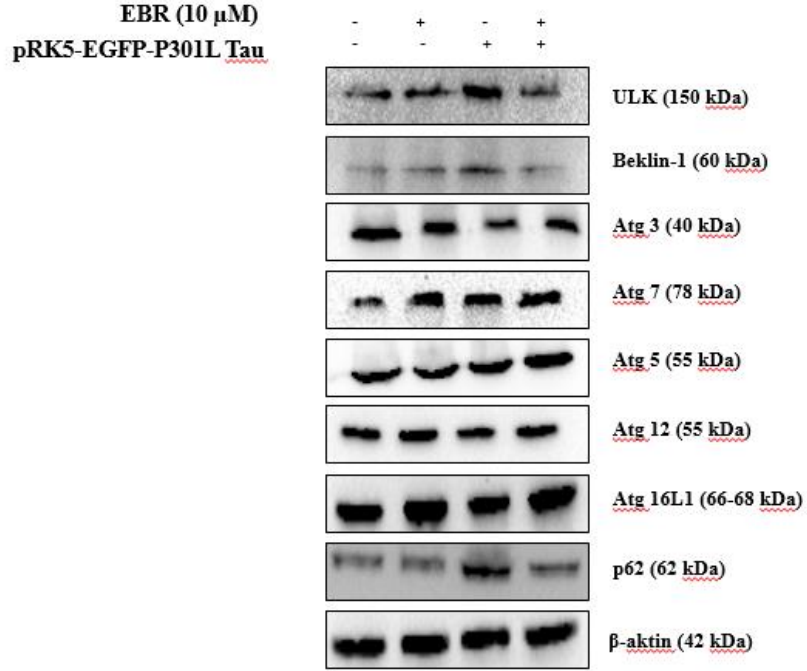
Bu bölümden elde edilen veriler doğrultusunda çıkarılacak sonuçlar, pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmiti transfekte edilerek taupati modeli oluşturulan PC12 hücrelerinde EBR' nin AMPK α aktivasyonunu sağladığı, bu sayede GSK3 β inhibisyonunun tetiklenerek tau fosforilasyonu ve birikiminin azaldığı ve hücre sağkalımının tetiklendiğidir.

4.7. EBR' NİN TAUPATI MODELİ OLUŞTURULMUŞ VE DOĞAL TİP PC12 HÜCRELERİNDE OTOFAJİ YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Potansiyel GSK3 β inhibitörü olan EBR' nin 10 μ M uygulamasının pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmiti transfekte edilerek taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde otofaji ile ilişkili proteinlerin üzerindeki etkisi immunoblotlama yöntemiyle gösterilmiştir. Otofaji mekanizmasının tetiklenmesinde önemli rol oynayan ULK1' in anlatımı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde kontrol grubundakilere kıyasla bu hücrelere 10 μ M EBR uygulaması sonucunda ULK' in anlatımı belirgin şekilde azalmıştır. Otofajiyi tetikleyen ULK1 kompleksi tarafından fosforile edilip PAS' ta birikerek otofagozom çekirdeklenmesini sağlayan Vps34 kompleksinde bulunan Beklin1' in anlatımı, taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde artarken, bu hücreler 10 μ M EBR ile muamele edildiğinde Beklin1' in anlatımı oldukça azalmıştır.

LC3-I' in Ub benzeri modifikasyonunu sağlayan enzimlerden ATG3 ve ATG7' nin anlatımına bakıldığında kontrol grubuna kıyasla, ATG3 anlatımının plasmid uygulaması ile azaldığı, plasmid aktarılmış hücrelere EBR uygulamasının ise azalan ATG3 anlatımını değiştirmedeği bulunmuştur. ATG7' nin ise anlatımının plasmid aktarımı sonrası arttığı ve bu durumun EBR uygulaması kombinasyonu ile değişmediği gösterilmiştir. LC3-I' in lipidasyonunu sağlayan Ub-benzeri konjugasyon sistemi üyelerinden ATG5 ve ATG12' nin anlatımında ise özellikle plasmid aktarılan hücrelere bakıldığında ekspresyon artışı saptanmıştır. ATG12 anlatımında ise değişiklik saptanmamıştır. ATG5 ve ATG12' nin LC3-I ile etkileşimini sağlayan ATG16L1' in anlatımında ise hiç bir koşulda değişiklik gözlenmemiştir. Seçici otofajide Ub' lenerek işaretlenen kargonun özgül otofaji reseptörü aracılığıyla otofagozom membranına bağlanmasını sağlayan Ub bağlama protein p62' nin anlatımının azalması, otofagolizozomlarda kargonun yıkıldığını göstermektedir. Taupati

modeli oluşturulmuş ve 10 μ M EBR uygulanmış hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla çok değişmediği ancak taupati modelinde p62 anlatımının belirgin olarak arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 11 Taupati modeli oluşturulmuş ve doğal tip PC12 hücrelerinde 10 μ M EBR uygulamasının otofaji ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmış olup bu sonuçlar en az 3 bağımsız tekrarı temsil etmektedir.

5. TARTIŞMA

Dünyadaki tüm demans vakalarının yaklaşık %70' ini teşkil eden AH genellikle sporadik, nadiren ailesel kökenli bir hastalıktır ve gelişiminde *APP*, *APOE*, *PSEN1* ve *PSEN2* olmak üzere yaklaşık 20 genin risk faktörü olduğu bilinmektedir. AH patolojisinde hücre içerisinde tau ve/veya hücre dışarısında ise biriken A β protein agregatları önemli rol oynamaktadır (Šerý, Povová et al. 2013, Erkkinen, Kim et al. 2018). Tau, *MAPT* geninden sentezlenen farklı izoformları ve pek çok farklı rolü olan bir mikrotübül bağlanma proteindir. Ayrıca yapılan çalışmalarda nukleusta konumlanmış olan tau proteininin DNA üzerindeki küçük oluklara yerleşerek bir DNA bağlanma protein olarak görev yaptığı bulunmuştur. Tau proteini, RNA ile elektrostatik bir etkileşim kurarak hücresel RNA bütünlüğünün korunmasını sağlamakla birlikte bu etkileşimin tau birikimini tetikleyebileceğine dair kanıtlarda bulunmaktadır (Bukar Maina, Al-Hilaly et al. 2016).

AH gelişiminde risk faktörü olan *MAPT* geninde meydana gelen 80' den fazla mutasyonun LOAD gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin P301L gibi ailesel *MAPT* mutasyonları tau protein birikimine bağlı olarak sporadik AH gelişimine neden olmaktadır. AH patolojisinde gözlenen NFT' lerin içeriğindeki tau proteini hiperfosforilasyon, asetilasyon, Ub veya kesilim gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar sonucunda mikrotübüllerden serbestlenerek dentritlerde ve sinaptik alanlarda yanlış lokalize olup birikerek çeşitli işlen kayıplarına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Matarin, Salih et al. 2015, Wang and Mandelkow 2016). A β oligomerleri NGFR (sinir büyüme faktörü reseptörü), NMDR (N-metil-D-aspartik asit reseptörü) ve Frizzled gibi sinaptik reseptörlere veya lipid ve iyon kanallarına bağlanarak tau, α -synuclein ve NF' yi fosforile eden çeşitli kinazların ve proteazların anormal aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca A β oligomerleri inflamasyonu tetikleyerek direkt etkileşim, UPS veya otofajinin inhibisyonu aracılığıyla da diğer protein birikimlerini tetikleyebileceği gözlenmektedir (Marsh, Blurton-Jones et al. 2012). GSK3, CDK5, P44/42 gibi tau kinazların artan aktiviteleri tau proteininin

hiperfosforilasyonu ile yüksek oranda paralellik göstermektedir. Aynı zamanda bu kinazlar hücrede önemli sinyal yollarında, otofaji ve UPS, ER stres, hücre devri, hücre büyümesi, hücre sağkalım ve hücrenin stres cevabı gibi çeşitli olaylarda rol oynamaktadırlar (Miller, Teravskis et al. 2014, Tenreiro, Eckermann et al. 2014).

Hücre ölümü tiplerinden biri olan otofaji çok hücreli organizmaların gelişimi, homeostasisi ve immun sistemlerinin düzenlenmesi açısından önemli bir süreçtir. Hücre içi yanlış katlanmış ve hasar görmüş proteinlerin, işlevsiz veya hasarlı organellerin (mitokondri, endoplazmik retikulum, peroksizom vb.) temizlenmesinin yanısıra metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili rol oynamaktadır (Zare-Shahabadi, Masliah et al. 2015). Otofaji mekanizmasının düzenlenmesi pek çok patolojik süreç ile ilişkilidir. Çeşitli mutasyonlar, oksidatif hasar veya post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle yanlış katlanmış proteinlerin HSC' ler gibi şaperon proteinler tarafından doğal yapılarını kazanmaları ya da UPS veya otofaji hücrel dönüşüm mekanizmaları tarafından degrade edilmeleri gerekmektedir. Otofaji yolağındaki anormallikler hücre içinde veya dışında protein birikimleri sonucu oluşan protein agregatları kaynaklı toksisiteler ya da bu proteinlerin doğal yapılarının bozunması nedeniyle kendi görevlerini yapamamalarından dolayı bozulan homeostasi sonucu hücre ölümünün daha fazla oranda gerçekleşmesini tetiklemektedir. Bu durum nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar, enfeksiyonlar ve daha pek çok hastalığın gelişimini ve seyrini etkileyebilmektedir (Li, Zhang et al. 2010, Singh and Cuervo 2011, Murrow and Debnath 2013).

AH'nin önlenmesi veya tedavi edilmesini amaçlayan pek çok farmakolojik ve farmakolojik olmayan çalışmalar yapılmaktadır. Egzersiz, sağlıklı beslenme, özellikle flavanoidler, probiyotikler, vitamin D-E-C, folat, beta kompleksler ve luteolin alımının AH' ye koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Cummings, Tong et al. 2019). AH' ye karşı farmakolojik çalışmalar semptomik ve etiyolojik olarak ikiye ayrılmaktadır. AChE inhibitörleri, NMDA antagonistleri, muskarinik ve nikotinik Ach reseptör antagonistleri, 5-HT₆ Serotonin reseptörü inhibitörleri ve histamine reseptörü (H₃) antagonistleri semptomik yaklaşımlara karşı faz çalışmaları devam eden ajanlardır. Etiyolojik çalışmalarda ise sekretaz inhibitörleri, A β agregasyon inhibitörleri, tau

terapileri, tip-II diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar, LDL' yi hedefleyen statinler, anti-inflamatuvar etkili ilaçlar denenmektedir (Ghanemi 2015, Mendiola-Precoma, Berumen et al. 2016, Frozza, Lourenco et al. 2018). Yakın zamanda Cummings ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada nörotransmitter, anti-amiloid immunoterapi, anti-amiloid ve BACE inhibitörleri, anti-amiloid ve anti-tau agregasyon inhibitörleri ile ilişkili faz-III çalışmaları devam eden 28 ajandan söz edilmektedir (ref).

AH' nin biyobelirteçlerinden olan A β ve tau proteini ile ilgili çeşitli terapötik stratejiler geliştirilmektedir. A β stratejisinde A β oligomerlerinin bağlandığı reseptörler hedeflenmektedir. Tau proteinini hedefleyen stratejilerde ise, siRNA veya miRNA aracılığıyla tau sentezinin inhibisyonu, kinaz inhibitörleri (GSK3 ve CDK5' yi hedefleyen) ve fosfataz aktivatorlarının (Ser/Thr fosfataz aktivitesini düzenleyen melatonin) kullanımı, bazı şaperonların inhibe edilmesi, tau spesifik antikolar ve tau agregasyon inhibitörlerinin, proteozom veya otofaji yolağını tetikleyen ve mikrotübül stabilizasyonunun sağlanmasında rol oynayan ajanlar kullanılmaktadır (Wang and Mandelkow 2016).

Bir serin/treonin kinaz olan GSK3, glikojen metabolizması ve insülin sinyal mekanizmasının yanısıra hücre bölünmesi, farklılaşması gibi birçok hücreysel olayın düzenlenmesinde rol oynayan moleküldür. GSK3' ün sinyal mekanizmasında meydana gelen değişimler sonucunda AH, inflamasyon, tip-II diyabet ve kanser gibi çok sayıda hastalık tetiklenmektedir. GSK3' ün patolojik bulgularını azaltmak amacıyla kullanılan inhibitörlerin etkileri tanımlanmasına rağmen henüz etkin bir inhibitör geliştirilememiştir. Örneğin, tez çalışmam kapsamında kullandığım ve klinik öncesi çalışmaları devam eden, potansiyel GSK3 β inhibitörü olan LiCl' nin, AH' nin patolojik bulgusu olan A β birikimlerinin veya NF oluşumlarının gerilemesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Hooper, Killick et al. 2008). Hu ve ark., (2009) tarafından yapılan çalışmada AH modeli oluşturmak üzere A β 42 oligomerleri bilateral intraserebroventriküler infüzyonu yoluyla sıçanlara (Sprague-Dawley) aktararak potansiyel GSK3 inhibitörleri olan LiCl ve SB16763 kullanımının nöral sağkalım üzerindeki etkileri gözlenmiştir. Kontrol grubundaki sıçanlarda LiCl veya SB16763 muamele edilenlere göre nörodejeneratif belirteçlerin ve bilişsel bozuklukların tetiklendiği gösterilmiştir (Hu, Begum et al. 2009).

Yapısal olarak memelilerdeki steroid hormonlara yüksek benzerlik gösteren ve bitki büyüme hormonlarından BR ailesinin bir üyesi olan EBR potansiyel GSK3 β inhibitörüdür. Koppula ve ark., (2012) yaptığı çalışmada EBR' nin nöral sağkalım üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Carange, Longpré et al. 2011, Koppula, Kumar et al. 2012). Ly ve ark., (2012)' nin yaptıkları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda GSK3 β ' nin inhibisyonunun BACE1 anlatımını ve buna bağlı olarak AH fenotipini baskıladığını göstermişlerdir (Ly, Wu et al. 2012). Bu çalışma ile ilişkili olarak Parr, ve ark., (2012) Wnt sinyal yolağının aktivasyonu ile GSK3 inhibisyonunun β -katenin' in nukleusa göçünü tetikleyerek BACE1' in anlatımının baskılandığı ancak GSK3' ün aktivasyonu ile BACE1 anlatımı ve aktivasyonu artarak APP' nin amiloidojenik kesiliminin tetiklendiğini gözlemlemişlerdir (Parr, Carzaniga et al. 2012).

Bu tez çalışması kapsamında potansiyel GSK3 β inhibitörü olan EBR' nin anti-nörodejeneratif etkisini göstermek amacıyla ilk önce nöral-benzeri hücre hattı olan PC12 ' ye pRK5-EGFP-P301L-Tau vektörü aktararak taupati modeli oluşturulmuştur. Daha sonra uygun dozdaki EBR' nin nöral sağkalım üzerindeki etkisi AH ve otofaji ile ilişkili olarak gösterilmek istenmiştir. Bu amaçla ilk olarak PC12 hücrelerinde doza bağlı EBR (1-10 μ M) uygulaması ile MTT analizleri yapılmış ve laboratuvarımızda yapılan diğer tez çalışmalarında kullanılan SH-SY5Y (insan nöroblastoma) ile benzer doza bağlı canlılık verileri elde edilmiştir.

Hoover ve ark, (2010) tarafından yapılan çalışmada insan 4R0N tau proteininin doğal tip ve P301L mutant formlarını hem *in vitro* nöral kültür hücrelerine transfer ederek hem de bu genlerin anlatımını yapan fareler üreterek P301L patolojik tau' nun, dentritlerdeki yanlış lokalize olarak sinaptik fonksiyon bozukluklarını tetiklediğini ve taupati modeli oluşturulmuş farelerde ise elektrofizyoloji deneyleri ile bilişsel bozuklukların tetiklendiğini göstermişlerdir (Hoover, Reed et al. 2010). Bu çalışmayla birbirini destekleyen sonuçların elde edildiği Di ve ark., (2016) tarafından yapay olarak mutasyonlar uygulanarak hiperfosforile olmuş patolojik insan tau proteininin transfekte edildiği ve ark., (2012) insan doğal tip ve P301L mutant tau proteinini içeren lentiviral vektörleri enjeksiyon aracılığıyla sıçan motor korteksine aktarmışlardır. P301L mutant tau' nun transfekte edildiği hücrelerde Thr181/Ser262 tau hiperfosforilasyonu ve anormal tau agregasyonunun tetiklendiği gösterilmiştir.

Ayrıca GSK3' ün aktivasyonun arttığı gözlemlenmiştir (Khandelwal, Dumanis et al. 2012).

AH' li bireylerin CSF' lerine bakılarak yapılan biyobelirteç çalışmasında, total tau proteininin nörodejeneratif etkinliği A β patolojisinin varlığı ile paralellik gösterirken NF-L' nin A β patolojisi varlığından etkilenmediği gösterilmiştir (Mattsson, Insel et al. 2016) Tau proteini izoformlarından 4R1N/3R1N ve APP transfekte edilmiş SH-SY5Y hücrelerine ekstrasellüler tau fibrilleri uygulanması sonucu intrasellüler tau birikiminin arttığını, APP' nin ekstrasellüler domainlerinin ortadan kaldırılmasıyla bu birikimin azaldığını göstererek APP' nin ekstrasellüler tau proteininin hücre içine alınmasında ve hücreler arası tau iletiminde önemli olduğunu belirtmişlerdir. (Takahashi, Miyata et al. 2015).

Hem *E.coli*' den izole edilen rekombinant 2N4R doğal tip tau proteini ve α -sinüklein ile yaptıkları agregasyon çalışmalarında hem de PH (parkinson hastalığı) ve PSP (ilerleyen supranükleer palsi)' li bireylerin beyinlerinden alınan örneklerle yaptıkları çalışmalarda α -sinüklein oligomerlerinin toksik tau birikimini tetiklediğini göstermişlerdir (Castillo-Carranza, Guerrero-Muñoz et al. 2018). Oikawa, Nonaka et al. (2016) SH-SY5Y hücrelerinde *in vitro* tau uygulaması ile yaptıkları deneylerde α -sinükleinin tau birikimini tetiklediğini ve mikrotübül iletimini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Oikawa, Nonaka et al. 2016).

pRK5-EGFP-P301L-Tau plazmiti transfekte edilmiş PC12 hücrelerinde immünoyblotlama yöntemi ile AH biyobelirteçlerinden olan tau fosforilasyonu, β -amiloid, GSK3 α - β , CDK5, α -sinüklein ve APP' nin amiloidojenik kesilimini tetikleyen BACE1' in anlatımlarının arttığı ancak APP anlatımının azaldığı gösterilmiştir. İmmünoyblotlama sonuçları fluoresan boyama ve hücre akış sitometresi sonuçları ile desteklenmiştir. Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde doğal tipe kıyasla ROS seviyesinin arttığı, DNA kırıklarının arttığı, mitokondri membran potansiyelinin azaldığı, nekrotik ve özellikle de apoptotik hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz sonuçların, belirtilen literatürlerdeki *in vitro* ve *in vivo* taupati modeli oluşturma deneylerinde elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir. Tau anlatımının artırılması GSK3 α - β anlatımını arttırdığı ve düşük olan inhibe edici fosforilasyon seviyeleri ile tetiklenen GSK3

aktivitesinin, tau fosforilasyonu ve BACE1 anlatımını arttırarak APP' nin amiloidojenik kesilimini dolayısıyla hücre ölümünü tetiklemektedir. Mitokondriler için yüksek toksisite gösteren α -sinüklein' in anlatımının artması ya da tau birikimine bağlı olarak aktive olan kinazlar aracılığıyla hücre bütünlüğünün bozulduğu ve seviyesinin düştüğü gözlenen NF-L' de hücre ölümüne neden olmaktadır.

Yapılan bir çalışmada insan 3R-tau geni transfekte ederek hipotermi koşullarında tau hiperfosforilasyonunu tetikledikleri SH-SY5Y hücrelerinde potansiyel GSK3 inhibitörleri LiCl ve AR-A014418 ile birlikte potansiyel CDK5 inhibitörü olan ROSC (Raskovitin)' nin etkilerini incelemişlerdir. Sonuçta LiCl ve AR-A014418 uygulaması PHF oluşumu ve tau hiperfosforilasyonlarını anlamlı bir şekilde geri çekerken sadece LiCl uygulamasının GSK3 β Ser9 fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Buna karşın ROSC kullanımında anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Bretteville, Marcouiller et al. 2012). Tez çalışmamız kapsamında taupati modeli oluşturduğumuz PC12 hücrelerinde potansiyel GSK3 inhibitörü olan LiCl' nin etkisini göstermek amacıyla daha önce MTT analizi ile belirlediğimiz, toksisitesi düşük 1 ve 10 μ M LiCl ve EBR dozları 24 saat süresince uygulanarak karşılaştırmalı olarak MTT analizleri yapılmıştır. Sonuçta sadece EBR veya LiCl uygulaması 24 saatte benzer toksisite gösterirken taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde EBR uygulamasının hücre sağkalımını daha etkin bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerine 10 μ M EBR uygulamasının AH biyobelirteçleri üzerindeki etkisi immünoyotlama tekniği ile gösterildiğinde; p-tau, α -sinüklein, CDK5, GSK3 α - β , BACE1 anlatımları azalırken APP ve NF-L' nin anlatımları ile GSK3 α - β ' nin inhibisyon seviyesinin artması EBR' nin nöral sağkalım üzerindeki etkisini açıkça göstermektedir.

AH' li bireylerin nöronlarındaki A β ve p-tau birikimi, oksidatif stres, DNA hasarı ve nöroinflamasyona bağlı olarak G0 fazından çıkarak yeniden hücre devrine girildiğine dair kanıtlar sunmuşlardır. Özellikle A β oligomerlerinin mitojenik yolları aktive ederek G1/S kontrol noktasının aşılmasıyla tetiklenen DNA sentezinin yeniden gerçekleşmesi sonucunda mitotik hücre bölünmesinin durdurulması ile nöronal ölümün tetiklendiğini göstermişlerdir (Zekanowski and Wojda 2009). Taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerine 10 μ M EBR uygulanarak hücre akış sitometresinde gerçekleştirilen PI analizinde canlı hücre sayısının belirgin bir şekilde arttığı

gözlenmektedir. Annexin V/PI analizinde ise taupati modeli oluşturulmuş hücrelerde artan apoptotik hücre ölümünün 10 μ M EBR uygulaması ile azaldığı, fluoresan mikroskobu analizlerinde taupati modeli hücrelerde azalan mitokondri membran potansiyelinin 10 μ M EBR uygulaması ile geri kazanıldığı veya artan ROS seviyesinin geri çekildiği hücre akış sitometresi ve fluoresan mikroskobunda gösterilmiştir. Bu sonuçlar taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde EBR' nin etkin dozunun 10 μ M olduğunu göstermektedir.

GSK3' ün mTORC₁ aktivasyonunu tetikleyerek lizozomal asidifikasyonun inhibisyonuna yol açarak otofajiye ket vurduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte mTORC₁ kompleksinin düzenleyicisi olan Raptor' un mTOR tarafından Ser863 fosforilasyonu onun GSK3 tarafından Ser859 fosforilasyonunu teşvik ederek mTORC₁ aktive etmektedir. Aktive olan mTORC₁ ULK1' in inhibe edici fosforilasyonunu sağlayarak otofajinin tetiklenmesini engellediği gözlemlenmiştir (Stretton, Hoffmann et al. 2015). Aktive olmuş GSK3 β ve mTORC₁' in Ser 122/142/211 fosforilasyonlarını tetikleyerek lizozom biyogenezinde rol oynayan TFEB (Transkripsiyon faktör E kutusu)' in nukleusa göçünü inhibe ederek otofagolizozom aktivitesinin engellendiğini vurgulamışlardır (Puertollano, Ferguson et al. 2018). Bu çalışmaya paralel olarak *Polito ve ark.*, (2014) tarafından yapılan çalışmada taupati modeli farelerde TFEB' in tau agregasyonunun temizlenmesinde önemli rol oynadığı göstermişlerdir (Polito, Li et al. 2014).

AMPK α aracılığıyla gerçekleştirilen ULK1' in aktive edici Ser155 fosforilasyonunun otofajinin teşvik edilmesinde önemli olmasına karşın ULK1' in otofosforilasyonu sonrası yıkımını tetiklediği ve böylelikle otofagozom membranının oluşmaya başladığını belirtmişlerdir (Liu, Lin et al. 2016). Tez çalışmamız kapsamında hücre sağkalımı ve otofaji mekanizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına ait proteinlerin anlatımları ve fosforilasyon seviyeleri incelenmiştir. Buna göre taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde, kontrol grubuna göre AMPK α ' nın aktivasyonunun artması, p70S6K aktivitesinin azalması, ULK1 anlatımının artması, ATG5/12/16L1' in anlatımında çok değişiklik olmamakla birlikte p62' nin anlatımının artması otofajinin tetiklendiğini ve otofagozom yapısının oluştuğunu göstermektedir.

Sonuç olarak EBR taupati modeli oluşturulmuş PC12 hücrelerinde artan ekspresyonları gözlemlenen AH belirteçlerinin anlatımı azalmış aynı zamanda GSK3 β 'nin inhibe edici fosforilasyonu EBR ile artmıştır. Bu etkinin en az LiCl kadar etkin olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra EBR uygulaması taupati oluşturulmuş hücrelerdeki otofajik etkisi incelendiğinde EBR'nin plazmid aktarımı ile artan otofajik süreci baskıladığı azalan Beklin anlatımı ve Ulk-1 seviyesine bakılarak söylenebilir. ATG proteinlerinin anlatımında ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. EBR'nin taupati modeli hücrelerdeki otofajiyi nasıl baskıladığı ve otofaji ile ilişkili hangi hücre yollarının etkilendiğinin araştırılması ilerleyen çalışmalarda ele alınması istenilen bir araştırma konusunu oluşturmaktadır. .



6. KAYNAKÇA

Alzheimer's, A. s. A. J. and Dementia (2018). "2018 Alzheimer's disease facts and figures." **14**(3): 367-429.

Barnes, D. E. and K. J. T. L. N. Yaffe (2011). "The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence." **10**(9): 819-828.

Bedse, G., et al. (2015). "Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge." **9**: 204.

Bejarano, E. and A. M. J. P. o. t. A. t. s. Cuervo (2010). "Chaperone-mediated autophagy." **7**(1): 29-39.

Beurel, E., et al. (2015). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases." **148**: 114-131.

Birgisdottir, Å. B., et al. (2013). "The LIR motif—crucial for selective autophagy." **126**(15): 3237-3247.

Bretteville, A., et al. (2012). "Hypothermia-induced hyperphosphorylation: a new model to study tau kinase inhibitors." **2**: 480.

Bukar Maina, M., et al. (2016). "Nuclear tau and its potential role in Alzheimer's disease." **6**(1): 9.

Cai, Z., et al. (2012). "Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease." **14**(1): 1-14.

Cai, Z., et al. (2012). "Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease." **9**(7): 864-879.

Carange, J., et al. (2011). "24-Epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against MPP." **2011**.

Castillo-Carranza, D. L., et al. (2018). "α-Synuclein oligomers induce a unique toxic tau strain." **84**(7): 499-508.

Cheung, Z. H., et al. (2008). "Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2." **28**(19): 4872-4877.

Cheung, Z. H. and N. Y. J. J. o. n. Ip (2011). "Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases—recent advances and future perspectives." **118**(3): 317-325.

Cook, D. G., et al. (2003). "Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E- ϵ 4 allele." **162**(1): 313-319.

Craft, S. J. C. A. R. (2007). "Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment." **4**(2): 147-152.

Cummings, J. L., et al. (2019). "Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options." J Alzheimers Dis **67**(3): 779-794.

Cummings, J. L., et al. (2019). "Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current And Future Pharmacotherapy Options." (Preprint): 1-16.

Di, J., et al. (2016). "Abnormal tau induces cognitive impairment through two different mechanisms: synaptic dysfunction and neuronal loss." **6**: 20833.

Dou, Z., et al. (2013). "Class IA PI3K p110 β subunit promotes autophagy through Rab5 small GTPase in response to growth factor limitation." **50**(1): 29-42.

Ehsan, H., et al. (2005). "Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF- β receptor interacting protein." **43**(2): 251-261.

Eisenberg-Lerner, A. and A. J. A. Kimchi (2012). "PKD at the crossroads of necrosis and autophagy." **8**(3): 433-434.

Erkkinen, M. G., et al. (2018). "Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases." **10**(4): a033118.

Erkkinen, M. G., et al. (2018). "Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases." Cold Spring Harb Perspect Biol **10**(4).

Faturrahman, M., et al. (2017). Structural MRI classification for Alzheimer's disease detection using deep belief network. 2017 11th International Conference on Information & Communication Technology and System (ICTS), IEEE.

Feng, W. and M. J. N. R. N. Zhang (2009). "Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density." **10**(2): 87.

Frezza, R. L., et al. (2018). "Challenges for Alzheimer's disease therapy: Insights from novel mechanisms beyond memory defects." **12**: 37.

Fujita, N., et al. (2008). "The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy." **19**(5): 2092-2100.

Gao, Y.-L., et al. (2018). "Tau in neurodegenerative disease." **6**(10).

Ghanemi, A. J. A. J. o. M. (2015). "Alzheimer's disease therapies: Selected advances and future perspectives." **51**(1): 1-3.

- Ghetti, B., et al. (2015). "Invited review: frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging." **41**(1): 24-46.
- Glass, C. K., et al. (2010). "Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration." **140**(6): 918-934.
- Glynn, R. J., et al. (1999). "Current and remote blood pressure and cognitive decline." **281**(5): 438-445.
- Grotemeier, A., et al. (2010). "AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca²⁺ increase." **22**(6): 914-925.
- Guerreiro, R. J., et al. (2012). "The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE." **33**(3): 437-456.
- Guglielmotto, M., et al. (2009). "The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1 α ." **108**(4): 1045-1056.
- Guo, T., et al. (2017). "Roles of tau protein in health and disease." **133**(5): 665-704.
- Haass, C., et al. (2012). "Trafficking and proteolytic processing of APP." **2**(5): a006270.
- Hermida, M. A., et al. (2017). "GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network." **65**: 5-15.
- Hooper, C., et al. (2008). "The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease." **104**(6): 1433-1439.
- Hoover, B. R., et al. (2010). "Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration." **68**(6): 1067-1081.
- Hu, S., et al. (2009). "GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals." **33**(2): 193-206.
- Hunt, C. E. and A. J. J. T. F. j. Turner (2009). "Cell biology, regulation and inhibition of β -secretase (BACE-1)." **276**(7): 1845-1859.
- Hur, E.-M. and F.-Q. J. N. R. N. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." **11**(8): 539.
- Ichimura, Y. and M. Komatsu (2010). Selective degradation of p62 by autophagy. Seminars in immunopathology, Springer.
- Itakura, E. and N. J. A. Mizushima (2010). "Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins." **6**(6): 764-776.

Jan, A. T., et al. (2017). "Perspective Insights into Disease Progression, Diagnostics, and Therapeutic Approaches in Alzheimer's Disease: A Judicious Update." Front Aging Neurosci **9**: 356.

Jaunmuktane, Z., et al. (2015). "Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy." Nature **525**(7568): 247-250.

Jin, J. J. J. (2015). "Alzheimer Disease." **313**(14): 1488-1488.

Johansen, T. and T. J. a. Lamark (2011). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." **7**(3): 279-296.

Jucker, M. and L. C. J. N. Walker (2013). "Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases." **501**(7465): 45.

Kaidanovich-Beilin, O. and J. R. J. F. i. m. n. Woodgett (2011). "GSK-3: functional insights from cell biology and animal models." **4**: 40.

Kametani, F. and M. J. F. i. n. Hasegawa (2018). "Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease." **12**: 25.

Kaushik, S., et al. (2011). "Chaperone-mediated autophagy at a glance." **124**(4): 495-499.

Khanahmadi, M., et al. (2015). "Genetic of Alzheimer's disease: A narrative review article." **44**(7): 892.

Khandelwal, P. J., et al. (2012). "Wild type and P301L mutant Tau promote neuroinflammation and α -Synuclein accumulation in lentiviral gene delivery models." **49**(1): 44-53.

Kim, B.-W. and H. K. S. J. B. r. Do Hoon Kwon (2016). "Structure biology of selective autophagy receptors." **49**(2): 73.

Kim, T.-W., et al. (2011). "The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2." **43**(4): 561-571.

Kim, T.-W. and Z.-Y. J. A. r. o. p. b. Wang (2010). "Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors." **61**: 681-704.

Klionsky, D. J., et al. (2014). "Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins." **21**(4): 336.

Knopman, D., et al. (2001). "Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults." **56**(1): 42-48.

Kocatürk, N. M. and D. J. T. K. F. Ö. D. Gözüaçık (2017). "Otofaji ve nörodejeneratif hastalıklar (Autophagy and neurodegenerative diseases)." **5**(1): 11-20.

Kodiha, M. and U. J. T. i. m. m. Stochaj (2011). "AMP kinase: the missing link between type 2 diabetes and neurodegenerative diseases?" **17**(11): 613-614.

Koppula, S., et al. (2012). "Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease." **13**(8): 10608-10629.

Kroemer, G., et al. (2010). "Autophagy and the integrated stress response." **40**(2): 280-293.

Kuhn, P. H., et al. (2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." **29**(17): 3020-3032.

Kundu, M. J. A. and r. signaling (2011). "ULK1, mammalian target of rapamycin, and mitochondria: linking nutrient availability and autophagy." **14**(10): 1953-1958.

Lamark, T., et al. (2009). "NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets." **8**(13): 1986-1990.

Li, L., et al. (2010). "Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease." **7**(4): 265-271.

Li, W.-w., et al. (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." **69**(7): 1125-1136.

Li, X. and R. S. J. N. Jope (2010). "Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation?" **35**(11): 2143.

Lim, S., et al. (2014). "Cell-based models to investigate Tau aggregation." **12**(20-21): 7-13.

Liu, C.-C., et al. (2016). "Cul3-KLHL20 ubiquitin ligase governs the turnover of ULK1 and VPS34 complexes to control autophagy termination." **61**(1): 84-97.

Lorenzon, A., et al. (2017). "Wnt/ β -catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy." **8**(36): 60640.

Luna-Muñoz, J., et al. (2013). Phosphorylation of tau protein associated as a protective mechanism in the presence of toxic, C-terminally truncated tau in Alzheimer's disease. Understanding Alzheimer's Disease, IntechOpen.

Ly, P. T., et al. (2012). "Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes." **123**(1).

Manning, B. D. and A. J. C. Toker (2017). "AKT/PKB signaling: navigating the network." **169**(3): 381-405.

Marsh, S. E., et al. (2012). "Examining the mechanisms that link β -amyloid and α -synuclein pathologies." **4**(2): 11.

Matarin, M., et al. (2015). "A genome-wide gene-expression analysis and database in transgenic mice during development of amyloid or tau pathology." **10**(4): 633-644.

Mattsson, N., et al. (2016). "Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament light in Alzheimer's disease." **8**(10): 1184-1196.

Maurer, U., et al. (2014). "GSK-3—at the crossroads of cell death and survival." **127**(7): 1369-1378.

Mayeux, R. and Y. J. C. S. H. p. i. m. Stern (2012). "Epidemiology of Alzheimer disease." **2**(8): a006239.

Mendiola-Precoma, J., et al. (2016). "Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease." **2016**.

Metcalf, C. and M. J. J. C. S. Bienz (2011). "Inhibition of GSK3 by Wnt signalling—two contrasting models." **124**(21): 3537-3544.

Miller, E. C., et al. (2014). "Tau phosphorylation and tau mislocalization mediate soluble A β oligomer-induced AMPA glutamate receptor signaling deficits." **39**(7): 1214-1224.

Mizushima, N., et al. (2011). "The role of Atg proteins in autophagosome formation." **27**: 107-132.

Moss, M. L., et al. (2007). "The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events." **282**(49): 35712-35721.

Mowrer, K. R. and M. S. J. J. o. B. C. Wolfe (2008). "Promotion of BACE1 mRNA alternative splicing reduces amyloid β -peptide production." **283**(27): 18694-18701.

Murrow, L. and J. J. A. R. o. P. M. o. D. Debnath (2013). "Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease." **8**: 105-137.

Neely, K. M., et al. (2011). "Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy–lysosome system in a γ -secretase-independent manner." **31**(8): 2781-2791.

Nishida, Y., et al. (2009). "Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy." **461**(7264): 654.

O'Brien, R. J. and P. C. J. A. r. o. n. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." **34**: 185-204.

Oikawa, T., et al. (2016). " α -Synuclein fibrils exhibit gain of toxic function, promoting tau aggregation and inhibiting microtubule assembly." **291**(29): 15046-15056.

Pan, M.-H., et al. (2010). "Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids." **1**(1): 15-31.

Parr, C., et al. (2012). "Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein." **32**(21): 4410-4418.

Peng, P., et al. (2008). "Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation." **1**(2): 338-346.

Polito, V. A., et al. (2014). "Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB." EMBO Mol Med **6**(9): 1142-1160.

Posner, H. B., et al. (2002). "The relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function." **58**(8): 1175-1181.

Prince, M., et al. (2016). "World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future."

Puertollano, R., et al. (2018). "The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization." **37**(11): e98804.

Rademakers, R., et al. (2003). "Genetics of early-onset Alzheimer dementia." **3**: 497-519.

Raffaitin, C., et al. (2009). "Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study." **32**(1): 169-174.

Rajendran, L., et al. (2006). "Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes." **103**(30): 11172-11177.

Raskin, J., et al. (2015). "Neurobiology of Alzheimer's disease: integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker, and cognitive dimensions." **12**(8): 712-722.

Raskin, J., et al. (2015). "Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions." Curr Alzheimer Res **12**(8): 712-722.

Reitz, C. and R. J. B. p. Mayeux (2014). "Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers." **88**(4): 640-651.

Rogaeva, E. J. N. m. (2002). "The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease." **2**(1): 1-10.

Sadigh-Eteghad, S., et al. (2015). "Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease." Med Princ Pract **24**(1): 1-10.

Sano, Y., et al. (2006). "Physiological mouse brain A β levels are not related to the phosphorylation state of threonine-668 of Alzheimer's APP." **1**(1): e51.

Satoo, K., et al. (2009). "The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy." **28**(9): 1341-1350.

- Scott, R. C., et al. (2004). "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body." **7**(2): 167-178.
- Selkoe, D. J. J. A. r. o. c. b. (1994). "Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease." **10**(1): 373-403.
- Selkoe, D. J. J. J. o. A. s. D. (2001). "Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid\beta-protein." **3**(1): 75-82.
- Selkoe, D. J. J. P. o. t. N. A. o. S. (2001). "Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease." **98**(20): 11039-11041.
- Šerý, O., et al. (2013). "Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review." **51**(1): 1-9.
- Shaid, S., et al. (2013). "Ubiquitination and selective autophagy." **20**(1): 21.
- Shimizu, S., et al. (2010). "Autophagy takes an alternative pathway." **6**(2): 290-291.
- Shoval, Y., et al. (2011). "New modularity of DAP-kinases: alternative splicing of the DRP-1 gene produces a ZIPk-like isoform." **6**(2): e17344.
- Šimić, G., et al. (2016). "Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies." **6**(1): 6.
- Singh, R. and A. M. J. C. m. Cuervo (2011). "Autophagy in the cellular energetic balance." **13**(5): 495-504.
- Solfrizzi, V., et al. (2010). "Metabolic syndrome and the risk of vascular dementia: the Italian Longitudinal Study on Ageing." **81**(4): 433-440.
- Spillantini, M. G. and M. J. T. L. N. Goedert (2013). "Tau pathology and neurodegeneration." **12**(6): 609-622.
- Steigerová, J., et al. (2012). "Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells." **50**(11): 4068-4076.
- Stretton, C., et al. (2015). "GSK3-mediated raptor phosphorylation supports amino-acid-dependent mTORC1-directed signalling." **470**(2): 207-221.
- ŞAHİN, H. A. J. T. K. N.-S. T. (2009). "Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Belirtileri ve Seyri." **2**(1): 31-35.
- Tai, H.-C., et al. (2014). "Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease." **2**(1): 146.

Takahashi, M., et al. (2015). "Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau." **129**(6): 895-907.

Tang, J., et al. (2016). "Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants?" **14**(1): 113.

Tenreiro, S., et al. (2014). "Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe?" **7**: 42.

Thameem Dheen, S., et al. (2007). "Microglial activation and its implications in the brain diseases." **14**(11): 1189-1197.

Thies, E. and E.-M. J. J. o. N. Mandelkow (2007). "Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1." **27**(11): 2896-2907.

Tung, Y.-T., et al. (2012). "Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease." **37**(1): 157-165.

Vukašinović, N. and E. J. T. i. p. s. Russinova (2018). "BRexit: Possible brassinosteroid export and transport routes." **23**(4): 285-292.

Wang, W.-Y., et al. (2015). "Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease." **3**(10).

Wang, Y. and E. J. N. R. N. Mandelkow (2016). "Tau in physiology and pathology." **17**(1): 22.

Weishaupt, J. H., et al. (2003). "Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction." **24**(2): 489-502.

Wilkins, H. M. and R. H. Swerdlow (2017). "Amyloid precursor protein processing and bioenergetics." Brain Res Bull **133**: 71-79.

Wilkins, H. M. and R. H. J. B. r. b. Swerdlow (2017). "Amyloid precursor protein processing and bioenergetics." **133**: 71-79.

Wu, L. and L. J. N. r. r. Zhao (2016). "ApoE2 and Alzheimer's disease: time to take a closer look." **11**(3): 412.

Wu, X.-L., et al. (2017). "Tau-mediated neurodegeneration and potential implications in diagnosis and treatment of Alzheimer's disease." **130**(24): 2978.

Yu, X., et al. (2011). "A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana." **65**(4): 634-646.

Zare-Shahabadi, A., et al. (2015). "Autophagy in Alzheimer's disease." Rev Neurosci **26**(4): 385-395.

Zekanowski, C. and U. J. A. N. E. Wojda (2009). "Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease." **69**(2): 232-253.

Zempel, H., et al. (2013). "Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TTLL6 and spastin." **32**(22): 2920-2937.

Zhang, Y.-w., et al. (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." **4**(1): 3.

Zheng, H. and E. H. J. M. n. Koo (2011). "Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein." **6**(1): 27.



EKLER

Tablo 7. 1 Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	A111	Thermo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo

Floraslan Mikroskopu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
PVDF Membran	88518	Thermo

Tablo 7. 2 Hücre kültürü dananımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
PC12 hücreleri		ATCC
RPMI Medium	11875093	Gibco
Etüv	Heracell 1150	Thermo
Hemastometre	-	Neubauer
Laminar flow	12469,2	Thermo
Pipet Uçları	-	CAPP

Tablo 7. 3 Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DCFH-DA Boya	C6827	Invitrogen
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	D1306	Thermo Scientific
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (PSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH

Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
EBR	C1386-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H ₂ O ₂ Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK
Neomisin	G8168	SIGMA-ALDRICH
Invasion Chamber	354483	BD Bioscience
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
Ponceau Read Belirteci	A1405	Applichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem

Tablo 7. 4 % 12' lik SDS-PAGE jel içeriği

	Alt Jel	Üst Jel
Distile su		3,075 ml
Tris-HCl	2,5ml (1,5M,pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025ml
TEMED	0,005ml	0,005ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05ml

