

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERDEN RESVERATROL VE
KURKUMİNİN NÖRİT BOYU UZAMASINA ETKİSİNİN PC12
HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Gamze BORA TATAR

Tıbbi Biyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2012

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERDEN RESVERATROL VE
KURKUMİNİN NÖRİT BOYU UZAMASINA ETKİSİNİN PC12
HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Gamze BORA TATAR

Tıbbi Biyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hayat YURTER**

ANKARA

2012

ONAY SAYFASI

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Program: Tıbbi Biyoloji

Tez Başlığı: Polifenolik Bileşiklerden Resveratrol ve Kurkuminin Nörit Boyu Uzamasına Etkisinin PC12 Hücre Hattında Araştırılması

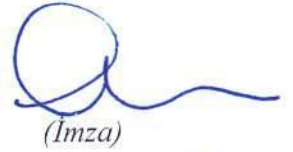
Öğrenci Adı-Soyadı: Gamze BORA TATAR

Savunma Sınavı Tarihi: 12 Haziran 2012

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ
(Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)


(İmza)

Tez danışmanı:

Prof. Dr. Hayat YURTER
(Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)


(İmza)

Üye:

Prof. Dr. Serap DÖKMECİ
(Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)


(İmza)

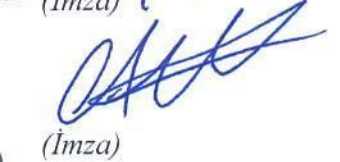
Üye:

Prof. Dr. Engin YILMAZ
(Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)


(İmza)

Üye:

Yard. Doç. Dr. Kamil Can AKÇALI
(Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)


(İmza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(İmza)



Prof. Dr. Mustafa Kadri ALTUNDAĞ
Müdür *Y.*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince bilgisini, deneyimini ve fikirlerini benimle paylaşarak bana her konuda destek olan, sevgi ve anlayışını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hayat YURTER'e,

Değerli fikir ve katkıları ile tez çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ ve Yard. Doç. Dr. Kamil Can AKÇALI'ya,

Bilgisayar destekli moleküler modelleme çalışmalarıyla tezime büyük katkısı bulunan Sayın Prof. Dr. Kemal YELEKÇİ'ye,

Doktora eğitimimde emekleri bulunan, fikir ve önerileriyle yol gösterici olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Pervin DİNÇER, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Engin YILMAZ, Prof. Dr. Şükriye AYTER, Prof. Dr. Ahmet KART ve Doç. Dr. Çetin KOCAEFE'ye,

Doktora eğitimim süresince deneysel ve teorik bilgilerini tereddütsüz paylaşan ablalarım Sayın Yard. Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN, Öğr. Gör. Dr. Burcu HAYTA, Yard. Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU ve Uzm. Dr. Ayşe YÜZBAŞIOĞLU'na,

Bu zorlu süreçte bütün zamanımı birlikte geçirdiğim, her zaman destek gördüğüm sevgili çalışma arkadaşlarıma

ve...

Sevgisi, desteği ve hoşgörüsüyle hep yanımda olan, aklımı ve ruhumu sakinleştiren hayat arkadaşım Can'a, beni yetiştirip bugünlere getiren, sonsuz destekleri ile bana güç veren canım babama, kardeşime, tüm aileme ve arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (H.Ü.B.A.B, 011 D04 101 001) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Bora Tatar, G. Polifenolik Bileşiklerden Resveratrol ve Kurkuminin Nörit Boyu Uzamasına Etkisinin PC12 Hücre Hattında Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2012. Spinal müsküler atrofi (SMA) otozomal resesif olarak kalıtılan ve omurilikteki alfa motor nöronların dejenerasyonu sonucu oluşan nörodejeneratif bir hastalıktır. SMA hastalığı SMN1 geni mutasyonları sonucu ortaya çıkmakta, genin özdeş kopyası olan SMN2 geni ise hastalık ciddiyetini etkilemektedir. Bu genlerin ürünü olan SMN proteini tüm hücrelerde sentezlenmesine karşın eksikliğinden en fazla motor nöron hücreleri etkilenmektedir. SMN proteininin fonksiyonunu araştırmak üzere yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalarla SMN proteini baskılandığında hücrelerin nörit boyunda kontrole göre kısalma görülmüştür. Bu nedenle, SMA hastalığında ortaya çıkan nörit kısalığının düzeltilerek sağlıklı hücrelerdeki boyutuna erişmesinin SMA tedavisinde önemli bir adım olacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, hasta fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini arttırdığı bilinen resveratrol ve kurkumin adlı polifenolik bileşiklerin nörit boy uzamasını indükleyici etkilerinin ve tedavi potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda, 5 μ M resveratrol ve 500 nM kurkuminin nörit boyu analizleri için uygun olduğu bulunmuş, 3, 5 ve 7 gün süreyle nöron benzeri PC12 hücrelerine uygulanmıştır. Kurkuminin 3 günlük inkübasyon sonunda nörit boyunu 38 μ m, 7 günlük inkübasyon sonunda ise 23 μ m uzattığı saptanmıştır. Resveratrolün etkisi yalnızca 3. günde gözlenmiş, nörit boyunun 18 μ m arttığı saptanmıştır. Aynı bileşikler Snn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hattına uygulandığında nörit uzama hatasını düzeltmedikleri görülmüş ve bileşiklerin etki gösterebilmeleri için hücrede Snn proteininin varlığına ihtiyaç duydukları saptanmıştır. PC12 hücrelerinde bileşik uygulaması ile indüklenen nörit uzamasının Snn protein miktar artışı ile ilişkisi olabileceği düşünülerek çekirdekte bulunan Snn proteini *Gem* sayısı analizi ile araştırılmıştır. İmmunfloresan boyama yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde bileşik uygulamalarının çekirdekteki *Gem* sayılarını değiştirmedeği saptanmıştır. Hücrelerdeki toplam Snn protein miktarı ise Western blot yöntemi ile araştırılmış ve kurkumin uygulanan hücrelerde protein düzeyinin değişmediği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmalarda bileşik uygulaması sonrasında Snn protein miktarı değişmemesine rağmen nörit uzamasının indüklendiği gösterilmiş, bu nedenle kurkuminin Snn proteinine bağlanarak etki edebileceği varsayılmıştır. Bağlantı potansiyeli bilgisayar destekli 3 boyutlu modelleme yöntemi ile araştırılmış, Snn-kurkumin bağlantısının (Kd: 239.79 μ M) kontrol olarak kullanılan valproata oranla daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu tez çalışması sonucunda, kurkumin ve resveratrol uygulamalarının Snn protein miktarını değiştirmeden nörit boyunu uzatabildikleri ve bu uzamanın sağlanabilmesi için hücrelerde Snn proteininin bulunması gerekliliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Spinal müsküler atrofi, nörit uzama hatası, resveratrol, kurkumin

Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi
(H.Ü.B.A.B, 011 D04 101 001)

ABSTRACT

Bora Tatar, G. Investigation of the neurite outgrowth effects of resveratrol and curcumin in PC12 cell line. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2012. Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by degeneration of alpha motor neurons of the spinal cord. While SMA is caused by SMN1 gene mutations, the identical copy of the gene, SMN2, can affect disease severity. Although SMN protein is found in all cells, lower motor neurons are extremely vulnerable to SMN deficiency. Knock-down of SMN protein results in neurite outgrowth defects *in vitro* and *in vivo*, therefore correction of the defect is thought to be an important step for SMA treatment. Previous studies reported that resveratrol and curcumin, which are polyphenolic compounds increased SMN2 gene expression in SMA fibroblast cells. The aim of the thesis is to determine therapeutic potential of resveratrol and curcumin by investigating their effects on neurite outgrowth. In the thesis, neuron like PC12 cells were incubated with 5 μ M resveratrol and 500 nM curcumin and neurite length was measured after 3, 5 and 7 days. At the end of incubation periods, curcumin promoted neurite length about 38 μ m and 23 μ m after 3 and 7 days, respectively. Neurite outgrowth due to resveratrol has been only seen on the 3rd day and was about 18 μ m. However, compounds were not able to correct neurite outgrowth defects in Smn knock-down PC12 cells. These results showed that the compounds need the presence of Smn protein to exert their effects on neurite. To investigate whether compound-induced neurite elongation is correlated with Smn protein expression, nuclear *Gem* numbers were analysed by using immunofluorescence staining. No significant changes were obtained in *Gem* numbers between treated and non-treated samples. Total Smn protein expression level was also analysed by Western blot and it was found that Smn protein level remained unchanged after curcumin treatment. According to our findings, it can be hypothesized that curcumin-induced neurite elongation could be triggered from interactions of Smn and curcumin. To test this hypothesis, Smn-curcumin binding was investigated via computer-aided 3D molecular modeling studies. It was calculated that Smn-curcumin binding affinity (Kd: 239.79 μ M) was higher than Smn-valproate, which was used as a control. According to the results of this thesis, resveratrol and curcumin induces neurite elongation without changing Smn protein expression but they require Smn protein to achieve this result.

Key Words: Spinal muscular atrophy, neurite outgrowth defect, resveratrol, curcumin

Supported by Hacettepe University Scientific Research and Development Office (H.Ü.B.A.B, 011 D04 101 001)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spinal Müsküler Atrofi (SMA) : Klinik Özellikleri	3
2.2. Spinal Müsküler Atrofi (SMA) : Moleküler Genetik Özellikleri	4
2.2.A. <i>Survival Motor Neuron</i> (SMN) Geni	4
2.2.B. SMN1 Geninde Saptanan Mutasyonlar ve Moleküler Genetik Tanı	6
2.2.C. SMN2 Geni Kopya Sayısı	7
2.2.D. SMN Proteini ve Fonksiyonları	8
SMN Proteininin “RNA <i>Splicing</i> ” Fonksiyonu	10
SMN Proteininin Motor Nöron Spesifik Fonksiyonları	12
2.3. SMA’da Tedavi Yaklaşımları	16
2.3.A. Histon Deasetilaz İnhibitörleri	17
2.3.B. SMA Tedavisinde HDAC İnhibitörlerinin Rolü	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatları	22
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	22

3.2.A. PC12 Hücre Hattı Kültür Koşulları	22
3.2.B. Smn ifadesi baskılanmış PC12 Hücre Hattı Kültür Koşulları	24
3.2.C. Bileşik Ana Stok Konsantrasyonları	24
3.2.D. İmmunfloresan Boyama	24
Hücre Canlılığı Analizi	24
<i>Gem</i> Sayısı Analizi	25
3.2.E. Protein İzolasyonu	26
3.2.F. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	26
3.2.G. Western Blot	27
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Analiz Programları	29
3.4. Bilgisayar Destekli 3 Boyutlu Moleküler Modelleme Çalışmaları	29
3.5. YÖNTEMLER	30
3.5.A. PC12 ve Smn İfadesi Baskılanmış PC12 Hücre Kültürü Çalışmaları	30
Hücre Kültür Kaplarının Kaplanması	30
Hücre Çoğaltılması	31
Hücre Dondurulması	31
Hücre Sayımı ve Pasajlanması	32
Hücre Farklılaştırılması	33
Hücelere Resveratrol, Kurkumin ve	34
Kontrol Amaçlı Valproat Uygulanması	
3.5.B. Nörit Boy Uzunluğu Analizi	35
3.5.C. Bileşik Uygulamalarının Hücre Canlılığı	37
Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	
3.5.D. Bileşiklerin Çekirdekteki Smn Protein Miktarı	38
Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	

3.5.E. Kurkuminin Total Smn Protein Miktarı	40
Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	
Protein İzolasyonu	40
Protein Konsantrasyon Tayini	40
SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	41
Western Blot	42
Smn Protein Miktarının Analizi	43
3.5.F. Bilgisayar Destekli 3 Boyutlu Moleküler Modelleme Çalışmaları	43
3.5.G. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
4.2. Farklılaşma Sürecindeki PC12 Hücrelerinin	45
Nörit Uzunluklarının Belirlenmesi	
4.3. PC12 Hücrelerinde Nörit Uzamasının Kontrolü	48
4.4. PC12 Hücrelerine Kurkumin Uygulaması	49
4.4.A. Kurkumin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	49
4.4.B. Kurkumin Uygulaması ve Nörit Boyu Analizleri	51
4.5. PC12 Hücrelerine Resveratrol Uygulaması	52
4.5.A. Resveratrol Konsantrasyonunun Belirlenmesi	52
4.5.B. Resveratrol Uygulaması ve Nörit Boyu Analizleri	54
4.6. Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinde	55
Nörit Boyu Analizi	
4.7. Smn ifadesi baskılanmış PC12 Hücrelerine	56
Resveratrol ve Kurkumin Uygulamaları	
4.8. Nörit Uzamasının Smn Protein İfade Düzeyi ile İlişkisi	58

4.8.1. Bileşiklerin Çekirdekdeki Smn Protein Miktarı	58
Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	
4.8.2. Kurkuminin Total Smn Protein Miktarı	60
Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	
4.9. Kurkumin-Smn Moleküler Modelleme Çalışmaları	61
5.TARTIŞMA	62
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALS	Amyotrofik lateral skleroz
APS	Amonyum persülfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Sığır serum albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CO ₂	Karbondioksit
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
Δ7-SMN	Delta 7 SMN (<i>deletion 7</i>)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH ₂ O	Distile su
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>
FBS	Fötal dana serumu (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FL-SMA	Tam uzunlukta SMN (<i>Full-length</i>)
GTF2H2	Genel transkripsiyon faktor II H
GEM	<i>Gemini of coiled bodies</i>
HAT	Histon asetil transferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HDACi	Histon deasetilaz inhibitörü
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>

HS	At serumu (<i>Horse Serum</i>)
kDa	Kilodalton
mA	Miliamper
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometre
mRNA	Haberci (<i>Messenger</i>) Ribonükleik asit
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NaCl	Sodyum klorür
NGF	Sinir büyüme faktörü (<i>Nerve growth factor</i>)
ng/ml	Nanogram/mililitre
nM	Nanomolar
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance of Man</i>
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PC12	Sıçan adrenal medulla <i>pheochromocytoma</i> hücre hattı
PDB	Protein Data Bankası
PFA	Paraformaldehit
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
SAHA	Suberoylanilid hidroksamik asit
SERF1	<i>Small EDRK-rich factor 1</i>
SIRT	Sirtuin

SDS	Sodyum dodesil sülfat
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>
SMA	Spinal müsküler atrofi
SMN	<i>Survival motor neuron</i> protein (insan)
Smn	<i>Survival motor neuron</i> protein (diğer canlılar)
sh-RNA	<i>Short hairpin RNA</i>
S.D.	Standart deviasyon
S.H.	Standart hata
TEMED	N,N,N,N' Tetrametiletildiamin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TSA	Trikostatin A
VPA	Valproat
TÜBİTAK KAMAG	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Kamu Kurumları Araştırma ve Geliştirme Projeleri Destekleme Programı

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
2.2.1.	SMN geninin yerleştiği 500 kb'lık genomik bölge (a) SMN1 ve SMN2 genlerinin yerleşimleri (b) ekzonları ve nükleotid farklılıkları.	4
2.2.2.	SMN1 ve SMN2 genleri arasındaki farklılık.	5
2.2.3.	<i>Gene conversion</i> ile SMN2 kopya sayısı artışının ve hastalık ciddiyetindeki azalmanın şematik gösterimi.	7
2.2.4.	SMN proteinin farklı hücre tiplerindeki lokalizasyonu.	9
2.2.5.	SMN proteini domainleri.	10
2.2.6.	SMN proteininin RNA <i>splicing</i> 'deki rolü.	11
2.2.7.	(a) SMN ifadesi baskılanmış PC12 , (b) fare primer motor nöron hücreleri ve (c) <i>zebrafish</i> modelinde görülen nörit uzama hataları.	15
2.2.8.	HDAC inhibitörlerinin yapısal özellikleri ve etki mekanizması.	18
2.2.9.	Resveratrolün kimyasal yapısı.	20
2.2.10.	Kurkuminin kimyasal yapısı.	21

3.1.	Nörit boyu analizleri için izlenen protokolün şematik gösterimi.	36
4.1.1.	50 ng/ml ve 100 ng/ml NGF uygulanarak 3 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analizleri.	44
4.2.1.	PC12 hücrelerine ait nörit boyu ölçümlerinin örnek gösterimleri.	45
4.2.2.	NGF ile 3, 5 ve 7 gün farklılaştırılmış PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları.	47
4.3.1.	2 mM VPA ile 3 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları.	48
4.4.1.	(a) Kurkumin uygulanmayan ve (b) 20 µM kurkumin uygulanan PC12 hücrelerinin 3 günlük farklılaşma sonrası morfolojik görüntüleri.	49
4.4.2.	500 nM kurkumin uygulaması sonrası, (a) farklılaşan PC12 hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (b) DAPI çekirdek boyaması ile canlılık analizine ait örnek gösterim.	50
4.4.3.	500 nM konsantrasyonda kurkumin uygulanarak 3, 5 ve 7 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları.	51
4.5.1.	(a) Resveratrol uygulanmayan ve (b) 100 µM resveratrol uygulanan PC12 hücrelerinin 3 günlük farklılaşma sonrası morfolojik görüntüleri.	52

4.5.2.	5 µM resveratrol uygulaması sonrası (a) farklılaşan PC12 hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (b) DAPI çekirdek boyaması ile canlılık analizine ait örnek gösterim.	53
4.5.3.	5 µM resveratrol uygulanarak 3, 5 ve 7 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları.	54
4.6.1.	Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hattının sağlıklı PC12 hücreleriyle karşılaştırmalı nörit boyu analizi.	55
4.7.1.	5 µM resveratrol ve 500 nM kurkumin uygulanarak 3 gün farklılaştırılan Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinin, uygulama yapılmayan ve VPA uygulaması yapılan PC12 hücreleriyle karşılaştırmalı nörit boyu analiz sonuçları.	57
4.8.1.	PC12 hücrelerinde Smn boyaması ile <i>Gem</i> sayısı analizini gösteren örnek fotoğraflar.	58
4.8.2.	3 gün süreyle 500 nM kurkumin ve 5 µM resveratrol uygulanan sağlıklı ve Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinde <i>Gem</i> sayısı analizi sonuçları.	59
4.8.3.	3, 5 ve 7 gün 500 nM kurkumin uygulanan ve uygulanmayan kontrol PC12 hücreleri ile gerçekleştirilen Western blot sonuçları.	60
4.9.1.	Smn proteini tudor domaini ile; (a) kurkumin ve (b) valproat arasındaki bağlantıyı gösteren 3 boyutlu (3D) ve 2 boyutlu (2D) modellemeler.	61

TABLÖLAR DİZİNİ

		Sayfa
4.4.1.	3, 5 ve 7 gün süreyle kurkumin uygulanmış PC12 hücrelerinin nörit boy uzunlukları.	51
4.5.1.	3, 5 ve 7 gün süreyle resveratrol uygulanmış PC12 hücrelerinin nörit boy uzunlukları.	54
4.7.1.	Kurkumin ve resveratrol uygulanan Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinin kontrol ve VPA uygulanan hücrelerle karşılaştırmalı nörit boyu uzunlukları.	56

1.GİRİŞ

Spinal müsküler atrofi (SMA) otozomal resesif olarak kalıtılan nörodejeneratif bir hastalıktır (1). SMN1 geni mutasyonları nedeniyle ortaya çıkan SMA hastalığında omurilikte bulunan alfa motor nöronların dejenerasyonu ve kas atrofisi görülmektedir. SMN1 geninin, SMN2 olarak adlandırılan özdeş bir kopyası bulunmaktadır (2). SMN2 geninin 7. ekzonunda bulunan sitozin (C)→timin (T) değişimi nedeniyle, bu genden sentezlenen transkriplerin yaklaşık % 90'ında 7. ekzon atlanmaktadır (2, 3). Ekzon 7 içermeyen hatalı transkriptlerden fonksiyonel olmayan protein sentezlenmektedir. SMN2 geninden % 10 oranında tam uzunlukta SMN proteini sentezlenmekle birlikte bu miktar hastalık oluşumunu engelleyememektedir (4).

Bireylerin farklı sayıda SMN2 gen kopyaları (1-4) mevcuttur (5). SMN2 geninin kopya sayısına paralel olarak tam uzunlukta sentezlenen SMN protein miktarı da artmakta, bu sayede hastalığın seyri hafiflemektedir. Bu bilgiye dayanılarak, SMN2 geninden kodlanan tam uzunluktaki SMN mRNA ve protein miktarının arttırılarak hastalık ciddiyetinin hafifletilmesi ve ilerleyişinin yavaşlatılması yaklaşımları geliştirilmiştir (6). Konu ile ilgili araştırmalar HDAC inhibitörleri olarak adlandırılan bileşikler üzerinde yoğunlaşmış ve bu inhibitörlerin SMN2 gen ifadesini arttırdığı bildirilmiştir. Anabilim Dalı'mızda yrtlmş olan bir TÜBİTAK projesi kapsamında, polifenol yapısında olan resveratrol ve kurkuminin HDAC inhibitor özelliği olduğu ve SMA hasta fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini attırdığı gösterilmiştir (7, 8).

Merkezi sinir sistemi gelişimi için gerekli olan SMN proteini, tüm hücrelerde sentezlenmesine karşın eksikliğinde en fazla motor nöron hücreleri etkilenmektedir (9). SMA hastalığındaki durumu taklit etmek üzere nöron benzeri PC12 hücre hattında ve model organizmalarda Smn ifadesi baskılandığında nörit boyunun kontrole göre kısaldığı rapor edilmiştir (10-12). Bu nedenle SMA hastalarında SMN2 gen ifadesini attırdığı bilinen resveratrol ve kurkuminin nörit uzunluğu üzerindeki etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmuştur.

SMA'lı fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini arttıran resveratrol ve kurkuminin, nöron benzeri PC12 hücrelerinde de aynı etkiyi göstereceği ve SMN protein miktarını etkileyerek, SMN eksikliğinde görülen nörit kısığını düzeltebileceği varsayılmıştır. Nörit kısığının düzeltilerek sağlıklı hücrelerdeki boyutuna erişmesinin SMA tedavisinde önemli bir adım olacağı düşünülmüştür.

Bu varsayımlardan yola çıkılarak, polifenolik yapıdaki HDAC inhibitörlerinden resveratrol ve kurkuminin nöron benzeri PC12 hücrelerinde nörit boyunu indükleyici etkilerinin ve etki mekanizmasının incelenmesi, böylece tedavi potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Müsküler Atrofi (SMA) : Klinik Özellikleri

Spinal müsküler atrofi (SMA) otozomal resesif olarak kalıtılan nörodejeneratif bir hastalıktır (1). Genellikle çocukluk çağı hastalığı olarak kabul edilmekle birlikte erişkin dönemde de ortaya çıkmaktadır. Kistik fibrozisten sonra ikinci sıklıkta görülen SMA'nın insidansı 1/6000- 1/10.000, taşıyıcı sıklığı ise 1/35- 1/50 olarak bildirilmiştir (13-16) .

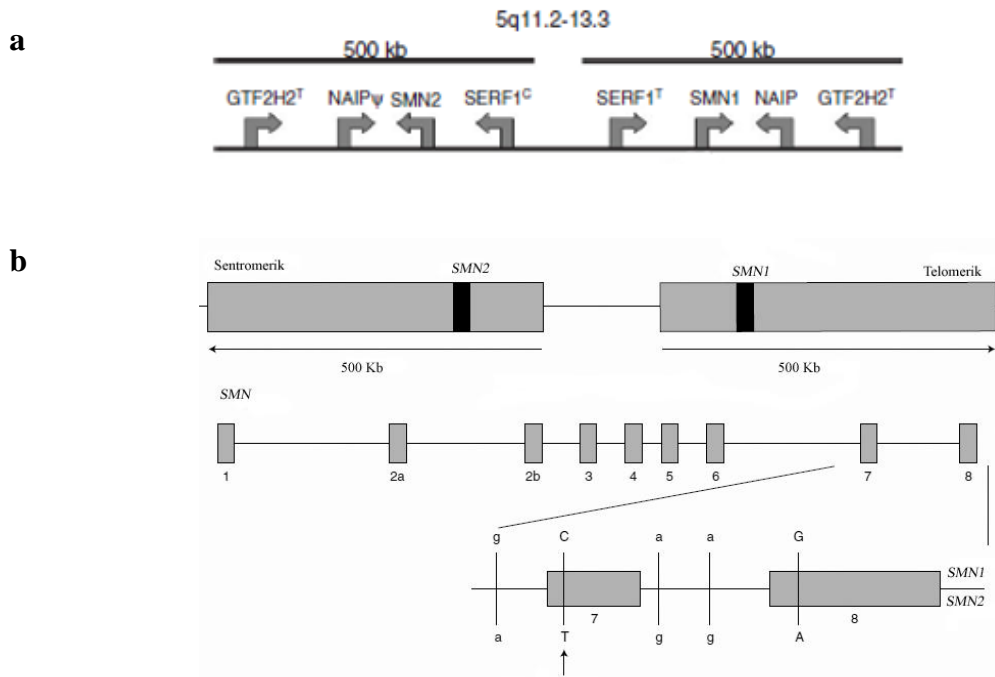
SMA, omurilikte bulunan alfa motor nöronların dejenerasyonu sonucu oluşan simetrik kas zayıflığı ve atrofi ile karakterize edilmektedir. Klinik semptomları arasında hipotoni, gövde ve ekstremitelerde ilerleyen simetrik kas zayıflığı, parmak ve ellerde tremor, dil kaslarında fasikülasyon bulunmakta olan hastalığın başlangıç yaşı ve ciddiyeti bireyler arasında farklılık göstermektedir (17). Bu nedenle SMA, Uluslararası SMA Konsorsiyumu kriterlerine göre dört sınıf (Tip I-IV) altında tiplendirilmektedir (14, 17, 18) ;

- Tip I SMA (Werdnig-Hoffman Disease, OMIM #253300): En ciddi tipi olup semptomlar doğumu takiben ilk 6 ay içerisinde görülmeye başlar. Oturma kabiliyeti olmayan hastalar genellikle solunum yetmezliği nedeniyle 2 yıl içerisinde kaybedilirler.
- Tip II SMA (OMIM #253550): Hastalığın ara formudur. Bulgular 6-18 ay arasında görülmeye başlar. Desteksiz oturabilen hastaların ayağa kalkma ve yürüme kabiliyetleri yoktur.
- Tip III SMA (Kugelberg-Welander Disease, OMIM #253400) : Hastalığın hafif formlarından biri olup 18 aydan sonra bulgu vermeye başlar. Desteksiz ayağa kalkabilen ve yürüyebilen hastalar, ilerleyen dönemlerde tekerlekli sandalyeye bağlı olarak yaşamlarına devam ederler.
- Tip IV SMA (OMIM #271150): Hastalığın en hafif formudur. Semptomlar otuzlu yaşlarda görülmeye başlayıp yavaş ilerler.

2.2. Spinal Müsküler Atrofi (SMA) : Moleküler Genetik Özellikleri

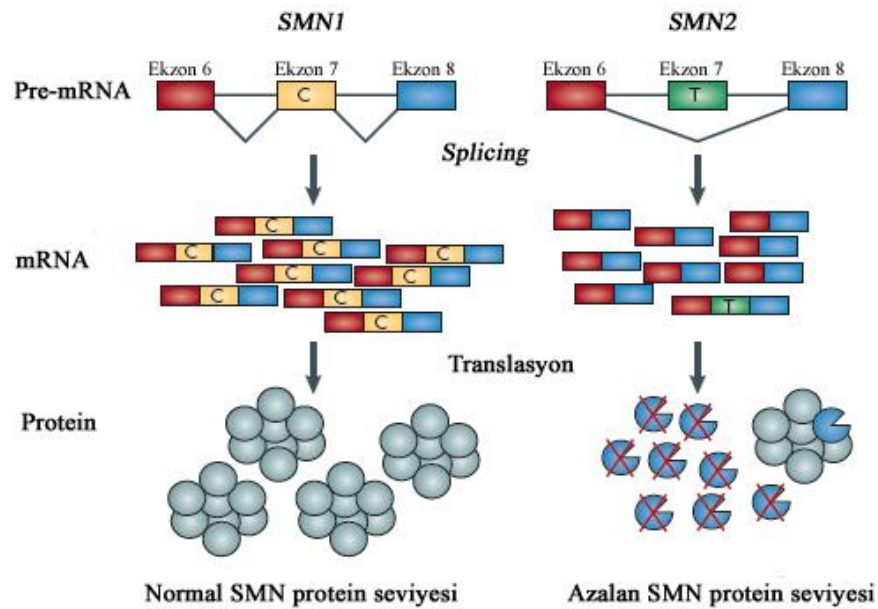
2.2.A. *Survival Motor Neuron* (SMN) Geni

SMA hastalığından sorumlu olan *Survival motor neuron* (SMN) geni, 1995 yılında Lefebvre ve diğ. (2) tarafından tanımlanmıştır. 5q11.2-13.3 kromozom bölgesinde yerleşmiş olan genin insanlarda telomerik (SMN1, OMIM #600354) ve sentromerik (SMN2 OMIM #601627) olmak üzere iki kopyası mevcuttur (2, 19). SMN genleri inversiyon ve duplikasyonları içeren 500 kb'lık bir bölge içinde bulunmaktadır. Bu bölgede SMN genleri dışında; GTF2H2 (*general transcription factor II H*), NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) ve SERF1 (*small EDRK-rich factor 1*) genleri de bulunmaktadır (Şekil 2.2.1a ve b). SMA hastalığı SMN1 geni mutasyonlarıyla ortaya çıkmaktadır (20).



Şekil 2.2.1. SMN geninin yerleştiği 500 kb'lık genomik bölge (a) SMN1 ve SMN2 genlerinin yerleşimleri, (b) ekzonları ve nükleotid farklılıkları (20).

Herbiri 27 kb uzunlukta olan ve 9 ekzondan (1, 2a, 2b, 3-8) oluşan SMN1 ve SMN2 genleri, promotor bölgeleri dahil % 99 oranında benzer olmakla birlikte aralarında 5 nükleotidlik fark bulunmaktadır (3, 21, 22) (Şekil 2.2.1). Bu farklardan en önemlisi 7. ekzondaki sitozin (C)→timin (T) transisyonudur. SMN2 geninde bulunan T nükleotidi, *splicing*'in doğruluğunu kontrol eden ve bulunduğu ekzonun olgun mRNA içinde yer almasını sağlayan *exonic splicing enhancer* (ESE) dizisini bozarak *exonic splicing silencer* (ESS) dizisinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, ESE dizilerine bağlanması gereken serin (S) ve arjinin (R) amino asitlerince zengin SR protein ailesinin bağlantısı bozulmakta ve yeni oluşan ESS dizilerine heteronükleer ribonükleoprotein (hnRNP) ailesi bağlanmaktadır. Sonuç olarak *splicing* hatalı gerçekleşmekte ve transkriplerin yaklaşık % 90'ında 7. ekzon atlanmaktadır ($\Delta 7$ -SMN). 7. ekzonu bulunmayan transkriptlerden sentezlenen kısa SMN proteini oligomerizasyon özelliğini kaybedip kararsızlaşmakta ve hızla yıkılmaktadır (Şekil 2.2.2). SMN2 geninden % 10 oranında sentezlenen tam uzunluktaki SMN proteini (FL-SMN) ise hastalığı engelleyecek miktarda değildir (23).



Şekil 2.2.2. SMN1 ve SMN2 genleri arasındaki farklılık (9)

2.2.B. SMN1 Geninde Saptanan Mutasyonlar ve Moleküler Genetik Tanı

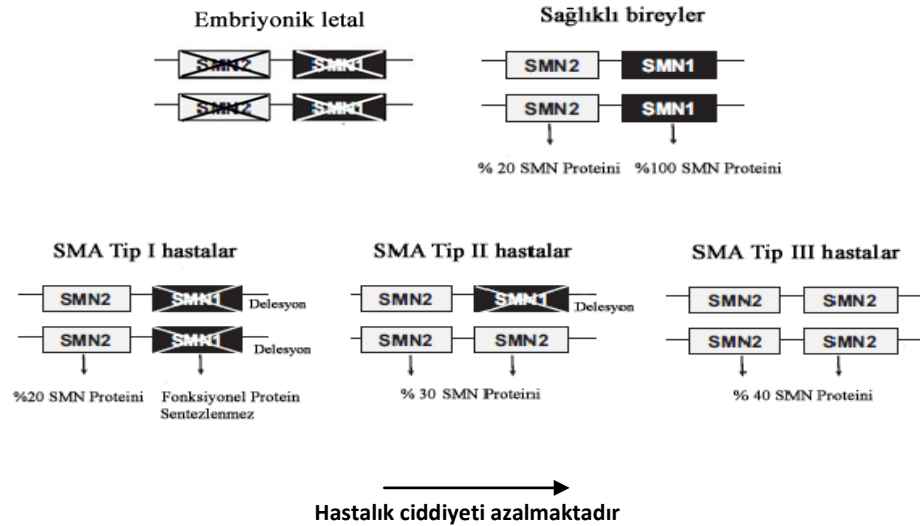
SMA hastalığı SMN1 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Günümüze kadar SMN1 geninde delesyon başta olmak üzere, yanlış anlamlı, anlamsız, çerçeve kayması ve *splice* bölge mutasyonları dahil toplam 59 farklı mutasyon saptanmıştır (24). SMA hastalarının SMN1 geninde en sık bulunan mutasyon tipi 7 ve 8. ekzonlardaki homozigot delesyonlardır (% 90-94) (20, 25). Bu mutasyon Türk hastalarda % 93 oranında görülmektedir (26, 27).

SMA hastalığının moleküler genetik tanısı için PCR-RFLP yöntemi ile delesyon analizi yapılmaktadır. Amplifikasyon ürünleri, ekzon 7 analizi için Dra I, ekzon 8 analizi için ise Dde I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmektedir. Her iki enzim de nükleotid farklılıkları nedeniyle SMN2'yi kesebilmekte, böylece SMN1 ve SMN2 genleri birbirlerinden ayrılarak incelenebilmektedir. Taşıyıcı tanısında ise kantitatif real-time PCR yöntemi ile SMN1 geni kopya sayısı analizi yapılmaktadır (20, 28, 29).

2.2.C. SMN2 Geni Kopya Sayısı

SMN geninin genomda bulunduğu 500 kb'lık bölge hareketli ve kararsız bir bölgedir. Evrimsel süreçte bu bölge duplikasyona uğramış ve SMN2 geni oluşmuştur.(5) Sadece insanlarda bulunan SMN2 geninin seçici bir avantaj sağladığı düşünülmekte, fare ve sıçanlarda tek kopya halinde bulunan gende meydana gelen mutasyonların embriyonik letaliteyle sonuçlanması bu görüşü desteklemektedir (30).

SMN2 geninin de farklı sayıda kopyaları (1-4) mevcuttur. SMN1 geninin *gene conversion* ile SMN2 genine dönüştüğü ve bu sayede SMN2 gen kopya sayılarının arttığı düşünülmektedir (31). SMN2 geninin kopya sayılarındaki artışa paralel olarak tam uzunlukta SMN protein miktarı da artmaktadır. SMN2 geninden sentezlenen tam uzunlukta protein oranı tip I hastalarda % 20'iken, tip III hastalarda bu oran % 40'a çıkmaktadır. SMN2 gen kopyaları fazla olan kişilerin hastalıklarının hafif seyretmesi nedeniyle, SMN2 geni hastalığı modifiye edici gen olarak kabul görmektedir (Şekil 2.2.3) (32-34).



Şekil 2.2.3. *Gene conversion* ile SMN2 kopya sayısı artışının ve hastalık ciddiyetindeki azalmanın şematik gösterimi (4).

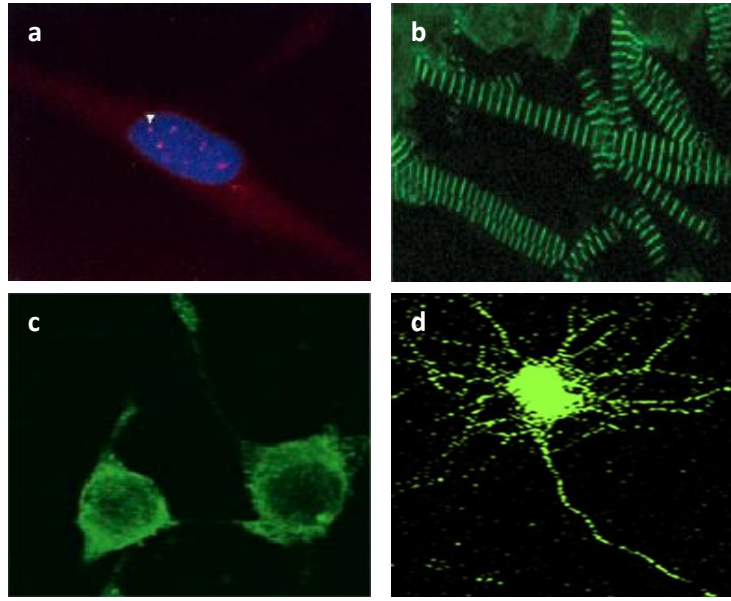
2.2.D. SMN Proteini ve Fonksiyonları

SMN gen ürünü olan SMN proteini (Uniprot #Q16637) 294 amino asit uzunluğunda olup 38 kDa ağırlığındadır. SMN, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir proteindir. SMN proteininin varlığı omurgalı canlıların yanı sıra omurgasızlarda (*Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*) ve tek hücreli ökaryotlarda da (*Schizosaccharomyces pombe*) gösterilmiştir. Hayvan modellerinde SMN yokluğunun embriyonik letaliteye neden olduğu saptanarak SMN proteininin gelişim için gerekli ve yaşamsal önemi olduğu gösterilmiştir (35-37).

SMN protein seviyesi gelişimsel ve doku-spesifik olarak kontrol edilmektedir (38). Embriyonik ve erken postnatal dönemlerde SMN ifadesi en yüksek düzeyde olup doğumla birlikte azalmaktadır (39, 40). SMN proteini en fazla omurilik, beyin, böbrek ve karaciğer dokularında bulunmaktadır. İskelet ve kalp kasında orta düzeyde, fibroblast ve lenfositlerde ise düşük düzeyde sentezlenmektedir (33).

SMN proteininin hücre çekirdeğinde *Gem* (*Gemini of coiled bodies*) adı verilen küresel yapılarda ve sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.2.4 a) (41, 42). *Gem* sayısı hücrelerdeki SMN miktarını yansıtmakta olup hastalık tiplerinin ayrılmasında önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Sağlıklı bireylerde 100 çekirdek başına düşen *Gem* sayısının 90, tip I hastalarda 3-8, tip II hastalarda 15-29, tip III hastalarda ise 30 olduğu gösterilmiştir (33).

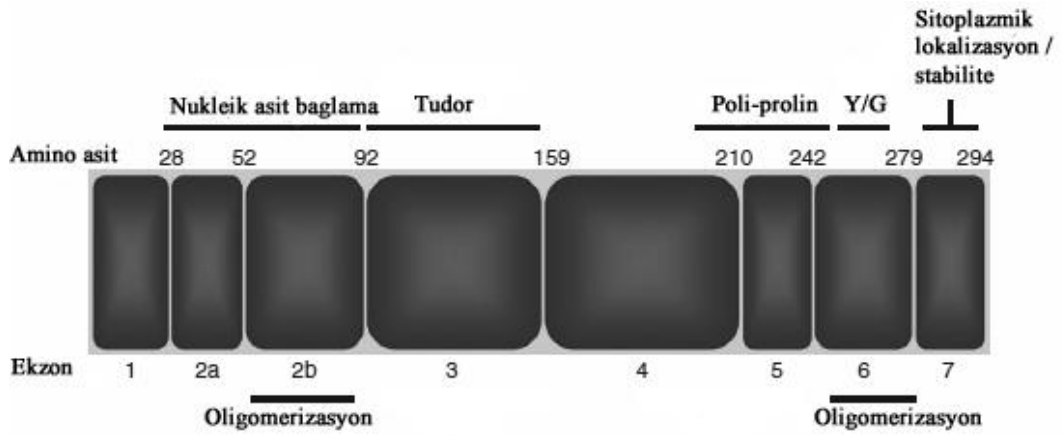
SMN protein yerleşimi hücre tipine göre farklılık göstermektedir (Şekil 2.2.4 b-d). Örneğin iskelet ve kalp kası hücrelerinde sarkomerik z-disklerde, nöron ve nöron-benzeri hücrelerde ise nöritlerde yani akson ve dendritlerde bulunan SMN proteininin nöritlerin dallanma noktaları ve uç kısımlardaki büyüme bölgelerinde yoğunlaştığı gösterilmiştir (11, 43, 44)



Şekil 2.2.4. SMN proteininin farklı hücre tiplerindeki lokalizasyonu.

a. Fibroblast hücresi; ok ucu *Gem* (SMN kırmızı) b. İskelet kası hücresi, c. Nöron benzeri PC12 hücresi, d. motor nöron (SMN yeşil) (11, 33, 44, 45)

SMN proteininin N-terminal ucunda nükleik asit bağlama ve Tudor domainleri, C-terminal ucunda ise poli-prolin domaini ve Y/G kutusu bulunmakta olup oligomerizasyonu sağlayan domainler mevcuttur (Şekil 2.2.5) (46). Oligomerik bir protein olan SMN, yapısındaki bu domainler sayesinde hücrelerin farklı kompartmanlarında yer alan proteinlerle etkileşerek fonksiyon görmektedir. SMN proteini snRNP biyogenezi ve öncül mRNA molekülünün *splicing*'inde fonksiyon gören Gemin proteinleri başta olmak üzere RNA metabolizması, transkripsiyon ve hücre iskeletiyle ilgili çok sayıda protein ile ilişkiye girmektedir (46-49).



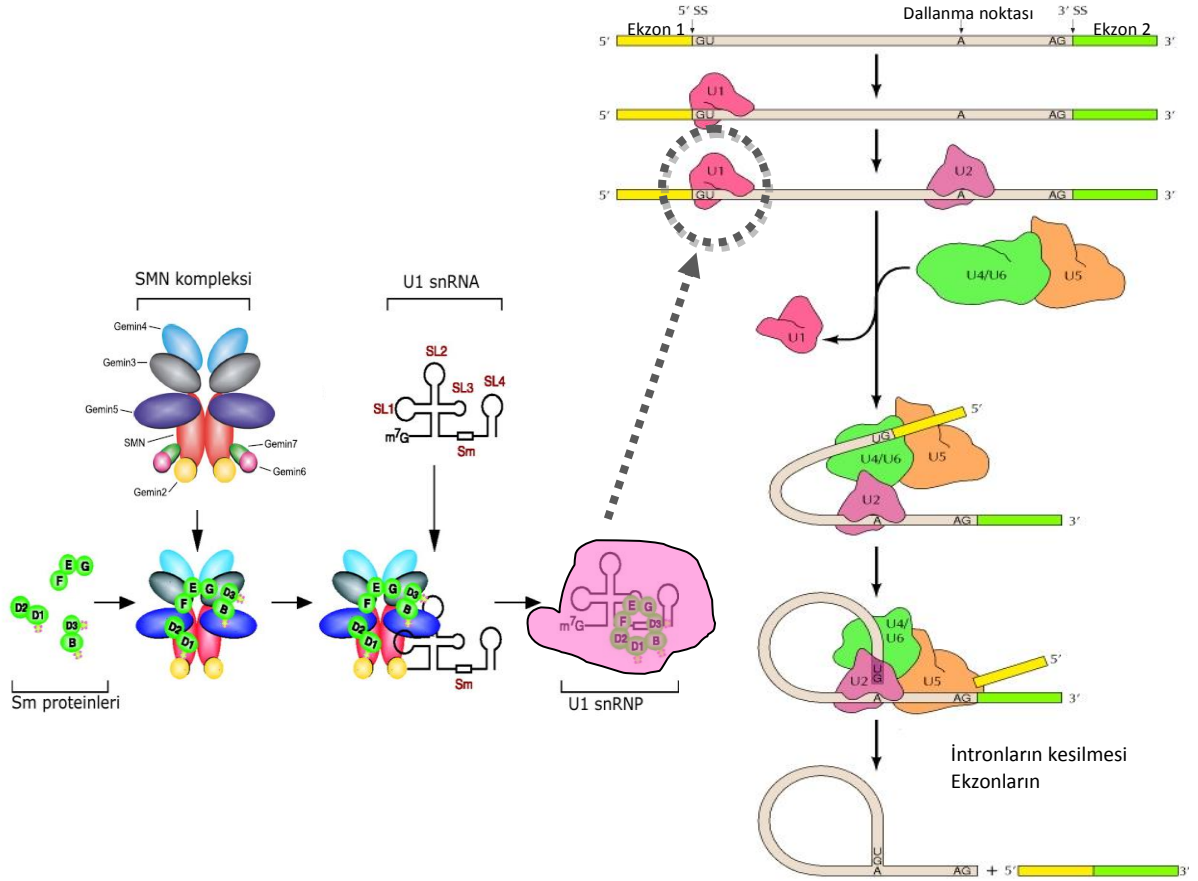
Şekil 2.2.5. SMN proteini domainleri (46)

SMN Proteininin “RNA *Splicing*” Fonksiyonu

SMN proteininin RNA *splicing* mekanizmasındaki fonksiyonu iyi tanımlanmıştır. RNA *splicing*, 5' başlıklama ve 3' poliadenilasyon ile birlikte, öncül mRNA (pre-mRNA) molekülünün olgun mRNA'ya dönüşmesi için gereken modifikasyonlardan biridir. *Splicing* tipi modifikasyonda, protein kodlamayan intronik diziler çıkartılmakta ve kodlayan diziler olan ekzonlar biraraya getirilmektedir (50, 51).

Splicing mekanizmasında *spliceosome* kompleksi kilit rol oynamaktadır. *Spliceosome* U1, 2, 4, 5 ve 6 olarak adlandırılan 5 farklı *small nuclear RNA* (snRNA) molekülü ile proteinlerin biraraya gelmesiyle kurulmaktadır. SMN bu kompleksteki birleştirici unsurdur. Oligomerize SMN proteininin Gemin 2, 3, 5 ve 8 proteinlerine direkt olarak bağlanmasıyla oluşan iskelet yapısına Gemin 7, 6, 3, 4 ve unrip proteinleri bağlanmaktadır. Bu şekilde oluşan SMN kompleksine Sm proteinlerinin ve snRNA moleküllerinin de katılmasıyla *small nuclear ribonucleoprotein particle* (snRNP)'lar oluşmaktadır. Farklı snRNP'ler biraraya gelerek *splicing*'in özgül ve doğru bir şekilde gerçekleşmesi sağlanmaktadır (52) (Şekil 2.2.6). SMN yokluğunda

snRNP'lerin bir araya gelememesi nedeniyle *splicing* hataları ortaya çıkmaktadır (9, 46, 53).



Şekil 2.2.6. SMN proteininin RNA *splicing*'deki rolü (48, 51)

SMN Proteininin Motor Nöron Spesifik Fonksiyonları

İnsan vücudunda bulunan yaklaşık 100 milyon adet kas fibrili, 120.000'den fazla motor nöron tarafından inerve edilmektedir. Erişkin bir bireydeki motor nöronlar, inerve ettikleri kas tipine göre α , β ve γ olarak sınıflandırılmakta olup SMA hastalığında α -motor nöronlar dejenere olmaktadır. α -motor nöronlar, beyin kökü ve omurilikten çıkarak ektrafuzal iskelet kaslarını inerve etmekte ve bu sayede kas kasılmasını sağlamaktadır (54). Motor nöronların fonksiyon görebilmesi ve kas kasılmasının sağlanabilmesi için hücre morfolojilerinin doğru şekillenmesi gerekmektedir. Nöronlar morfolojik olarak polarize hücreler olup hücre gövdesinden periferine doğru uzanan uzantılara sahiplerdir. Uzantılar hücre gövdesi çapının iki katı uzunluğuna eriştiğinde nörit olarak tanımlanır. Hücre farklılaşması sırasında nöritlerin bir tanesi diğerlerine oranla daha hızlı uzayarak akzonu oluşturmaktadır (55). Hücre gövdesinden çıkan kısa ve fazla dallanmış uzantılar ise dendrit olarak adlandırılmaktadır. Akzon ve dendritler moleküler ve fonksiyonel düzeyde farklı olup, dendritler hücreye gelen sinyalin alınmasından, akzon ise bu sinyalin sinir ve kas hücrelerine iletilmesinden sorumludur.

Nörit yapısının kurulmasında görevli temel hücre iskelet elemanı mikrotübüller olup nörit uzaması mikrotübül polimerizasyonu ile sağlanmaktadır. Mikrotübülün yapı taşları olan α ve β tübülün proteinleri birleşerek protofilamenti oluşturmakta, yaklaşık 13 adet protofilament ise uzun ve silindirik yapıdaki mikrotübülü meydana getirmektedir (56). Tübülün proteinleri hücre gövdesinde sentezlendikten sonra nörit ucuna doğru taşınmakta, mikrotübüllerin (+) ucuna eklenmekte, böylece mikrotübül uzaması gerçekleşmektedir. Mikrotübülün (-) ucunun depolimerize olması ise nöritin kısalmasına neden olmaktadır (55). Dinamik olan bu yapının regülasyonunda mikrotübül asosiyasyon proteinleri (MAP), depolimerize edici proteinler ve stabilize edici faktörler gibi çeşitli proteinler de önemli rol oynamaktadır (57).

Nöritlerin uç kısımlarında büyüme bölgeleri yer almaktadır. Büyüme bölgeleri sayesinde nöritler hedefleri olan sinir ve kas hücrelerine doğru yönelerek

uzamakta (*guidance*), hedefe ulaştıkları zaman ise dallanmaktadır. Aktin, büyüme bölgelerinin oluşumundan, *guidance* ve dallanmadan sorumlu ana proteindir. Nöronlarda sıklıkla aktinin β ve γ izoformları bulunmaktadır. Serbest bulunan G-aktin monomerleri birleşerek filamentöz aktini (F-aktin) oluşturmakta ve nörit uzaması için F-aktin miktarının artması gerekmektedir (56). F-aktin uzayan uç kısımlarda paralel sıralanmış demetler (*bundle*) halinde ve orta kısımlarda ise ağ şeklinde bulunmaktadır. Aktin iskeletinin dinamiği, aktine bağlanan aksesuar proteinler tarafından sağlanmaktadır. Büyüme bölgesinde ağ şeklinde bulunan F-aktin ile mikrotübül iskeletinin birbirinden kopuk olmadığı ve MAP proteinleri ile bağlandıkları gösterilmiştir (58).

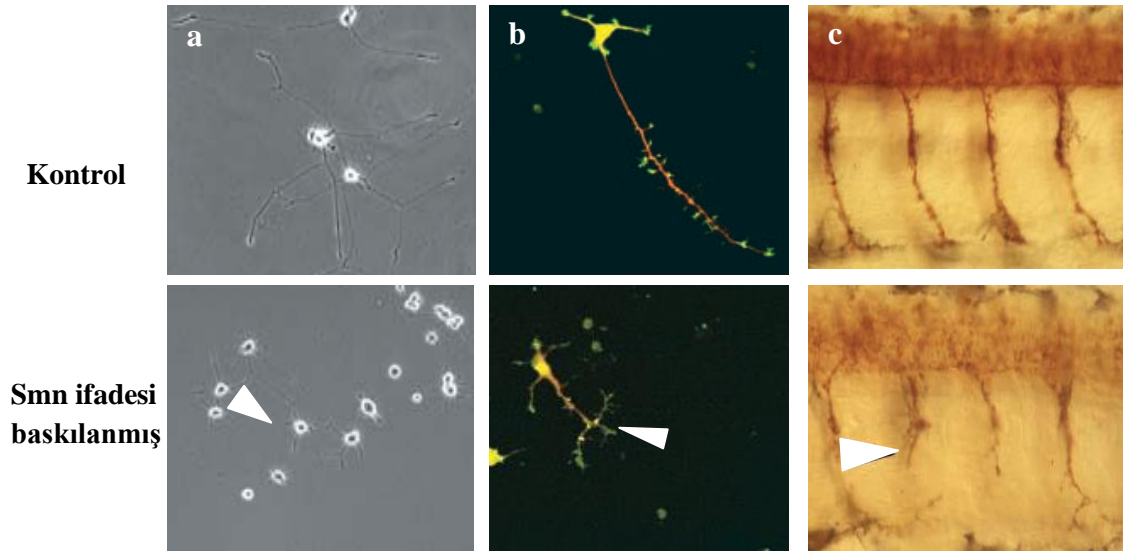
SMN proteini tüm hücrelerde sentezlenmekte ve fonksiyon görmekte olmasına karşın eksikliğinden en fazla motor nöron hücreleri etkilenmektedir. SMN proteininin en iyi tanımlanmış olan RNA *splicing* fonksiyonu ise hastalıkta görülen hücre seçiciliğini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmaların ışığı altında, spesifik motor nöron dejenerasyonunun açıklanabilmesi için iki görüş öne sürülmektedir (9).

Bu görüşlerden ilki SMN protein eksikliğinde, motor nöronlara özgül olan genlerin *splicing*'inin bozulmasıdır (59). SMN eksikliğinde çekirdekdeki snRNP'lerin bir araya gelmesinin zorlaştığı bilinmekle birlikte *splicing* hatalarının hastalığın ileri evrelerinde ortaya çıkması, hastalığın patolojisinde *splicing* hatalarının ikincil sırayı aldığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, nöritlerde yerleşim gösteren SMN proteini snRNP oluşumunda görevli Sm proteinleri ile birlikte bulunmamaktadır. SMN'in nöritlerde *splicing* dışında fonksiyon gören başka proteinlerle bağlandığının gösterilmesi, nöritteki rolünün farklı olduğunu düşündürmektedir (60-63).

Motor nöron seçiciliği ile ilgili diğer bir görüş ise SMN proteininin motor nöronlarda *splicing* dışında başka fonksiyonları olduğu ve protein seviyesindeki azalma ile bu fonksiyonların gerçekleştirilemediğidir (9, 61). İnsanda embriyonik gelişim süreci incelendiğinde, SMN ifadesinin merkezi sinir sisteminde en yüksek düzeyde olduğu ve doğumla birlikte azaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle SMN'in

merkezi sinir sistemi gelişimi için gerekli olduğu ve eksikliğinde nöronal gelişim hatalarının ortaya çıktığı düşünülmektedir (64). Ayrıca, SMN eksikliğinde nöromusküler bağlantı bölgelerinin gelişiminde de hatalar saptanmıştır. Pre-sinaptik akzonal büyüme bölgelerindeki kalsiyum kanallarının yerleşimi ve akzonal kalsiyum geçişi bozulmakta, nörofilament birikimi artmakta, sinaptik vezikül yoğunluğu ve nörotransmitter salınımı azalmakta ve hücre uyarımı bozulmaktadır (37, 65-70). SMN'in nöromusküler bağlantı bölgelerinde fonksiyon gören proteinlerin akzon boyunca taşınmasına aracılık ettiği, SMN protein seviyesindeki azalmanın bu nedenle nöromusküler bağlantı hatalarına neden olduğu düşünülmektedir (11, 45).

SMA'lı hasta bireylere ait postmortem nöropatolojik örneklerde omurilikte yanlış yerleşim gösteren, akson ve dendrit hatası bulunan ve sinaps oluşturamayan nöronlara rastlanmıştır (71). Histolojik bulguları destekler şekilde, tip I SMA'lı bireylerin fibroblast hücrelerinin yeniden programlanması yoluyla elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücreler, motor nöron hücrelerine farklılaştırıldığında nörit uzama hataları saptanmıştır (72). Benzer bulgular, nöron benzeri PC12 hücre hattında da gözlenmiş, Smn ifadesi baskılandığında hücre farklılaşmasının azaldığı ve nörit uzunluklarının kontrole göre kısa olduğu rapor edilmiştir (Şekil 2.2.7). Bu hücrelerde vektör ile dışarıdan Smn eksprese ettirildiğinde nörit uzamasının tekrar düzeldiği belirtilerek nörit uzama hatasının spesifik olarak Smn eksikliğinden kaynaklandığı gösterilebilmiştir (10). SMA'lı hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Smn ifadesi baskılanmış *zebrafish* modelinde motor akzonların uzamasında, uzantıların yerleşimlerinde ve dallanmasında hatalar saptanmıştır (12). SMA'lı fare modellerinden kurulan primer motor nöron kültürlerinde ise akzon boyunun kontrole göre kısa olduğu saptanmış ve akzonun uç kısmındaki büyüme bölgesinin boyutlarının kontrole göre daha küçük olduğu gösterilmiştir (11, 67) (Şekil 2.2.7).



Şekil 2.2.7. (a) SMN ifadesi baskılanmış PC12 , (b) fare primer motor nöron hücreleri ve (c) *zebrafish* modelinde görülen nörit uzama hataları (ok kısa nöritleri işaret etmektedir) (10-12)

SMN eksikliğinde hücre iskelet proteinlerinin yapılarının ya da yerleşimlerinin bozulduğu ve bu nedenle nörit boyunun kısaldığı hipotezi üzerinde durulmaktadır. SMN eksikliğinde hücre iskeletiyle ilişkili GAP-43 proteini ve F-aktin hatalı yerleşim göstermekte, nörofilamentler nöritlerde birikmekte, normalde nörit uzamasını inhibe eden Rho A-GTP protein ifadesi artmakta, nörit uzamasını indükleyen Cdc42-GTP'nin miktarı ise azalmaktadır (10). Ayrıca SMN eksikliğinde, aktine bağlanan profilin IIa ve aktin filamentini destekleyen plastin 3 proteinlerinin ifadeleri artmaktadır (10, 73). Aktin dinamiğindeki değişikliklerin SMA patogenezinin temeli olduğuna dair görüşler hakim olmakla birlikte SMN eksikliğinde mikrotübül yapısında da hatalar saptanmıştır. SMA'lı fare modelinde mikrotübülü destabilize eden statmin proteininin miktarı yüksek bulunmuş, SMN eksikliğinde polimerize tubulin ve β III-tubulin miktarları ile mikrotübül yoğunluğunun azalmış olduğu gösterilmiştir (74). Ayrıca karın kasını inerve eden nöronların presinaptik terminalinde normalde ince ve kalın demetler halinde organize olan mikrotübüllerin SMA'lı farede dağınık yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (69). SMN proteininin motor nöron hücrelerindeki fonksiyonları ile ilgili çok fazla araştırma bulunmasına rağmen fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

2.3. SMA'da Tedavi Yaklaşımları

SMA hastalığının moleküler patogenezi henüz net olarak anlaşılamamış olmasına rağmen elde edilen bulgular tedaviye yönelik bazı yaklaşımların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Tüm yaklaşımlardaki ortak amaç semptomların ortadan kaldırılması veya hafifletilerek hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılması olup tedaviye yönelik çalışmalar 3 ana başlık altında toplanmaktadır (6, 75-81);

1. SMN2 geninden kodlanan tam uzunluktaki SMN mRNA ve protein miktarının arttırılması

- SMN2 geni promotor aktivasyonu
- SMN2 *splicing*'inin düzeltilerek ekzon 7 atlanmasının engellenmesi
- Tam uzunlukta SMN protein stabilizasyonunun arttırılması
- SMN2 dur kodonunun atlatılarak $\Delta 7$ -SMN proteinin boyunun uzatılması ve stabilitesinin arttırılması

2. Kök hücre tedavisi ve gen tedavisi ile SMN protein eksikliğinin giderilmesi

3. Nörotropik ve nöroprotektif faktörler aracılığıyla motor nöron dejenerasyonun önlenmesi

Bu yaklaşımlardan ilki olan ve SMN2 geninden yararlanılarak tam uzunlukta SMN proteini elde etmek üzere yapılan araştırmalarda histon deasetilaz inhibitor grubu ümit verici olarak düşünülmektedir (82, 83).

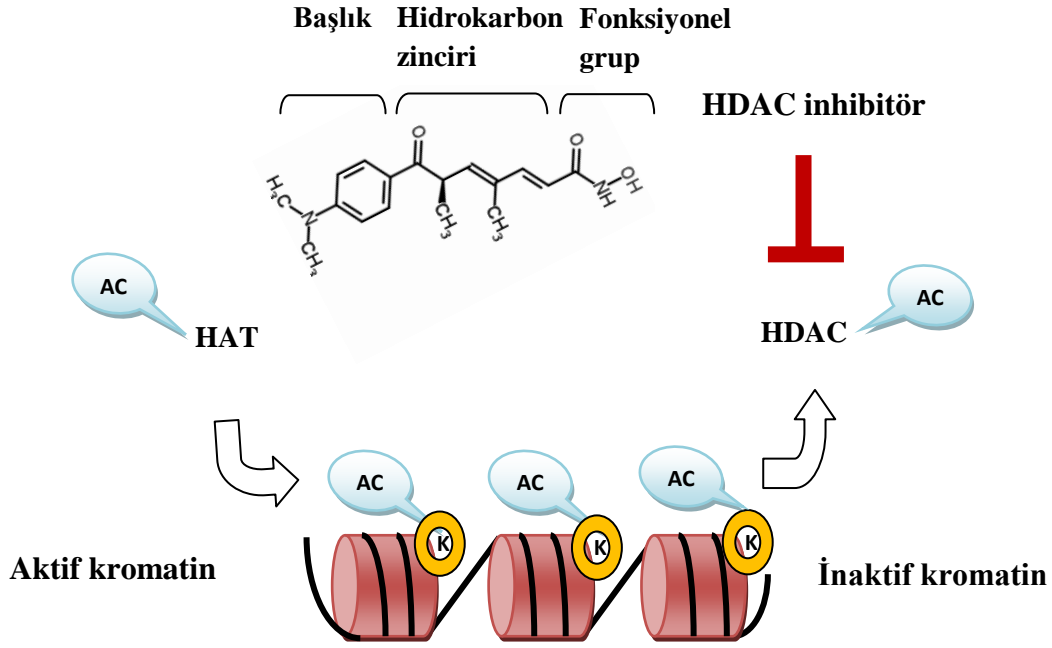
2.3.A. Histon Deasetilaz İnhibitörleri

DNA, histon ve histon olmayan proteinlerle sıkıca paketlenerek kromatin yapısını oluşturmaktadır. Kromatin yapısında H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 tip histon proteini bulunmaktadır. 146 baz çiftlik DNA 1,65 dönüş yaparak histon oktameri (2H2A, 2H2B, 2H3 ve 2H4) üzerine sarılmakta, H1 ve bağlaç DNA'nın bu yapıya katılmasıyla paketlenmenin temel birimi olan nükleozom yapısı oluşmaktadır (84). Histon proteinlerinin amino kuyruk bölgeleri nükleozomun dışarısında kalarak post-translasyonel modifikasyonlar geçirmektedir (85, 86). Bu modifikasyonlardan biri asetilasyondur. Histon proteinlerine asetil gruplarının histon asetil transferaz (HAT) enzimleri tarafından takılmasıyla kromatin yapısı gevşeyerek transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olup asetil gruplarının çıkartılması histon deasetilaz (HDAC) enzimleri tarafından katalizlenmektedir (85). Lizin amino asitlerinden asetil gruplarının çıkartılmasıyla kromatin tekrar sıkılaşmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır. Günümüze kadar 18 adet HDAC isofomu tanımlanmış olup sınıf I (HDAC 1, 2, 3, 8), sınıf II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10), sınıf III (SIRT 1-7) ve sınıf IV (HDAC 11) olmak üzere 4 grupta incelenmektedir (87).

HDAC enzimlerinin aktivitelerini baskılayan, farklı yapısal özelliklere ve etkinliklere sahip histon deasetilaz inhibitörleri geliştirilmiştir (88, 89). İnhibitörler fonksiyonel grup, hidrokarbon zinciri ve başlık kısmı olmak üzere 3 temel bileşen içermektedir (Şekil 2.2.8). Sınıf I ve II HDAC'lar üzerine etki gösteren inhibitörler fonksiyonel gruplarına göre hidroksamatlar, siklik tetrapeptidler, benzamidler, elektrofilik ketonlar ve karboksilik asitler olarak sınıflandırılmaktadır (89).

HDAC inhibitörleri kullanılarak histonların asetilli halde kalmaları, böylece gen ifadesinin aktivasyonu amaçlanmaktadır (Şekil 2.2.8). İnhibitör uygulanan hücrelerde genlerin % 7-10'unun ifade düzeyleri değişmekle birlikte, transkripsiyon faktörleri ve hücre iskelet elemanları gibi histon olmayan proteinler de asetile edilmektedir (88, 90). Bu nedenle HDAC inhibitörleri kanserin yanısıra SMA, Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların

tedavisine yönelik olarak da araştırılmaktadır. Bazı inhibitörler ile klinik faz çalışmalarına başlanmıştır (90).



Şekil 2.2.8. HDAC inhibitörlerinin yapısal özellikleri ve etki mekanizması

2.3.B. SMA Tedavisinde HDAC İnhibitörlerinin Rolü

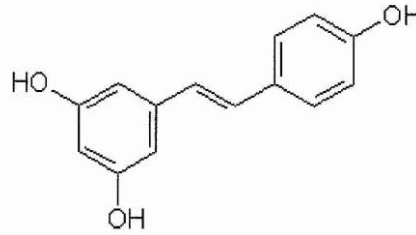
SMN2 gen kopya sayısı fazla olan SMA hastalarında hastalığın hafif seyretmesi tedavi araştırmalarına temel teşkil etmektedir. HDAC inhibitörlerinin etkilerinin SMN2 gen promotörü ve/veya *splicing* üzerine olduğu gösterilmiştir. SMA tedavisi amacıyla karboksilik asitler (sodium bütirat, fenil bütirat, sodium fenil bütirat, valproat), hidroksamatlar (TSA, SAHA, Panobinostat) ve benzamid (M344) grubu HDAC inhibitörlerinin etkileri araştırılmış ancak henüz tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmamıştır (91-100). Yarı ömürlerinin az olması ve/veya sitotoksik etkileri klinik uygulamaları sınırlamaktadır. Etkisi en fazla araştırılan HDAC inhibitörü valproat olup klinik araştırmalar faz II evresine ulaşmıştır. Valproat ile gerçekleştirilen klinik faz çalışmalarında hastaların yaklaşık %35'i uygulamalara olumlu cevap vermiştir. Yarı ömrünün diğer inhibitörlere göre uzun olması (8-10 saat) ve yan etkilerinin azlığı klinik uygulamalar açısından avantaj sağlamaktadır. (101, 102).

SMA tedavisinde kullanılabilecek etkin bir ilacın henüz geliştirilememiş olması nedeniyle HDAC inhibitörü özelliğine sahip yeni bileşikler tasarlanmakta ve SMN2 geni üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Anabilim Dalı'mızda 2006-2009 yılları arasında yürütölmüş olan TÜBİTAK KAMAG projesi kapsamında, SMA tedavisinde kullanılabilecek, karboksilik asit grubu HDAC inhibitörlerinden literatürde bildirilenlerden daha etkili olanların geliştirilmesi amaçlanmış, yapı-aktivite ilişkileri göz önüne alınarak modifiye edilen bileşikler türevlendirilmiş ve SMA'lı hasta fibroblast hücrelerine uygulanarak *in-vitro* ortamda tedavi edici etkileri araştırılmıştır. Araştırılan bileşikler arasında polifenol yapısında olan resveratrol ve kurkumin aktif bulunmuş, nöroprotektif özellikleri de dikkate alınarak fonksiyonel araştırmalara değer görölmüştür (7, 8, 103).

Polifenoller, yapısal olarak birden fazla fenol halkası içeren, bitkisel kökenli doğal bileşikler olup insan diyetinde önemli yer tutmaktadır. Günümüze kadar 8000 farklı polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Bu bileşikler kimyasal yapılarına göre

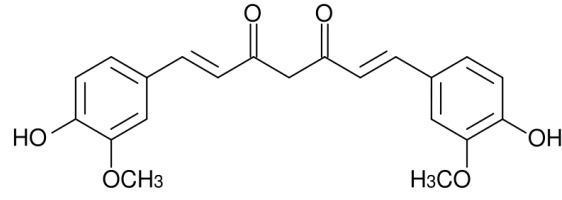
flavonoidler ve flavonoid-olmayanlar şeklinde gruplandırılmaktadır (104, 105). Polifenolik bileşiklerin farklı hücresel hedefleri olup, anti-oksidatif, anti-inflamatuvar, anti-karsinojenik, kardiyoprotektif ve nöroprotektif özellikleri tanımlanmıştır. Biyolojik etkilerinin yaygın olması nedeniyle polifenolik bileşiklerin kanser, kardiyovasküler ve nörodejeratif hastalıklardaki tedavi potansiyelleri araştırılmaktadır. Besinlerle alınabilmeleri, farmakolojik olarak güvenilir olmaları ve kan beyin bariyerini geçebilmeleri tedaviye yönelik çalışmaları kolaylaştırmaktadır (106, 107).

Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroksistilben) üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, ve dut içeriğinde bulunan flavonoid-olmayan bir polifenoldür (Şekil 2.2.9) (104, 108). Önceki çalışmalarımızda resveratrolün pan-HDAC inhibitörü (IC_{50} : 650 μ M) olduğu ve SMA tip I hasta fibroblast hücrelerine uygulandığında SMN2 mRNA ve protein ifadesini 1.3 kat arttırdığı gösterilmiştir (7).



Şekil 2.2.9. Resvertrolün kimyasal yapısı

Kurkumin diğer bir flavonoid-olmayan polifenolik bileşiktir (Şekil 2.2.10) (104). *Curcuma longa* bitkisinden ekstrakte edilen kurkumin sarı renkte olup zerdeçal, köri ve hardal içeriğinde yüksek oranda bulunmakta, ayrıca besin, ilaç ve kozmetik ürünlerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Önceki çalışmalarımızda kurkuminin pan-HDAC (IC_{50} : 115 μ M) ve HDAC 8 (IC_{50} : 642 μ M) inhibisyon aktivitesi gösterdiği ve SMA tip I hasta fibroblast hücrelerinde SMN ifadesini 1.6 kat arttırdığı gösterilmiştir (8, 103)



Şekil 2.2.10. Kurkuminin kimyasal yapısı

SMA hastalığında motor nöronlarda SMN protein eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan nörit kısalığının düzeltilmesinin *in-vitro* SMA tedavisinde önemli bir adım olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle, tez çalışmasında SMA tip I hasta fibroblast hücrelerinde gen ifadesi düzeyinde etkili olduğu gösterilmiş olan resveratrol ve kurkuminin, nöron benzeri PC12 hücrelerinde nörit boyu uzunluğunu indükleyici etkileri incelenerek bileşiklerin tedavi potansiyelleri araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmalarda PC12 ve Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hatları kullanılmış olup hücreler “Canada Ottawa Research Health Institute, Neuromuscular Diseases” laboratuvarı (Prof. Dr. Rashmi Kothary) tarafından laboratuvarımıza bağışlanmıştır.

PC12, sıçan böbrek üstü bezinin medullasında oluşan nöroendokrin tümör hücrelerinden kurulmuş bir hücre hattıdır. Kültür ortamına sinir büyüme faktörünün (NGF) eklenmesiyle hücre bölünmesi durmakta, nörit uzantıları oluşmakta ve 7 gün sonunda hücreler sempatik nöronlara farklılaşmaktadır.

Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hattı, Smn-sh-RNA vektörünün transfeksiyonu ile oluşturulmuş olup Smn proteinin sentezi kalıcı olarak % 85 oranında baskılanmıştır.

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.2.A. PC12 Hücre Hattı Kültür Koşulları

Hücre Kültür Kaplarının Kaplanması:

Sıçan kollajen tip I (Trevigen, Cultrex)	: 1mg/ml distile su (dH ₂ O)
--	---

Hücre Kültürü Çoğaltma Ortamı:

DMEM (4,5 g/l D-glukoz) (Biochrom AG)	: 164 ml
---------------------------------------	----------

At serumu (HS) (%10) (Gibco)	: 20 ml
------------------------------	---------

Fötal dana serumu (FBS) (%5) (Biochrom)	: 10 ml
---	---------

Esansiyel olmayan amino asit (%1) (Gibco)	: 2 ml
L-glutamin (200 mM, %1) (Biochrom)	: 2 ml
Antibiyotik/antimikotik (%1) (Gibco)	: 2 ml
(Penisilin/Streptomisin/Amfotericin/Penisilin G sodyum tuzu/Streptomisin sülfat/ Amfoterisin B; 10.000U/10.000µg/25 µg)	

Hücre Kültürü Farklılaştırma Ortamı:

DMEM (4,5 g/l D-glukoz)	: 192 ml
FBS (%1)	: 2 ml
Esansiyel olmayan amino asit (%1)	: 2 ml
L-glutamin (%1)	: 2 ml
Antibiyotik/antimikotik (%1) (Gibco)	: 2 ml
Sinir büyüme faktörü 2.5S (NGF) (Millipore)	: 100 ng/ml

Hücre Dondurma Ortamı:

%90 FBS	: 3.6 ml
%10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (AppliChem)	: 0.4 ml

3.2.B. Smn ifadesi baskılanmış PC12 Hücre Hattı Kültür Koşulları

Smn ifadesi baskılanmış hücreler, PC12 hücreleri ile benzer şekilde kültüre edilmektedir. Smn ifadesi baskılanmış hücrelerinin seçilimi amacıyla hücre kültürü çoğaltma ve farklılaştırma ortamına Geneticin (G418) (Invitrogen, 1mg/ml) antibiyotiği eklenmektedir.

3.2.C. Bileşik Ana Stok Konsantrasyonları

Kurkumin C ₂₁ H ₂₀ O ₆ (Sigma)	: 1.15 mg/ml DMSO (3125 µM)
<i>Trans</i> -Resveratrol C ₁₄ H ₁₂ O ₃ (Sigma)	: 1.4 mg/ml DMSO (6250 µM)
Valproat (VPA) C ₈ H ₁₅ NaO ₂ (Sigma)	: 8.3 mg/ml 1 X <i>Phosphate buffered saline</i> (PBS, Medicago) (50.000 µM)

3.2.D. İmmunfloresan Boyama

Hücre Canlılığı Analizi

Paraformaldehit (% 4, Sigma)	: 40 mg/ml 1 X PBS
<i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate</i> (DAPI, <i>dilactate</i>) (Invitrogen, molecular probes)	: 5 mg/ml dH ₂ O

Gem Sayısı Analizi

Poli-L-Lizin (Sigma) solüsyonu	: % 0.01 w/v
Laminin (R&D Systems,Cultrex)	: 20 µg/ml
Metanol % 100, soğuk (Merck)	: 2 ml
1 X PBS	: 2 ml
Anti-SMN primer antikor (BD Biosciences)	: 1:100
Alexa-flour 488 Sekonder antikor (İnvitrogen)	: 1:500
DAPI	: 5 mg/ ml dH ₂ O
ProLong® Gold Antifade solüsyonu (Invitrogen, Molecular probes)	: 50 µl
Bloklama tamponu:	
Tween 20 (% 0.1) içeren 1 X PBS	: 800 µl
Sıçan serum albumin (BSA) (0.1 gr/ml, Sigma)	: 100 µl
Keçi serumu (Sigma)	: 100 µl

3.2.E. Protein İzolasyonu

Koruyucu tampon:

Tris baz 0.5 M pH 6.8 (Sigma)	: 625 µl
EDTA 0.5 M (Sigma)	: 50 µl
SDS (% 20, Carlo Erba)	: 2.5 ml
Proteaz inhibitörü (Roche)	: ½ tablet
dH ₂ O	: 2 ml

3.2.F. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

% 3 Poliakrilamid Jel:

Akrilamid bisakrilamid (% 30, Sigma)	: 250 µl
Tris baz 1M pH 6.8	: 312 µl
dH ₂ O	: 1.9 ml
SDS (% 20) pH 7.2	: 12.5 µl
APS (% 25, Sigma)	: 8 µl
TEMED (Sigma)	: 5 µl

% 12 Poliakrilamid Jel:

Akrilamid bisakrilamid (% 30)	: 3.13 ml
Tris baz 1M pH 8.8	: 2.5 ml
dH ₂ O	: 1.91 ml

SDS (% 20) pH 7.2	: 37.5 µl
APS (% 25)	: 20 µl
TEMED	: 5 µl

3.2.G. Western Blot

Yükleme tamponu:

NuPAGE® Redüksiyon Ajanı (10X)	: 2 µl
LDS yükleme solüsyonu (4X)	: 5 µl
(İnvitrogen)	

Yürütme tamponu (pH 8.6):

Tris baz	: 3 g
Glisin (Sigma)	: 14.4 g
dH ₂ O ile 1000 ml 'ye tamamlanır	

Transfer tamponu (pH 8.3):

Tris baz	: 5.82 g
Glisin	: 2.93 g
SDS (%10)	: 3.75 ml
Metanol (%100)	: 200 ml
dH ₂ O ile 1000 ml 'ye tamamlanır	

Yıkama tamponu (*Tris-buffered saline*, TBS) (pH 7.4):

Tris baz 20 mM	: 2.42 g
NaCl (Carlo Erba) 137 mM	: 8 g
dH ₂ O ile 1000 ml 'ye tamamlanır	

TBS-T:

TBS	: 1000 ml
Tween 20 (% 0.1, Sigma)	: 1 ml

Bloklama tamponu:

BSA	: 0.05 g
Süt tozu	: 0.5 g
TBS-T	: 10 ml

Primer antikorlar: Anti-SMN : 1: 5000
Anti-Aktin (Sigma) : 1: 2000

Sekonder antikorlar: Anti-SMN : 1: 2000
(*Anti-mouse* IgG peroksidaz konjuge)
Anti- Aktin : 1: 2000
(*Anti-rabbit* IgG peroksidaz konjuge, Amersham)

Görüntüleme solüsyonu: ECL plus (Amersham)

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Analiz Programları

Nörit boyu analiz programı : Leica Qwin Image Analysis Software

Western blot kantitasyon programı : Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

3.4. Bilgisayar Destekli 3 Boyutlu Moleküler Modelleme Çalışmaları

Protein Data Bankası Erişim Adresi : www.rcsb.org

SMN Tudor Domain Numarası : 1MHN

Modelleme Programı : AutoDock 4.2.

3.5. Yöntemler

3.5.A. PC12 ve Snn İfadesi Baskılanmış PC12 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre Kültür Kaplarının Kaplanması

PC12 ve Snn ifadesi baskılanmış PC12 hücreleri polistren hücre kültür kaplarına zayıf olarak tutunmaktadır. Hücrelerin yapışarak çoğaltılabilmesi ve farklılaştırılabilmesi için kültür kapları sıçan kollajen tip I ile kaplanmıştır.

1. Sıçan kollajen tip I solüsyonu hücre kültür kabini içerisinde steril şişeye aktarıldı.
2. 80 ml steril dH₂O eklenerek stok solüsyon hazırlandı.
3. 100 x 20 mm kültür kapları (Greiner Bio-one) içerisine 10 ml, 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine ise 2 ml stok solüsyon koyuldu.
4. Kültür kapları % 5 oranında CO₂ içeren, 37 °C'deki etüve (Heraeus) kaldırılarak 1 gün süreyle etüvde bırakıldı.
5. Ertesi gün kültür kapları içerisindeki kollajen, stok solüsyon şişesine alındı.
6. Kültür kapları kapakları yarım açık halde, steril kabin içerisinde 3 saat bırakılarak kollajenin kuruması sağlandı.
7. Kültür kaplarının ağzı parafilm ile sıkıca kapatıldı ve +4°C'de kaldırılarak saklandı.

Hücre Çoğaltılması

1. Kollajen ile kaplanmış 100 x 20 mm kültür kabına 9 ml çoğaltma ortamı koyuldu.
2. Hücreler 37°C su banyosunda hızlıca çözüldükten sonra steril pastör pipeti yardımıyla çoğaltma ortamına eklendi.
3. Kültür kabı hafifçe sağa-sola çalkalanarak hücrelerin homojen bir şekilde kaba yayılması sağlandı ve küme oluşturmaları engellendi.
4. Kültür kabı % 5 oranında CO₂ içeren, 37 °C'deki etüvde istenilen hücre sayısına ulaşana kadar inkübe edildi.

Hücre Dondurulması

1. % 80 yoğunluğa ulaşan kültür kabındaki hücreler pipetajla kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüje (Hettich) edildi.
2. % 20 FBS (3,6 ml) ve % 90 DMSO (0,4 ml) içeren dondurma ortamı, 15 ml'lik tüp içerisinde hazırlandı.
3. Santrifuj sonrası süpernatant atılarak hücrelere dondurma ortamı eklendi ve resüspand edildi.
4. Hücreler, 4 adet dondurma tüpüne 1 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra izopropanol içeren hücre dondurma kabına konularak -80°C derin dondurucuya kaldırıldı ve saklandı.

Hücre Sayımı ve Pasajlanması

1. Kültür kaplarındaki çoğaltma ortamı steril cam pastör pipeti yardımıyla çekilerek atıldı.
2. 2 ml steril 1 X PBS eklenerek ölü hücrelerin uzaklaşması sağlandı.
3. 1 X PBS cam pastör pipeti ile çekilerek atıldı.
4. 4 ml çoğaltma ortamı eklenerek pipetaj ile hücreler kaldırıldı.
5. 950 µl çoğaltma ortamı 1.5 ml'lik tüpe alınarak içerisine 50 µl hücre koyuldu (sulandırma faktörü:20). Buradan 10 µl alınarak hemositometreye aktarıldı ve 10 adet alan sayılarak 1 ml'deki hücre sayısı belirlendi. Kültür kabındaki hücrelerin sayısı ise sulandırma faktörü (20) x hücre sayısı / 1 ml x 10⁴ formülü kullanılarak hesaplandı.
6. Hücreler aşağıda belirtilen şekilde pasajlanarak kültür kaplarına aktarıldı
 - a. Nörit boyu ve *Gem* sayısı analizleri için;
 - PC12 hücreleri 100 x 20 mm kültür kaplarına 15 x 10⁴ veya 6 kuyucuklu kültür kaplarına 21 x 10³ olacak şekilde dağıtıldı, çoğaltma ortamı eklenerek yapışmaları için bir gece 37°C % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.
 - Smn ifadesi baskılanmış hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 25 x 10³ olacak şekilde dağıtıldı, çoğaltma ortamı eklenerek yapışmaları için bir gece 37°C % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.

b. Protein izolasyonu için;

- PC12 hücreleri 100 x 20 mm kültür kaplarına 1×10^6 hücre olacak şekilde dağıtıldı, çoğaltma ortamı eklenerek yapışmaları için bir gece 37°C % 5 CO_2 'li etüvde inkübe edildi.

Hücre Farklılaştırılması

1. Hücreler kültür kabına yapıştıktan sonra çoğaltma ortamı çekilerek farklılaşma karışımı eklendi. Farklılaşma karışımı taze olacak şekilde, farklılaşma ortamı ile 100 ng/ml NGF karıştırılarak hazırlandı.

2. Kültür kapları hafifçe sağa sola çalkalanarak, inkübasyon süresinin sonuna kadar (3, 5, 7 gün) 37°C % 5 CO_2 'li etüve kaldırıldı.

3. Farklılaşma karışımı aşağıda belirtilen sürelerde değiştirildi;

- Nörit boyu ve *Gem* sayısı analizi deneylerinde farklılaşmanın başlatıldığı günü takiben üç günde bir kültür kaplarındaki ortam, taze NGF içeren farklılaşma ortamı ile değiştirildi.
- Protein izolasyonu amacıyla yapılan deneylerde, farklılaşmanın başlatıldığı günü takiben iki günde bir kültür kaplarındaki ortam, taze NGF içeren farklılaşma ortamı ile değiştirildi.

Hücrelere Resveratrol, Kurkumin ve Kontrol Amaçlı Valproat Uygulanması

1. Hücreler pipetaj yapılarak kültür kabından kaldırıldı.
2. Hücre sayıları hemositometre yardımıyla hesaplandıktan sonra kültür kaplarına dağıtıldı. Çoğaltma ortamı ilave edilerek yapışmaları için bir gece 37°C % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.
3. Resveratrol ve kurkumin hassas terazi ile tartıldıktan sonra DMSO içerisinde çözülerek ana stok solüsyonları hazırlandı. Kontrol olarak kullanılan valproatın ana stoğu 1 X PBS içerisinde hazırlandı. Ana stoklar hücre kültür ortamı ile seyreltilerek istenilen konsantrasyonlarda ara stok solüsyonlar oluşturuldu.
4. Hücre kültüründeki çoğaltma ortamı atıldı ve 1 X PBS ile ortam yıkanarak ölü hücreler uzaklaştırıldı.
5. NGF (100 ng/ml) içeren farklılaşma karışımı taze olarak hazırlanarak, 100 x 20 mm kültür kaplarına 10 ml, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ise 2 ml olacak şekilde dağıtıldı.
6. 5 µM Resveratrol, 500 nM kurkumin ve 2 mM valproat, triplike olacak şekilde hücrelere uygulandıktan sonra kültür kapları hafifçe sağa sola çalkalanarak, inkübasyon süresinin sonuna kadar (3, 5, 7 gün) 37°C % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı. Her inkübasyon süresi farklı kültür kabı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.B. Nörit Boyu Analizi

İnkübasyon süresi tamamlanan kültür kaplarındaki hücreler ışık mikroskobu (Trinoküler Floresan Ataçmanlı Inverted Mikroskop, Leica DMIL) ile incelendi. Kültür kabında en uzun nöriti içeren hücrelerin bulunduğu alanlar saptanarak 10X objektif ile görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. Fotoğraf çekimleri aşağıda belirtilen kriterler doğrultusunda gerçekleştirildi;

- Fotoğraf çekilen alanların kültür kabının tümünün farklılaşma durumunu yansıtmasına dikkat edildi. Bu nedenle kültür kaplarının her birinden en az 20 farklı alanın fotoğrafı çekildi.
- Fotoğraf çekilen alanlardaki hücre yoğunluğunun, nörit ölçümünü yapabilecek yoğunlukta olmasına dikkat edildi. Hücre yoğunluğunun çok fazla olması durumunda nöritlerin üst üste gelmesinden ve nöritin hangi hücreye ait olduğunun anlaşılmasından dolayı doğru bir ölçüm gerçekleştirilememektedir. Bu nedenle doğru ölçüm yapılabilecek yoğunlukta hücre bulunan alanların fotoğrafının çekilmesine dikkat edildi.

Fotoğraf çekilen alanlar incelenerek her kültür kabı için belirtilen kriterlere uygun 3 alan seçilerek analiz edildi (Şekil 3.1). Nörit boyu analizleri aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi;

- Alanlardaki farklılaşmış hücre sayıları belirlendi. Uzantı oluşturan hücreler farklılaşmış olarak kabul edildi.
- Hücre çapının 2 katı ya da daha uzun olan uzantılar nörit olarak kabul edildi ve her hücrenin en uzun nöritinin boyu ölçüldü.
- Ölçümler linear olarak, μm cinsinden yapıldı.

3.5.C. Bileşik Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Resveratrol ve kurkumin uygulaması sonrasında hücrelerin canlılıkları DAPI çekirdek boyaması yöntemiyle incelendi.

1. Fotoğrafi çekilen hücrelerdeki kültür ortamı pipet ile çekilerek atıldı.
2. 2 ml 1 X PBS ile ortam 2 kez yıkanarak ölü hücreler uzaklaştırıldı.
3. 2 ml % 4 PFA eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında hücrelerin kültür kabına yapışması sağlandı.
4. PFA pipetle çekilip atıldı ve ortam 2 ml 1 X PBS ile 2 kez yıkanarak PFA uzaklaştırıldı.
5. DAPI 1:1000 oranında 1 X PBS ile seyreltilerek hücrelere uygulandı. 1 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücre çekirdeklerinin boyanması sağlandı.
6. DAPI pipetle çekilip atıldıktan sonra ortam 2 ml dH₂O ile 2 kez yıkanarak boyama kalıntıları uzaklaştırıldı.
7. Floresan ataçmanlı *inverted* mikroskopta DAPI filtresiyle hücre çekirdekleri 10X objektif kullanılarak incelendi ve fotoğraf çekildi. Çekirdek morfolojileri incelenerek parçalanmış çekirdekler ve fazla ışığa veren çekirdekler ölü olarak kabul edildi. Toplam hücre sayısı ile oranlanarak canlılık yüzdesi hesaplandı.

3.5.D. Bileşiklerin Çekirdekteki Smn Protein Miktarı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Bileşik uygulamalarının çekirdekteki Smn protein miktarına etkisi immunfloresan boyama yöntemi kullanılarak yapılan *Gem* sayısı analizi ile araştırıldı.

1. Steril cam lameller 1:100 oranında seyreltilmiş poli-l-lizin içerisine konularak 1 gece % 5 CO₂ 37°C etüvde bırakıldı.
2. Ertesi gün poli-l-lizin cam pipet yardımıyla atılarak lameller steril pens yardımıyla alındı ve dH₂O içerisinde 3 defa yıkandı.
3. Poli-l-lizin kaplanmış olan lameller 6 kuyucuklu kültür kaplarına yerleştirilerek üzerlerine 400 µl laminin koyuldu. Kültür kapları 1 saat hücre kültür kabini içerisinde bırakıldı ve lamellerin laminin ile kaplanması sağlandı.
4. Laminin cam pipet yardımıyla çekilip atıldıktan sonra kuyucuklara hücreler ve çoğaltma ortamı eklendi. Hücrelerin lamellere yapışması için kültür kabı 1 gece % 5 CO₂ 37°C etüvde bırakıldı.
5. Ertesi gün çoğaltma ortamı atılarak farklılaşma karışımı ile birlikte 5 µM resveratrol veya 500 nM kurkumin eklendi.
6. Hücreler % 5 CO₂ 37°C etüvde 3 gün farklılaştırıldı.
7. İnkübasyon süresi sonunda hücre kültür ortamı pipet ile çekilerek atıldı
8. Hücreler 1 ml 1 X PBS ile yıkanarak ortamdaki ölü hücreler uzaklaştırıldı.
9. PBS pipet yardımıyla çekilip atıldıktan sonra hücrelere 2 ml % 100 soğuk metanol eklendi. Kültür kabı 5 dakika -20°C dondurucuya kaldırılarak hücrelerin kültür kabına yapışmaları sağlandı.
10. Metanol pipet ile çekilip atıldıktan sonra kültür kabı oda sıcaklığına alındı ve kapağı 30 dakika açık bırakılarak metanolün uçması sağlandı.

11. Kültür kapları içerisindeki lameller ince uçlu pens yardımıyla çıkartılarak bloklama tamponu içerisinde 1 saat bırakıldı.
12. Anti-SMN primer antikoru % 10 keçi serumu ve % 0.1 Tween 20 içeren 1 X PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilerek hücrelere uygulandı. 4°C buzdolabında gece boyunca inkübe edildi.
13. Ertesi gün hücreler 4 kez 5 dakika 1 X PBS ile yıkanarak primer antikor uzaklaştırıldı.
14. Sekonder antikor 1:500 oranında % 10 keçi serumu ve % 0.1 Tween 20 içeren 1 X PBS içerisinde sulandırılarak 45 dakika hücrelere uygulandı.
15. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 4 kez 5 dakika 1 X PBS ile yıkandı ve sekonder antikor uzaklaştırıldı.
16. En son yıkama sırasında 1 X PBS içerisine 1:1000 oranında DAPI eklenerek hücre çekirdekleri boyandı.
17. Lam zerine 1 damla *mounting* solüsyonu damlatıldıktan sonra hücreler lama bakacak Şekilde lameller lam üzerine kapatıldı.
18. Hücre çekirdeklerinde bulunan *Gem* yapıları 100X immersiyon objektifi ile görüntülenerek analiz edildi.

3.5.E. Kurkuminin Total Smn Protein Miktarı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Kurkuminin hücredeki total Smn protein miktarına etkisi, Western blot yöntemiyle araştırıldı. 3, 5 ve 7 gün süreyle 500 nM kurkumin uygulanan PC12 hücrelerinin Smn protein miktarları, uygulama yapılmayan kontrol hücrelerle karşılaştırıldı. Protein analizleri duplike olacak şekilde gerçekleştirildi.

Protein İzolasyonu

İnkübasyon süreleri sonunda 200 µl koruyucu tampon çözelti içerisinde alınan hücreler buz içerisinde koyularak sonikatöre yerleştirildi. Hücreler 20 sn süresince % 50 amplitüdde, 10 kere sonike edilerek hücre membranları parçalandı. 13200 rpm'de 3 dakika santrifugasyon yapılarak parçalanmış membranların ve organellerin çökmesi sağlandı. Süpernatant 1.5 ml'lik temiz tüplere aktararak buza alındı ve protein konsantrasyonları ölçüldü.

Protein Konsantrasyon Tayini

Hücrelerden izole edilen proteinlerin konsantrasyonları *bicinchoninic* asit (BCA, Pierce) yöntemiyle tayin edildi.

1. Standart eğrinin oluşturulması amacıyla, 0.1, 0.4, 0.8 ve 1.2 mg/ml konsantrasyonlarda BSA dilüsyonları % 10 SDS içerisinde hazırlandı.
2. 45 µl % 10 SDS içeren tüplere, izole edilen protein örneklerinden 5 µl koyularak pipetaj yapıldı.
3. A ve B solüsyonlarından 50A:1B oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Her tüpe 1 ml çalışma solüsyonu eklenerek, tüpler aşağı-yukarı karıştırıldı ve 37°C etüvde 30 dakika inkübe edildi.

4. İnkübasyon süresi sonunda 2 µl örnek ile NanoDrop spektrofotometrede (Thermo Scientific) ölçüm yapılarak proteinlerin konsantrasyonları tayin edildi.

SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Proteinler iki katmanlı jel (*resolving* ve *stacking*) sistemi hazırlanarak SDS poliakrilamid jel elektrofrez (PAGE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldılar.

1. Dikey elektrofrez sisteminin camları etanol ile temizlendikten sonra sabitlenerek camlar arasında pipet yardımıyla % 12 akrilamid jel döküldü (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell BIORAD). Jelin üzerinde yaklaşık 3 cm boşluk bırakıldı ve bu boşluğa dH₂O eklenerek jel yüzeyinin düzgün olması sağlandı. Jel polimerize olduktan sonra pipet yardımıyla % 3 akrilamid jel döküldü ve camlar arasında tarak yerleştirildi. Üst kısımdaki jel de polimerize olduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve kuyucuklar elektrofrez tamponu ile yıkanarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.

2. Her örnekten 20 µg protein, redüksiyon ajanı ve yükleme tamponu ile karıştırılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde dH₂O eklendi. Tüp içerikleri vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4 dakika kaynar su içinde bırakıldı. Kaynama süresi sonunda örnekler santrifuj edilerek buza alındı.

3. Örnekler triplike olacak şekilde kuyulara yüklendi ve 52 V, 30 dakika boyunca % 3 akrilamid jelde elektrofrez edildi. Örnekler ayrıştırıcı olan % 12 akrilamid jele ulaşınca voltaj arttırılarak 100 V, 2 saat daha elektrofrez gerçekleştirildi.

Western Blot

1. Elektroforez sonrası jeller cam içersinden çıkartıldı. % 3 jel kesilip atıldıktan sonra proteinlerin bulunduğu % 12'lik jel transfer tamponu içerisine alındı.
2. 1 adet nitroselüloz membran (BioRad) ve 5 adet Whatman kağıdı 6 cm eninde ve 9 cm boyunda olacak şekilde kesilerek transfer tamponu içerisine alındı.
3. *Semi-dry* blotlama cihazının (BioRad) üst ve alt plakaları transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra alt plaka üzerine 2 adet Whatman kağıdı koyuldu. Kağıtların üzerine membran, jel ve tekrar 3 adet Whatman kağıdı yerleştirilerek sandviç hazırlandı. Bu işlemler sırasında cam pipet ile hava kabarcığı oluşması engellendi. Blotlama aparatının üst plakası kapatılarak 1 saat boyunca 15 V, 0.7 mA'de protein örneklerinin jelden membrana transferi gerçekleştirildi.
4. Transfer tamamlandıktan sonra membran Ponceau S (Sigma) solüsyonu ile boyanarak transfer kontrol edildi.
5. Membran bloklama solüsyonu içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bırakılarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Sürenin sonunda membran anti-SMN primer antikoru ile 16 saat +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ertesi gün membran yıkama tamponu ile 3 kez 10'ar dakika yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Yıkamaların ardından membran, *horseradish* peroksidaz (HRP) işaretli sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda membran 4 kez 10'ar dakika yıkanarak bağlanmayan sekonder antikorlar uzaklaştırıldı.
6. ECL kemilüminesans kit solüsyonları olan A ve B, 40:1 oranında karıştırılarak görüntüleme karışımı hazırlandı. Membran görüntüleme karışımı ile karanlık ortamda 4 dk inkübe edildi. Membran kaset içine alınarak üzerine film (KODAK) kapatıldı ve film 5-30 dakika kaset içinde bırakıldı. Film develop (KODAK

Developer ve Fikser) edilerek proteinlere ait bantlar film üzerinde otoradyografik olarak görüntülendi.

Smn protein bandının değerlendirilmesi için internal kontrol olarak aktin proteini kullanıldı. Bahsedilen tüm deneysel aşamalar bloklama işleminden itibaren tekrarlandı. Farklı olarak, aktin proteininin görüntülenmesi için membran anti-aktin primer ve sekonder antikolar ile muamele edildi.

Smn Protein Miktarının Analizi

Protein bantlarının kantitasyonu *Image J* analiz programıyla gerçekleştirildi. SMN ve aktin bantlarının görüntülediği filmler bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra *Image J* programı kullanılarak her bandın yoğunluğu hesaplandı. Smn protein miktarının aktin protein miktarına oranı belirlendi ve kurkumin uygulanmayan kontrol örneklere göre analiz edildi.

3.5.F. Bilgisayar Destekli 3 Boyutlu Moleküler Modelleme Çalışmaları

SMN proteininin Tudor domainine ait yüksek çözünürlüklü kristal yapı Protein Data Bankasından (www.rcsb.org, PDB ID: 1MHN) elde edildi. Kurkumin ve valproatın Tudor domainine bağlanma gücü AutoDock 4.2. modelleme programı kullanılarak bilgisayar tabanlı olarak incelendi ve bağlanma afiniteleri hesaplandı. Modelleme çalışmaları Kadir Has Üniversitesi işbirliği ile gerçekleştirildi.

3.5.G. İstatistiksel Analizler

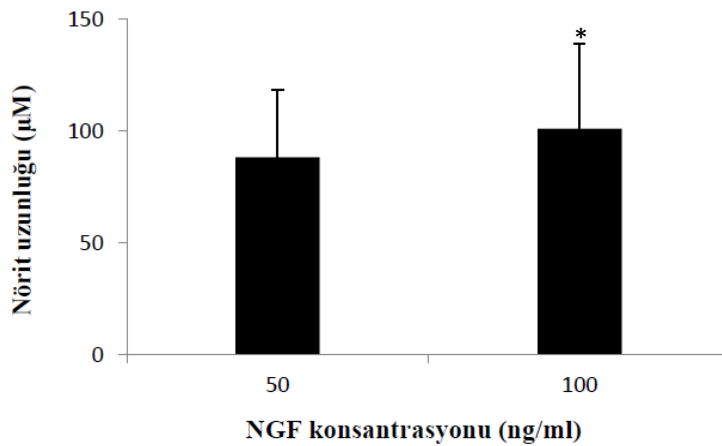
Bileşik uygulanan ve uygulamayan grupların nörit boyları, *Gem* sayıları ve protein miktarları arasındaki farklar, 3, 5 ve 7. günlerde Student t-testi kullanılarak değerlendirildi. P değeri 0.05 ve altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) Konsantrasyonunun Belirlenmesi

PC12 hücreleri kültür ortamına NGF eklenerek farklılaştırılırlar. NGF konsantrasyonunun farklılaşmayı etkileyen en önemli etmen olması nedeniyle öncelikle tez çalışmasındaki tüm deneysel aşamalarda kullanılması gereken konsantrasyon belirlenmiştir. PC12 hücreleri literatürde sık kullanılan 50 ng/ml ve 100 ng/ml konsantrasyonda NGF ile farklılaştırılmış, her iki konsantrasyonda da hücrelerin farklılaşma yüzdeleri belirlenmiş, nörit uzunlukları analiz edilebilen erken dönem olan 3. günde ölçülmüş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Ortalama 1000 hücrede yapılan nörit boyu analizlerine göre 50 ng/ml NGF uygulanan hücrelerin nörit boylarının 88 μ m, 100 ng/ml uygulanan hücrelerin nörit boylarının ise 101 μ m olduğu saptanmıştır. NGF uygulanan kültürlerde, her iki konsantrasyonda % 98-99 oranında farklılaşma gözlenmiştir (Şekil 4.1.1.).

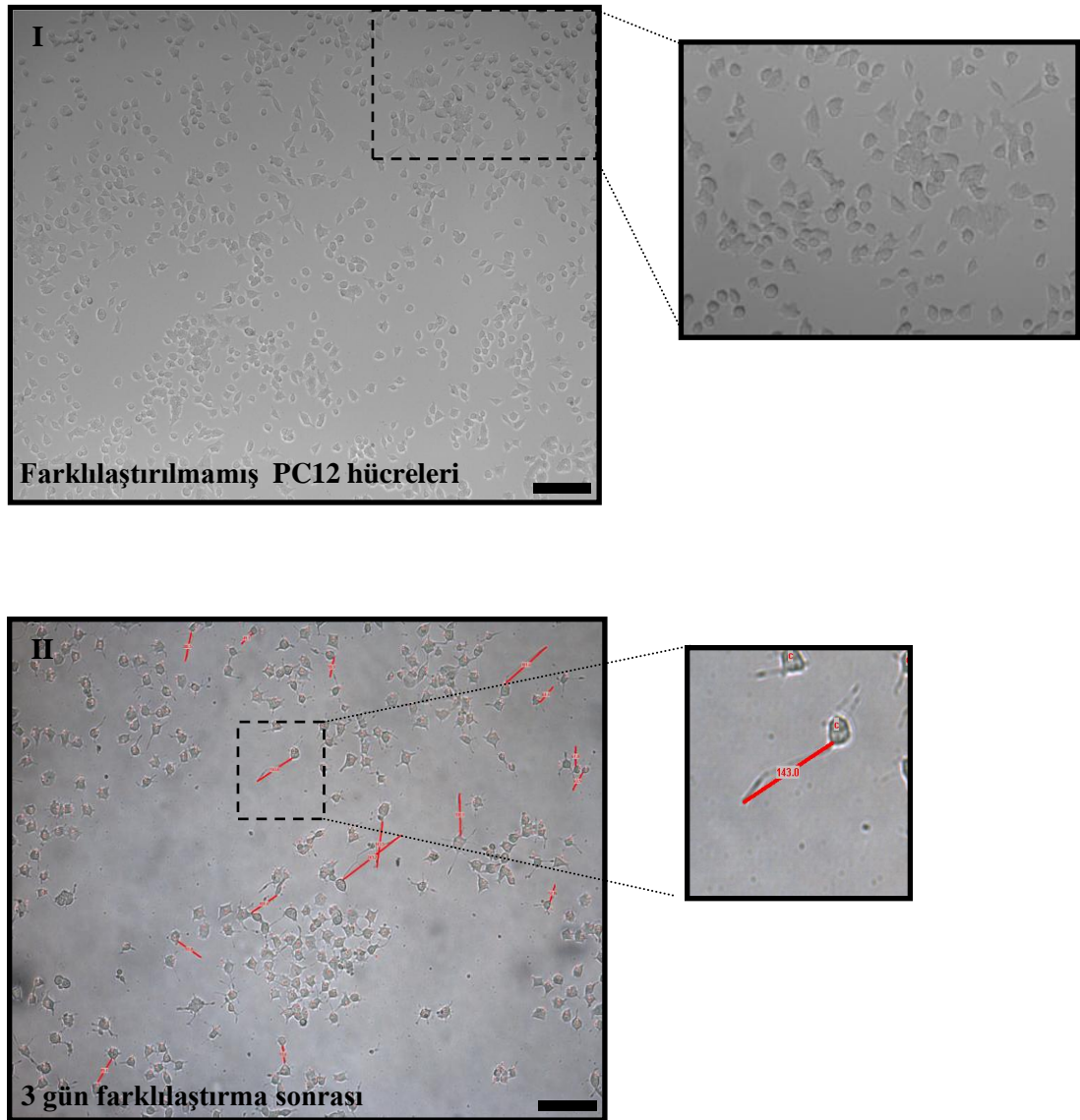


Şekil 4.1.1. 50 ng/ml ve 100 ng/ml NGF uygulanarak 3 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analizleri (ortanca \pm S.D.,* p< 0.05).

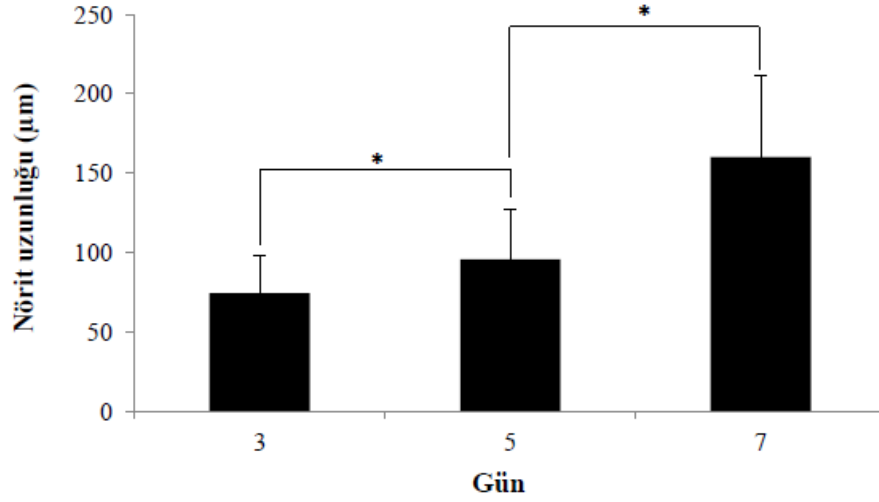
Elde edilen bulgular doğrultusunda 100 ng/ml NGF'nin nörit boyu üzerine etkisinin 50 ng/ml konsantrasyondaki etkisine oranla daha fazla olduğu görülmüş ve bundan sonraki çalışmalarda 100 ng/ml NGF kullanılmıştır.

4.2. Farklılaşma Sürecindeki PC12 Hücrelerinin Nörit Uzunluklarının Belirlenmesi

100 ng/ml NGF uygulanan PC12 hücrelerinin bazal nörit boyları ve farklılaşma yüzdeleri 3, 5 ve farklılaşmanın tamamlandığı 7. günde analiz edilmiştir. Nörit boyu ölçümlerini gösteren örnek fotoğraflar Şekil 4.2.1'de gösterilmiştir.



Ortalama 800 PC12 hücresi ile yapılan analizler sonucunda nörit uzunlukları 3. günde 74 μm , 5. günde 96 μm , 7.günde ise 160 μm olarak ölçülmüştür. 3. günde farklılaşma yüzdesinin % 99, 5 ve 7. günlerde ise % 100 olduğu görülmüştür (Şekil 4.2.1.).



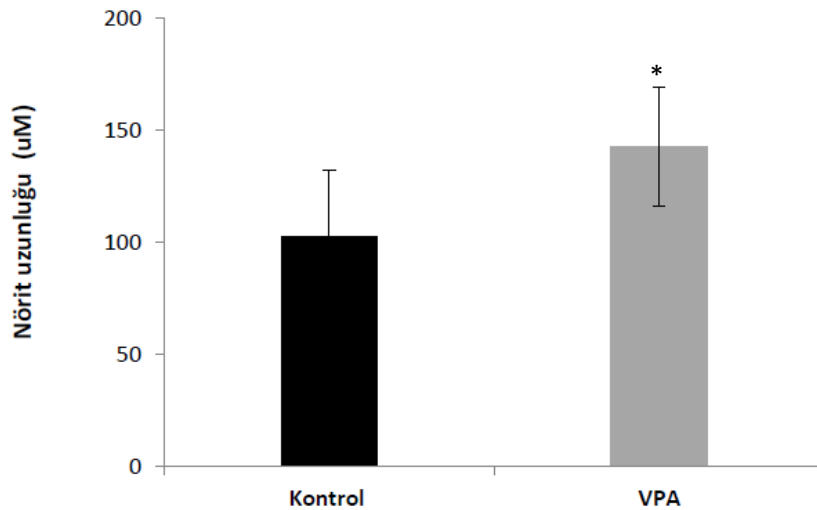
Şekil 4.2.2. NGF ile 3, 5 ve 7 gün farklılaştırılmış PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları (ortanca \pm S.D., * $p < 0.001$).

PC12 hücrelerinin nörit uzunluklarının farklılaşma sürelerine paralel olarak artışı istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur.

4.3. PC12 Hücrelerinde Nörit Uzamasının Kontrolü

Nörit uzamasının indüklenebilirliğini kontrol etmek amacıyla PC12 hücrelerinde nörit boyunu uzattığı bildirilen valproat adlı histon deasetilaz inhibitörü 2 mM konsantrasyonda ve 3 gün süreyle uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin nörit boyları ve farklılaşma yüzdeleri analiz edilerek valproat uygulanmayan kontrol hücreler ile karşılaştırılmıştır.

PC12 hücrelerine uygulanan 2 mM VPA'nın nörit uzunluğunu 102 μm 'den 143 μm 'ye arttırdığı saptanmıştır. VPA uygulanan hücrelerdeki farklılaşma oranı % 99 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.1.).



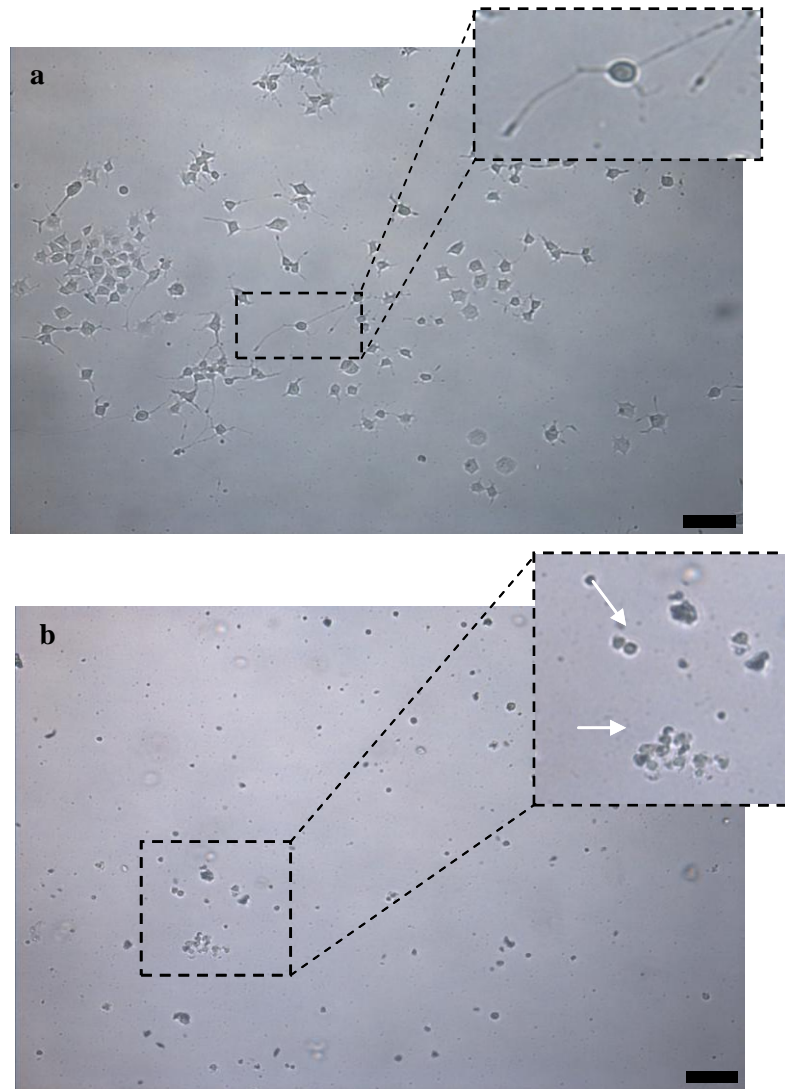
Şekil 4.3.1. 2 mM VPA ile 3 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları (ortanca \pm S.D., * $p < 0.001$)

Ortalama 800 PC12 hücresinin analiz edilmesiyle, VPA'nın nörit boyunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde uzatılabildiği saptanmış, böylece deney sisteminin çalıştığı gösterilmiştir.

4.4. PC12 Hücrelerine Kurkumin Uygulaması

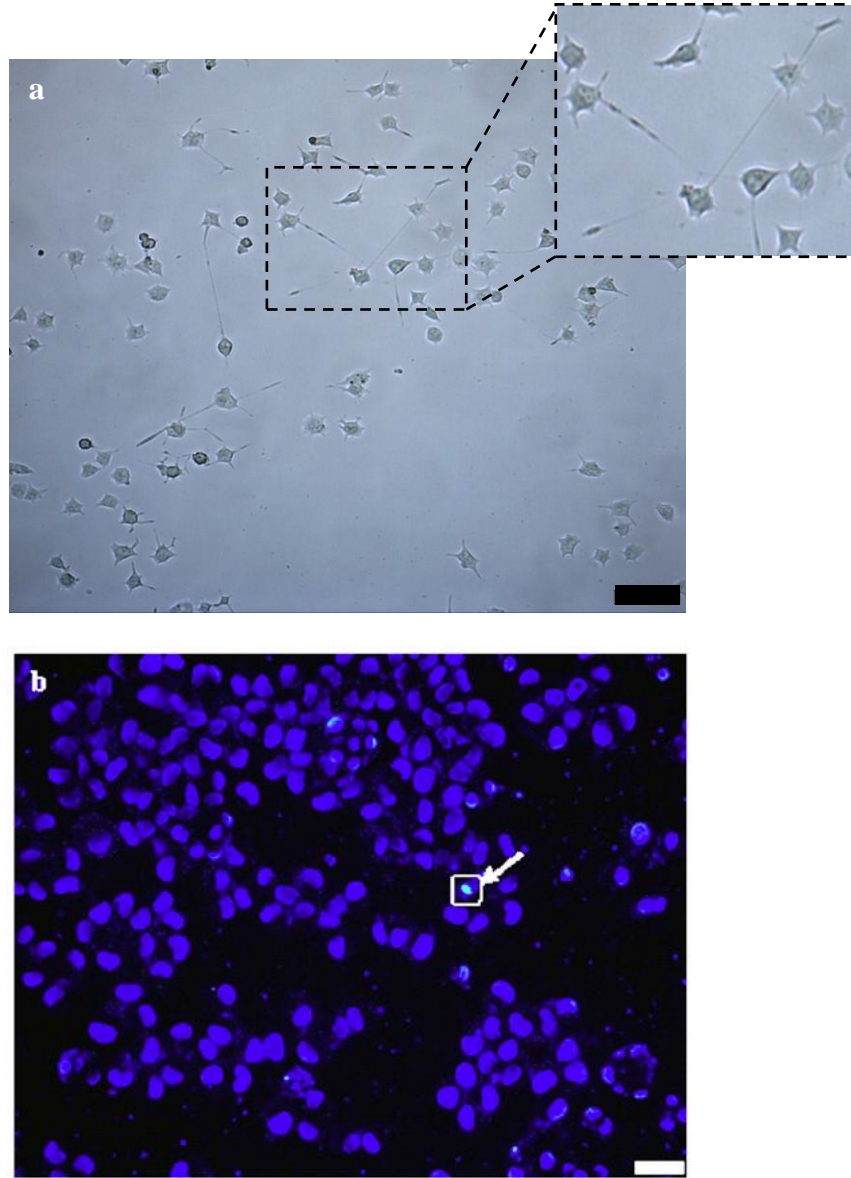
4.4.A. Kurkumin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kurkumin uygulamalarına SMA'lı hasta fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini arttırdığı bilinen 20 μ M konsantrasyon ile başlanmıştır. 3 günlük inkübasyon süresi sonunda uygulama yapılmayan kontrol hücreler sağlıklı bir şekilde farklılaşırken 20 μ M kurkumin uygulanmış PC12 hücrelerinde canlılığın devam etmediği gözlenmiştir (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1. (a) Kurkumin uygulanmayan ve (b) 20 μ M kurkumin uygulanan PC12 hücrelerinin 3 günlük farklılaşma sonrası morfolojik görüntüleri (ok kurkumin uygulanan ölü hücreleri işaret etmektedir). Ölçek: 100 μ m.

Canlılığı etkilemeden farklılaşmanın devam ettiği konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla PC12 hücrelerine 10 μM , 5 μM , 2.5 μM ve 500 nM konsantrasyonlarda kurkumin 3 gün süreyle uygulanmıştır. DAPI ile hücre çekirdekleri boyandığında hücrelerin % 98 oranında canlı olması ve nörit uzamasının devam etmesi nedenleriyle nörit boyu ölçümleri için 500 nM kurkuminin uygun olduğu sonucuna varılmış ve PC12 hücrelerine 3, 5 ve 7 gün süreyle uygulanarak nörit uzunlukları analiz edilmiştir.



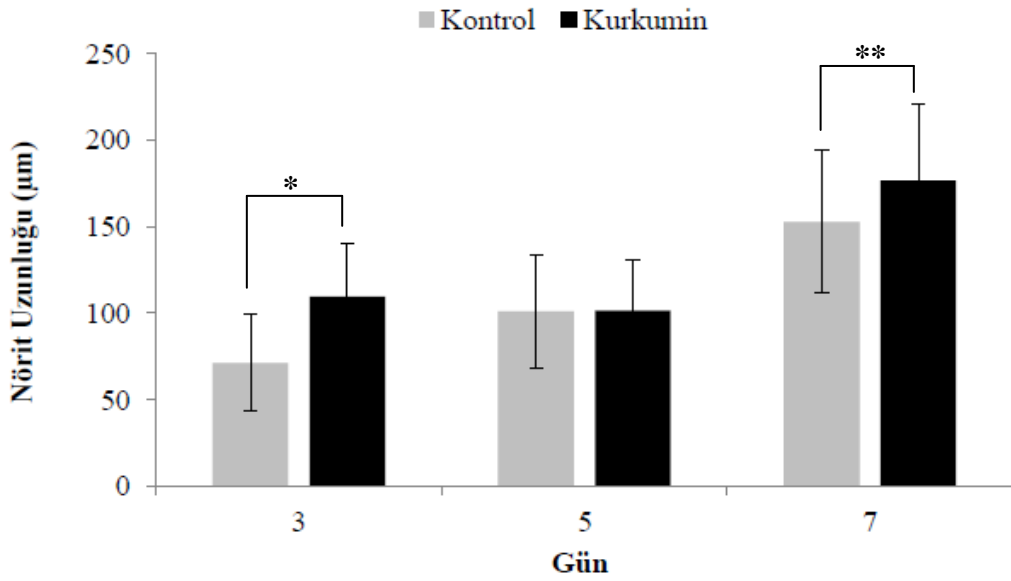
Şekil 4.4.2. 500 nM kurkumin uygulaması sonrası (a) farklılaşan PC12 hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (b) DAPI çekirdek boyaması ile canlılık analizine ait örnek gösterim (ok ölü hücreyi işaret etmektedir). Ölçek: 100 μm .

4.4.B. Kurkumin Uygulaması ve Nörit Boyu Analizleri

PC12 hücrelerine 3, 5 ve 7 gün süreyle 500 nM kurkumin uygulaması sonrası ortalama 950 hücre ile yapılan analiz sonuçları Tablo 4.4.1 ve Şekil 4.4.3'de gösterilmiştir. Kurkumin uygulamaları sonrası hücre canlılık oranı % 99, farklılaşma oranları 3. günde % 97, 5 ve 7. günlerde ise % 100 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.4.1. 3, 5 ve 7 gün süreyle kurkumin uygulanmış PC12 hücrelerinin nörit boy uzunlukları.

Gün	Nörit Uzunluğu (µm)	
	Kurkumin (-)	Kurkumin (+)
3	71	109
5	101	101
7	153	176



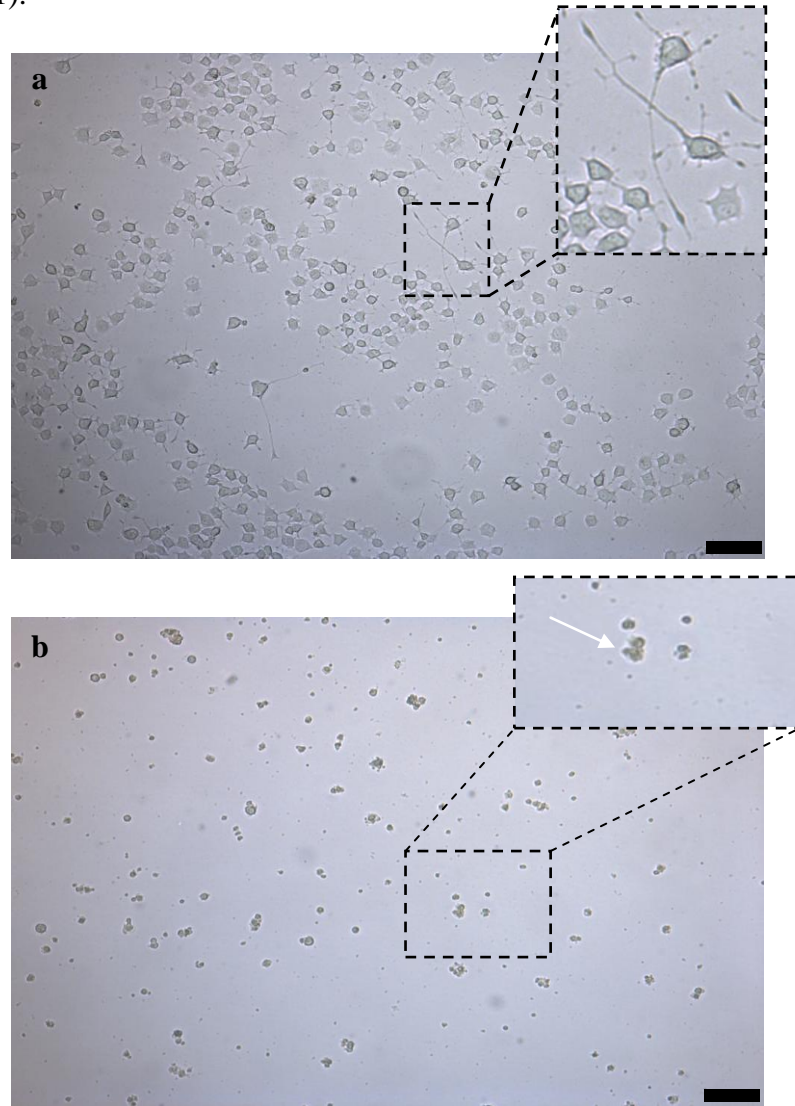
Şekil 4.4.3. 500 nM konsantrasyonda kurkumin uygulanarak 3, 5 ve 7 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları (ortanca ± S.D., * p<0.001,** p<0.05)

Yapılan analizlerde 3 ve 7 günlük kurkuminin inkübasyonlarının nörit boyunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde uzattığı gösterilmiştir.

4.5. PC12 Hücrelerine Resveratrol Uygulaması

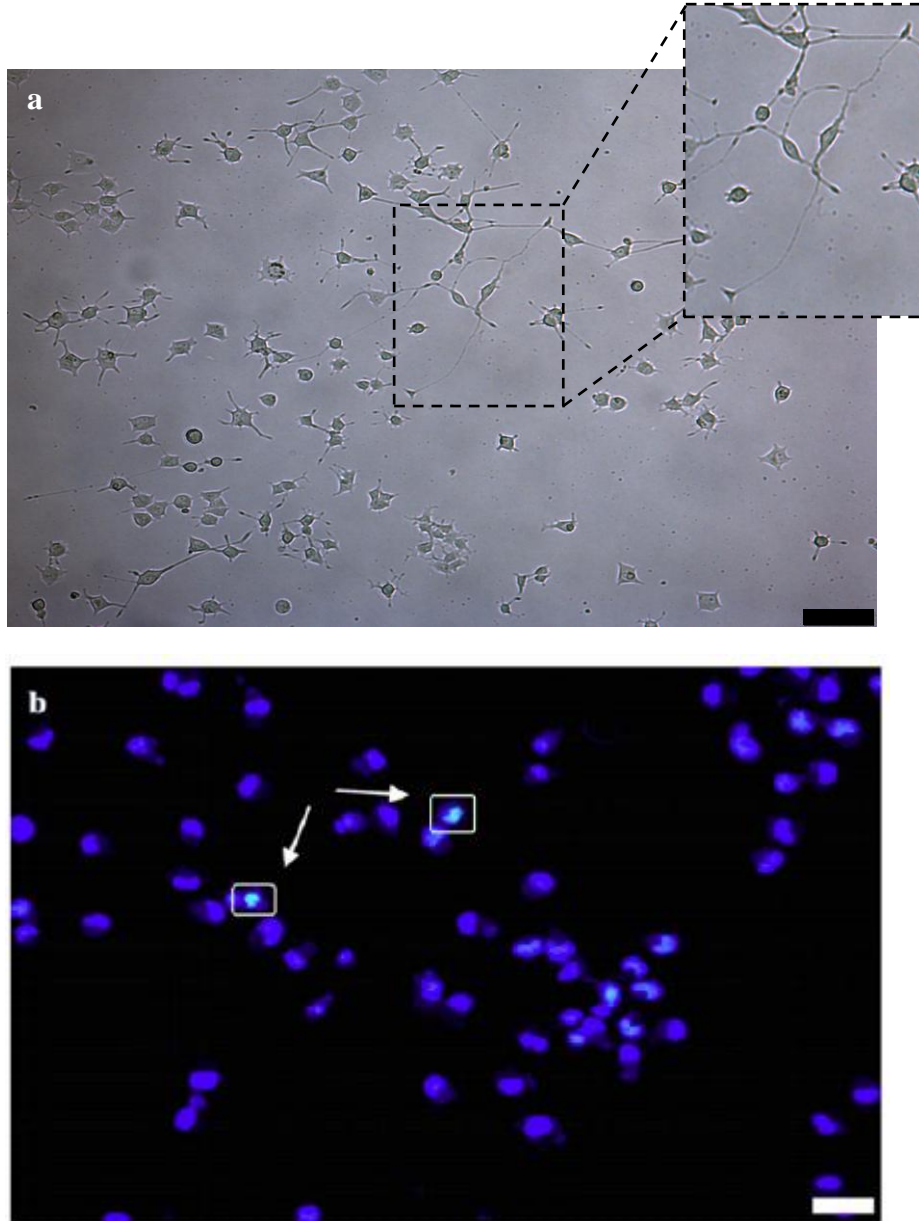
4.5.A. Resveratrol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmalara SMA'lı hasta fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini arttırdığı bilinen 100 μ M resveratrol ile başlanmıştır. 3 günlük inkübasyon süresi sonunda uygulama yapılmayan hücreler sağlıklı bir şekilde farklılaşırken 100 μ M resveratrol uygulanan PC12 hücrelerinde canlılığın devam etmediği gözlenmiştir (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.1. (a) Resveratrol uygulanmayan ve (b) 100 μ M resveratrol uygulanan PC12 hücrelerinin 3 günlük farklılaşma sonrası morfolojik görüntüleri. (ok resveratrol uygulanan ölü hücreleri işaret etmektedir) Ölçek: 100 μ m

Canlılığı etkilemeden farklılaşmanın devam ettiği konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla PC12 hücrelerine 50 μM , 20 μM , 10 μM ve 5 μM resveratrol 3 gün süreyle uygulanmıştır. DAPI ile boyandığında hücrelerin % 99 oranında canlı olması ve nörit uzamasının devam etmesi nedenleriyle nörit boyu analizleri için 5 μM resveratrolün uygun olduğu sonucuna varılarak PC12 hücrelerine 3, 5 ve 7 gün süreyle uygulanmış ve nörit uzunlukları analiz edilmiştir (Şekil 4.5.2).



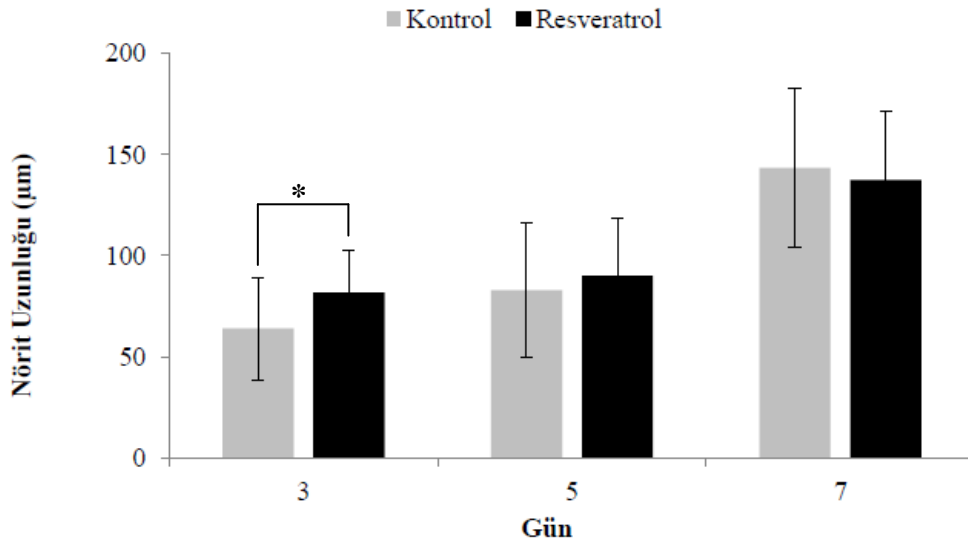
Şekil 4.5.2. 5 μM resveratrol uygulaması sonrası (a) farklılaşan PC12 hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (b) DAPI çekirdek boyaması ile canlılık analizine ait örnek gösterim (ok ölü hücreyi işaret etmektedir). Ölçek: 100 μm .

4.5.B. Resveratrol Uygulaması ve Nörit Boyu Analizleri

PC12 hücrelerine 3, 5 ve 7 gün süreyle 5 μ M resveratrol uygulaması sonrası ortalama 1000 hücre ile yapılan analiz sonuçları Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.3'de gösterilmiştir. Resveratrol uygulamaları sonrası hücre canlılık oranı % 99, farklılaşma oranı 3. günde % 99, 5 ve 7. günlerde ise % 100 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.5.1. 3, 5 ve 7 gün süreyle resveratrol uygulanmış PC12 hücrelerinin nörit boy uzunlukları

Gün	Nörit Uzunluğu (μ m)	
	Resveratrol (-)	Resveratrol (+)
3	64	82
5	83	90
7	143	137



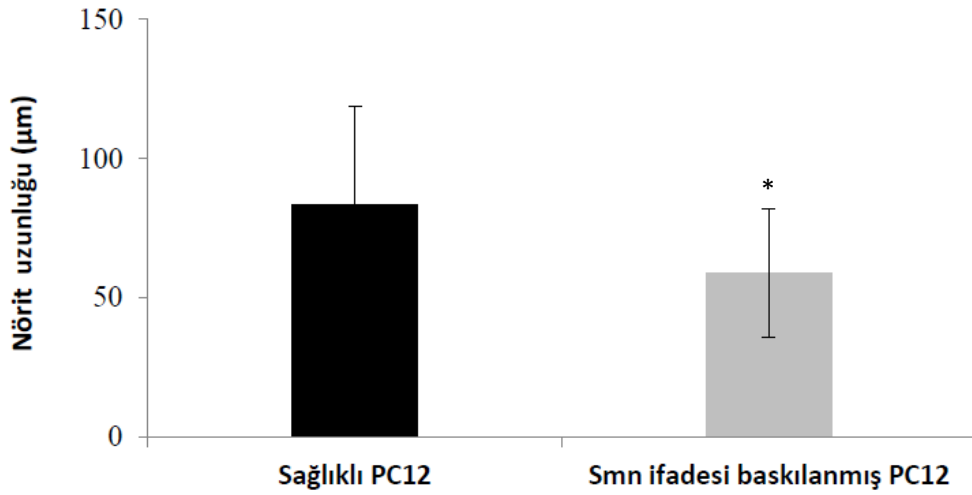
Şekil 4.5.3. 5 μ M resveratrol uygulanarak 3, 5 ve 7 gün farklılaştırılan PC12 hücrelerinin nörit boyu analiz sonuçları (ortanca \pm S.D., * $p = 0.05$)

5 ve 7 günlük inkübasyonlarda nörit boy uzunluğunda kontrole göre bir artış gözlenmezken, 3 günlük inkübasyonun sonunda yapılan analizlerde resveratrolün nörit boyunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde uzattığı saptanmıştır.

4.6. Smn İfadesi Baskılanmış PC12 hücrelerinde Nörit Boyu Analizi

Nörit uzamasının Smn proteini ile ilişkisini araştırmak üzere Smn ifadesi kalıcı olarak baskılanmış PC12 hücre hattı kullanılmıştır.

Smn ifadesi baskılanmış olan hücreler 100 ng/ml NGF ile 3 gün farklılaştırılarak nörit boyları analiz edilmiş ve sağlıklı hücrelerde 83 μm olan nörit boyu, Smn ifadesi baskılandığında 24 μm kısalarak 59 μm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6.1. Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hattının sağlıklı PC12 hücreleriyle karşılaştırmalı nörit boyu analizi (ortanca \pm S.D., * $p < 0.001$).

Yapılan istatistiksel analizlerde, Smn ifadesi baskılanan hücrelerin nörit boyunun sağlıklı hücrelere göre kısa olduğu gösterilmiştir.

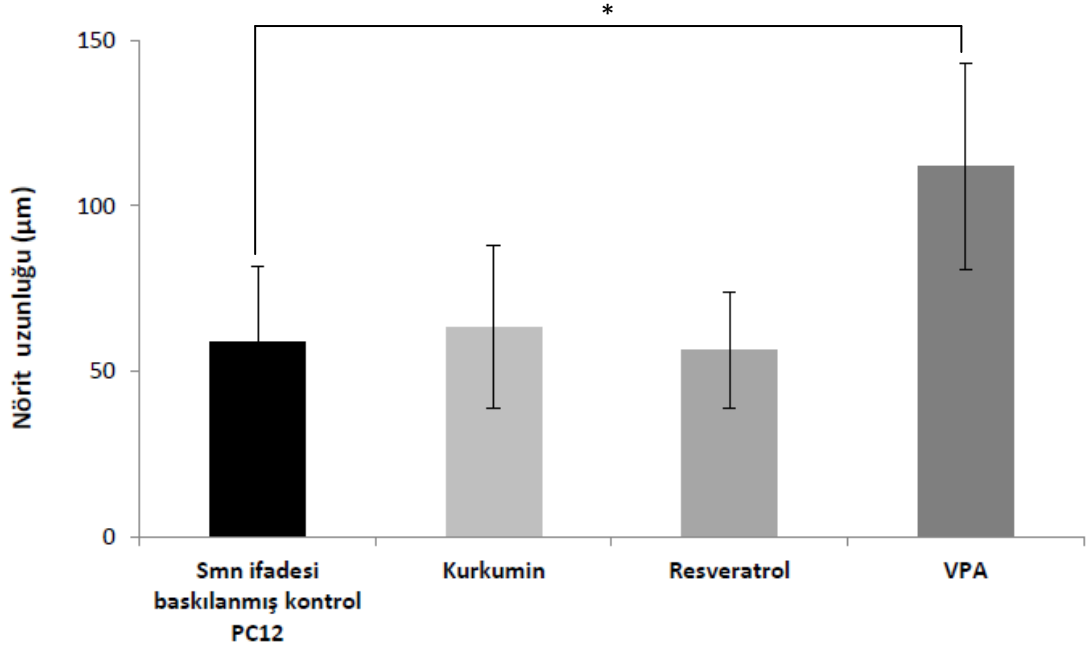
4.7. Smn İfadesi Baskılanmış PC12 Hücrelerine Resveratrol ve Kurkumin Uygulamaları

Resveratrol ve kurkuminin nörit boyunu indükleyici etkileri Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hattında araştırılmıştır. Smn ifadesi baskılanmış hücrelerde kısalan nörit boyunun tekrar uzatılabildiğini göstermek amacıyla hücrelere 3 gün süreyle 2 mM valproat uygulanmıştır. Ortalama 900 hücrenin analizi sonucunda Smn ifadesinin baskılanmasıyla kısalan nörit boyunun valproat uygulamasıyla 59 μm 'den 112 μm uzunluğa eriştiği gösterilmiştir (Tablo 4.7.1, Şekil 4.7.1).

Kontrol amaçlı VPA uygulamasının ardından hücrelere optimum konsantrasyon olarak saptanan 500 nM kurkumin ve 5 μM resveratrol uygulanmış, hücrelerin nörit boyları uzamanın en fazla indüklendiği 3 günlük farklılaştırma sonrası analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.7.1. ve Şekil 4.7.1.'de gösterilmiştir

Tablo 4.7.1. Kurkumin ve resveratrol uygulanan Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinin kontrol ve VPA uygulanan hücrelerle karşılaştırmalı nörit boyu uzunlukları.

Bileşik	Nörit Uzunluğu (μm)
Kontrol	59
Kurkumin	63
Resveratrol	56
VPA	112



Şekil 4.7.1. 5 µM resveratrol ve 500 nM kurkumin uygulanarak 3 gün farklılaştırılan Snn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinin, uygulama yapılmayan ve VPA uygulaması yapılan PC12 hücreleriyle karşılaştırmalı nörit boyu analiz sonuçları (ortanca ±SD, * p<0.001).

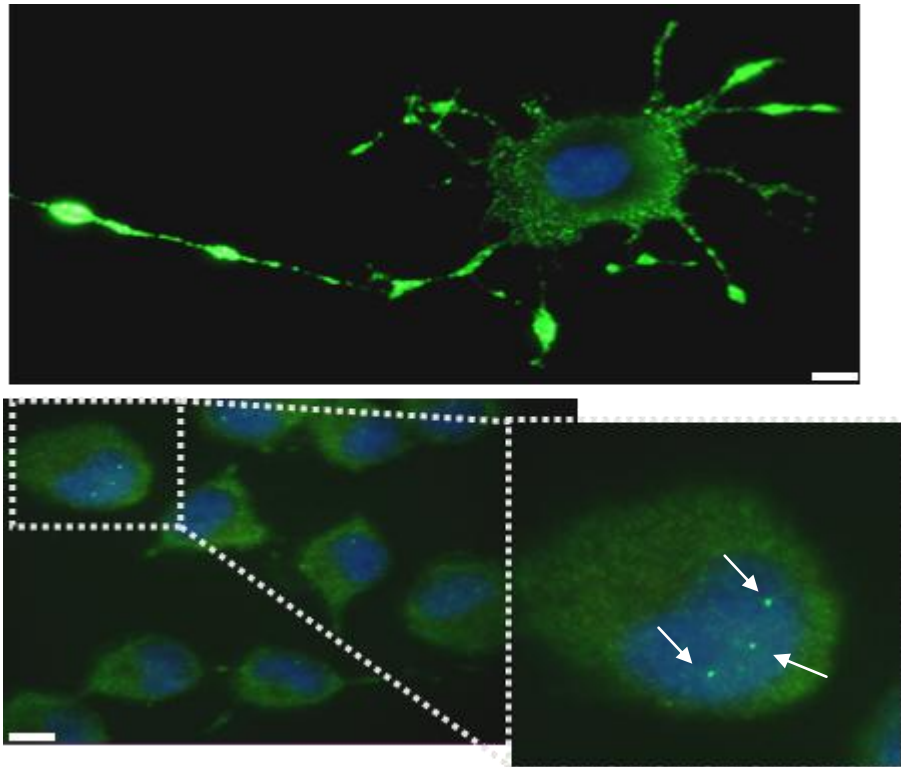
Ortalama 1000 hücre yapılan analizler ile, sağlıklı PC12 hücrelerinde nörit boyunu indükleyen resveratrol ve kurkuminin, Snn ifadesi baskılandığında kısalan nörit boyunu uzatmadıkları gösterilmiştir.

4.8. Nörit Uzamasının Smn Protein İfade Düzeyi ile İlişkisi

PC12 hücrelerinde resveratrol ve kurkumin ile indüklenen nörit uzamasının Smn protein ifade düzeyi ile ilişkisi araştırılmıştır.

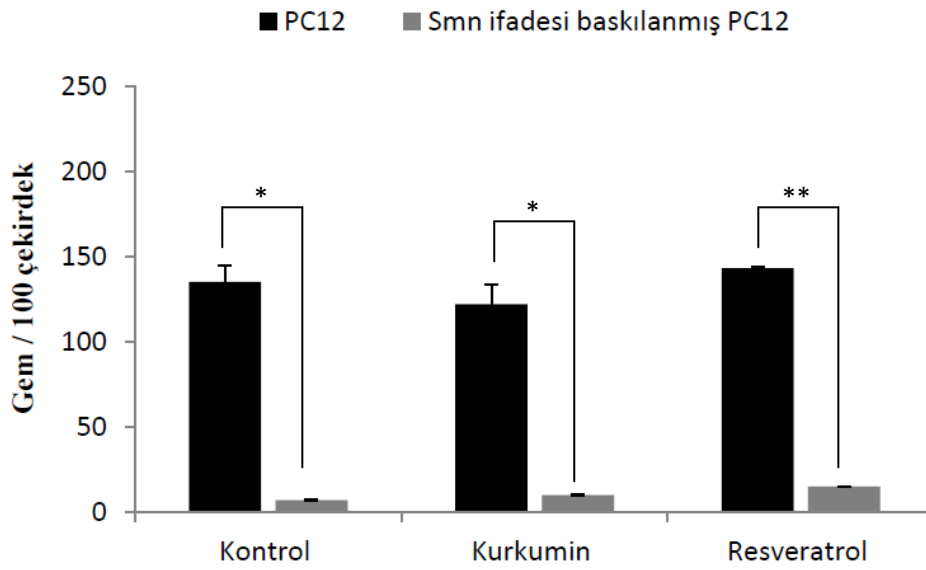
4.8.1. Bileşiklerin Çekirdekteki Smn Protein Miktarı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Hücre çekirdeğinde Smn proteininin yerleştiği *Gem* adlı küresel yapıların sayısı çekirdekteki Smn protein miktarını yansıtmaktadır. *Gem* sayısı analizleri için PC12 hücreleri 500 nM kurkumin ve 5 μ M resveratrol ile 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda Smn ve DAPI boyamaları gerçekleştirilmiş ve *Gem* sayısında uygulama yapılmayan hücelere göre bir değişiklik belirlenmemiştir. PC12 hücrelerinde Smn boyaması ile gösterilen *Gem* yapılarının örnek fotoğrafları Şekil 4.8.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8.1. (a) PC12 hücrelerinde Smn boyaması ile *Gem* sayısı analizini gösteren örnek fotoğraflar (ok *Gem*'leri işaret etmektedir), Ölçek: 10 μ m

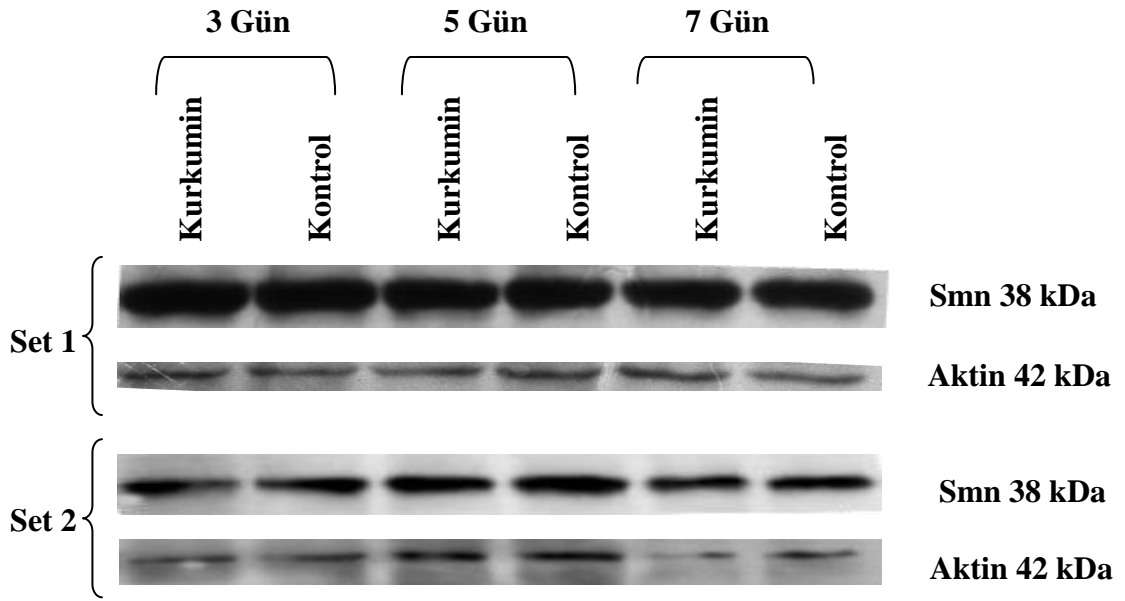
500 nM kurkumin ve 5 μ M resveratrol uygulanan sağlıklı ve Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinin *Gem* sayısı analiz sonuçları Şekil 4.8.2’de gösterilmiştir. Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinde sağlıklı hücelere oranla azalan *Gem* sayılarının bileşik uygulamaları ile değişmediği saptamıştır (Şekil 4.8.2.).



Şekil 4.8.2. 3 gün süreyle 500 nM kurkumin ve 5 μ M resveratrol uygulanan sağlıklı ve Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinde *Gem* sayısı analizi sonuçları (ortalama \pm S.H. * p <0.05 ** p <0.001)

4.8.2. Kurkuminin Total Smn Protein Miktarı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Smn proteininin hücrenin farklı kompartmanlarında bulunması nedeniyle kurkumin uygulanan hücrelerdeki total Smn proteini analiz edilmiştir. Kurkuminin nörit uzunluğunu resveratrol'den daha fazla artırması nedeniyle, Smn protein miktarındaki değişiklik kurkumin uygulanarak incelenmiştir. Bu nedenle PC12 hücrelerine 500 nM kurkumin uygulanmış ve hücreler 3, 5 ve 7 gün boyunca farklılaştırılmıştır. İnkübasyon süreleri sonrasında gerçekleştirilen Western blot çalışmalarıyla kurkumin uygulanan örneklerdeki Smn protein miktarları uygulanmayan kontrol örnekler ile karşılaştırılmış ve kurkuminin hücrelerdeki toplam Smn protein miktarını değiştirmedeği görülmüştür (Şekil 4.8.3).

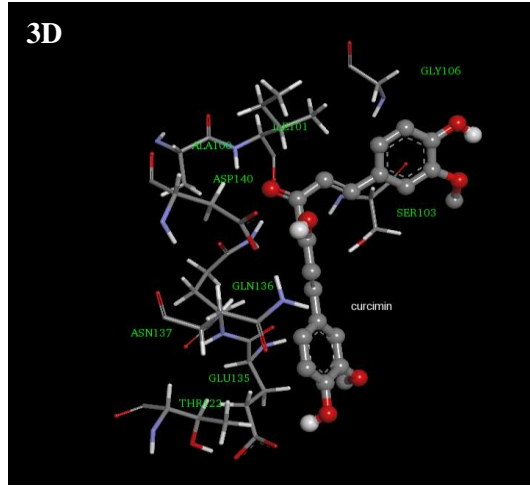


Şekil 4.8.3. 3, 5 ve 7 gün 500 nM kurkumin uygulanan ve uygulanmayan kontrol PC12 hücreleri ile gerçekleştirilen Western blot sonuçları.

4.9. Kurkumin-Smn Moleküler Modelleme Çalışmaları

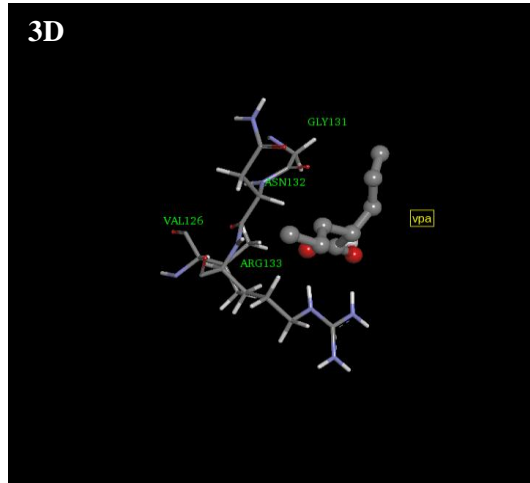
Kurkuminin Smn proteininin tudor domaini ile bağlantı potansiyeli bilgisayar destekli 3 boyutlu moleküler modelleme çalışmasıyla araştırılmış ve Smn-valproat bağlantısıyla karşılaştırılmıştır. Modelleme çalışmalarında Smn-kurkuminin bağlanma afinitesi 239.79 μM , Smn-valproat bağlanma afinitesi ise 16.97 mM olarak hesaplanmış, kurkuminin bağlanma potansiyeli valproata göre yüksek bulunmuştur. Kurkumin ve valproatın Smn proteini tudor domaini ile bağlantıları Şekil 4.9.1’de gösterilmiştir.

a



2D

b



2D

Şekil 4.9.1. Smn proteini tudor domaini ile; (a) kurkumin ve (b) valproat arasındaki bağlantıyı gösteren 3 boyutlu (3D) ve 2 boyutlu (2D) modellemeler

5.TARTIŞMA

Sinir sistemindeki nöronların fonksiyon görebilmesi için akzon ve dendrit morfolojilerinin doğru şekillenmesi gerekmektedir. Akzon ve dendrit yapıları aktin-mikrotübül iskeletleri ile oluşmakta olup bu iskelet elemanlarında meydana gelen yapısal ve fonksiyonel bozukluklar birçok nörodejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmektedir. İlerleyici nöron kaybı ile karakterize olan ALS, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda hücre iskelet elemanlarının hatalı katlanması ve birikimi sonucu fonksiyon bozukluklarının ortaya çıktığı bilinmektedir (109). Nörodejeneratif hastalıklardan olan SMA'da son yıllarda yapılan çalışmalarda SMN proteininin hücre iskelet elemanlarıyla ilişkisi olduğu ve eksikliğinde hücre iskeletinin bozulduğu dikkat çekmiş, PC12 hücrelerinde Smn ifadesi baskılandığında nörit boyunun kısaldığı bildirilmiştir (10). Benzer şekilde, Rossol ve diğ. (11) SMA'lı fare motor nöron kültürlerinde akzon boyunun normale göre kısa olduğunu rapor etmiştir. SMA *zebrafish* modelinde de gösterilen bu bulgu, SMA'lı hastaların IPS-kaynaklı motor nöron hücrelerinde yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (12, 72).

In vitro ve *in vivo* modeller kullanılarak elde edilen bu bulgular doğrultusunda planlanan tez çalışmasında, SMA'da görülen nörit kısalığının polifenoller aracılığı ile düzeltilerek sağlıklı hücrelerdeki boyutuna döndürülmesi amaçlanmıştır. Araştırmalar için ihtiyaç duyulan ideal hücre tipinin insan motor nöron hücresi olmasına karşın bu hücrelere ulaşmak mümkün olamamıştır. Motor nöron hücrelerine ulaşamayan diğer araştırmacılar bu sorunu SMA'lı fare modellerini ve nöron benzeri hücre hatlarını kullanarak aşabilmişlerdir (35). SMA'lı farelerden kurulan primer motor nöron kültürleri ile yapılan çalışmalarda hastalık patofizyolojisi hakkında bilgi edinilmekle birlikte hücrelerin farklılaşmış olmaları çoğalmalarında güçlük yaratmış ve araştırmalar için nöron benzeri hücre hatları tercih edilmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında da nöron benzeri bir hücre hattı olan PC12 hücreleri kullanılmıştır. Nörit uzamasıyla ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılan PC12, sıçan adrenal medulla nöroendokrin tümör (*pheochromocytoma*) hücrelerinden kurulmuş nöron benzeri bir hücre hattıdır (110). NGF uygulamasıyla

nörit uzantıları oluşturan bu hücreler 7 gün sonunda homojen bir şekilde sempatik nöronlara farklılaşmaktadır (111). Bu hücrelerin farklılaşması tirozin kinaz reseptör (TrkA) fosforilasyonu, ardından fosfolipaz C ve ras sinyal yollarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Plazma membranının özelliklerinin de değişmesiyle nörit uzantıları oluşmaktadır (110). Tez kapsamında kullanılan PC12 ve Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücre hatları Ottawa Üniversitesi Nöromusküler Hastalıklar Merkezi tarafından laboratuvarımıza bağışlanmıştır.

HDAC inhibitörleri epigenetik düzenleme aracılığıyla yapısal hücre iskelet proteinlerinin fonksiyonlarını etkileyerek nörit uzamasını arttırmaktadır (112-114). Bu nedenle SMA'da görülen nörit uzama hatasının HDAC inhibitörleri ile düzeltilebileceği düşünülmüştür. HDAC inhibitörlerinden olan VPA, PC12 hücrelerine uygulandığında nörit uzunluğunun arttığı bilindiğinden, uzamanın indüklenebilirliği VPA uygulaması ile kontrol edilmiştir (115). PC12 hücrelerine 2 mM konsantrasyonda ve 3 gün süreyle uygulanan VPA'nın nörit boyunu 41 μm uzatabildiği saptanmıştır. Smn ifadesi baskılanan hücrelere aynı şartlarda uygulanan VPA'nın ise nörit boyunda 53 μm uzama sağlayarak nörit uzama hatasını düzeltebildiği gösterilmiştir. VPA'nın nörit uzamasına olan etkisinin hücrelerdeki Smn protein miktarına bağlı olarak değişmediği görülmüş, literatür ile uyumlu şekilde VPA'nın Smn-bağımsız bir mekanizma ile nöriti uzattığı bulgusu elde edilmiştir (115).

Tez çalışmasında, nöron hücrelerini hasara karşı korudukları bilinen resveratrol ve kurkumin adlı polifenolik HDAC inhibitörleri araştırılmıştır. PC12 hücrelerine 3 gün süreyle uygulanan 500 nM kurkuminin nörit uzunluğunu 38 μm arttırdığı saptanmış, 5. günde nörit uzunluğu açısından kontrole göre bir fark gözlenmezken, 7 günlük uygulama sonrasında nörit boyundaki uzama 23 μm olacak şekilde ölçülmüştür. 3 ve 7. günlerde nörit uzamasında saptanan bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, kurkuminin etkisinin farklılaşmanın erken evresi olan 3.günde fazla olduğu saptanmıştır. Kontrol hücrelerin 5. günde eriştikleri nörit boyu uzunluğuna 3 günlük kurkumin uygulamasıyla ulaşılabilmiş, bu nedenle kurkuminin NGF'nin etkisini hızlandırdığı düşünülmüştür. 2009 yılında Ray B. ve

diğ. (116) 2 hafta farklılaştırdıkları PC12 hücreleri üzerine kurkumin uygulayarak nörit boyunu uzattığını bildirmiştir. Farklılaşmanın ileri evresinde gösterilen bu etkiyi erken dönemde analiz edebilmek amacı ile yaptığımız çalışmalarda kurkumin ve NGF eşzamanlı olarak uygulanmış ve kurkuminin nörit boyunu uzatabildiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kurkuminin hem farklılaşmamış nöron öncülü hücrelerde hem de farklılaşmış hücrelerde nörit uzamasını hızlandırabileceğini işaret etmiştir.

Kurkuminin nörit uzamasına etkileri başka hücre hatlarında da gösterilmiş, fare nöroblastoma Neuro 2a hücrelerine kurkumin uygulaması ile nörit uzamasının indüklendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada kurkuminin NF- κ B aktivasyonunu engellediği ve proteozom aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Proteozom inhibisyonun nörit uzamasını arttırdığı bilindiğinden kurkumin ile indüklenen uzamanın hücrelerdeki ubikutinlenmiş protein birikiminden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (117, 118). Hung ve diğ. (120) kurkuminin amfipatik özelliğinden dolayı hücre membranına bağlanarak membranı incelttiğini ve elastikiyetini etkilediğini bildirmiştir. Nörit uzaması sırasında yeni membran oluşumu gerekmekte ve hücrenin yüzey alanı büyümektedir (119, 120). Bu nedenle tez çalışmasında saptanan nörit uzamasında kurkuminin membran özelliklerini etkilemesinin katkısının olabileceği düşünülmüştür. Ancak kurkumin gibi pleiotropik bileşiklerin etkilerinin hücre tipine, uygulanan süre ve konsantrasyona bağlı olarak değişebileceği bilinmektedir. Örneğin, farklılaştırılmış insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'ye 2 μ M kurkumin uygulandığında, nörit boyunu kısalttığı bildirilmiştir (121).

Nöron hücrelerini hasara karşı koruduğu bilinen diğer bir polifenolik HDAC inhibitörü resveratroidir. Çalışmalarımızda PC12 hücrelerine 3 gün süreyle uygulanan 5 μ M resveratrolün nörit boyunu 18 μ m arttırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Farklılaşmanın erken döneminde nörit uzamasını indüklemiş olan resveratrolün, 5 ve 7 günlük inkübasyonlarda ise nörit uzunluğunda kontrole göre değişiklik yaratmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, Dasgupta ve diğ. (122)'nin Washington üniversitesinde yaptıkları bir çalışmada,

resveratrolün Neuro 2a hücrelerinde AMP-kinaz aktivitesini arttırarak nörit uzamasını indüklediği rapor edilmiştir. Czaplicki ve diğ. (123) resveratrolle indüklenen nörit uzamasının büyüme bölgelerindeki mikrotübül dağılımının değişmesi sonucu görüldüğünü bildirmiştir. Ayrıca resveratrolün NAD-bağımlı histon deasetilazlardan SIRT1'i aktive ettiği ve SIRT1 ifadesi fazla olan fare modelinde nörit boyunun uzadığı bildirilmiştir (124). Kurkumin gibi resveratrolün de hücre membranı üzerindeki etkileri araştırılmış, Brittes ve diğ. (125) lipofilik bir molekül olan resveratrolün fosfolipitler arasına yerleşerek membran akışkanlığını arttırdığını bildirmiştir.

PC12 hücreleri kurkumin ile inkübe edildiğinde saptanan anlamlı nörit uzaması, Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücrelerinde ortadan kalkmıştır. Benzer şekilde, PC12 hücrelerinin nörit boyunu 3. günde anlamlı bir şekilde uzatan resveratrol, Smn ifadesi baskılanmış hücrelerin nörit boyunu uzatmamıştır. Kurkumin ve resveratrolün hücrede Smn ifadesi azaldığı durumda nörit uzaması üzerindeki etkilerini kaybettikleri saptanmıştır. Bu durum nöritogenez sırasında Smn proteinine ihtiyaç olduğunu kanıtlamaktadır. SMA'lı hasta fibroblast hücreleri ile yapmış olduğumuz önceki çalışmalarımızda, resveratrol ve kurkuminin SMN2 gen ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (7, 8). Sakla ve diğ. (126)' de yaptıkları çalışmalarda polifenollerin SMN2 gen ifadesini arttırdığını bildirmiştir. Bu nedenlerle polifenollerin etkisiyle artan Smn proteininin, hücre gövdesinden nörite doğru taşınması sayesinde nörit uzamasının indüklenebileceği hipotezi üzerine yoğunlaşmıştır. PC12 hücrelerinin çekirdeğindeki Smn proteinleri, yerleşim gösterdikleri *Gem* yapılarının sayısal analizi ile araştırılmış, kurkumin ve resveratrol uygulamaları sonrasında *Gem* sayısında artış saptanmamıştır. Kurkuminin nörit uzaması üzerindeki etkisinin resveratrolde fazla olması nedeniyle çalışmalara kurkumin ile devam edilerek PC12 hücrelerine 3, 5 ve 7 gün süreyle kurkumin uygulanmış ve hücredeki toplam Smn protein miktarını arttırmadığı saptanmıştır. Kurkumin uygulaması ile hücredeki toplam Smn ve çekirdekteki Smn proteinlerinin artmamış olması, bileşik ile indüklenen nörit uzamasının Smn protein miktar artışından ya da Smn'in nörite taşınmasından kaynaklanmadığını göstermiştir.

Araştırmalarımızda her iki bileşiğin de SMN protein sentezini indüklemeksizin nörit boyunu uzatabildikleri, ancak etki edebilmeleri için SMN proteinine ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. SMA'lı hasta bireylerde, SMN2 geni kopya sayısı ile orantılı olarak hücrelerdeki fonksiyonel protein miktarının arttığı bilinmektedir (32). SMN2 geninden sentezlenen protein miktarı tip I hastalarda en düşük, tip III ve IV SMA'lı bireylerde en yüksek düzeydedir. Bu nedenle, kurkumin ve resveratrolün tip III ve IV SMA hastalarında nörit uzamasını etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için tip III/ IV fare modellerinde ve hasta bireylerin IPS-kaynaklı motor nöron hücrelerinde çalışılması gerekmektedir.

Kurkuminin etki gösterebilmek için Smn proteinine ihtiyaç duymasına rağmen, protein miktarını arttırmadan nörit boyunu uzatması, Smn proteini ile kurkuminin fiziksel bağlantısı olabileceğini düşündürmüştür. Kurkuminin Smn proteinine bağlanarak, Smn ile ilişkili protein komplekslerinin kurulmasını kolaylaştırabileceği, böylece nörit uzamasını hızlandırabileceği hipotezi üzerinde durulmuştur. Bu hipotez *in silico* olarak test edildiğinde Smn-kurkumin bağlanma afinitesi 239.79 μ M olarak hesaplanmış ve Smn-valproat bağlantısına oranla daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Smn-kurkumin fiziksel bağlanma olasılığının yüksek bulunması üzerine, kurkuminin Smn'in içinde bulunduğu komplekslerin fonksiyonlarını etkileyebileceği düşünülmüştür. Araştırmamızda *in silico* olarak gösterilen fiziksel bağlanmanın *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Bileşiklere verilen cevapta hücreler arası farklılıklar bulunduğu bilinmektedir. Örneğin; HDAC inhibitörleriyle yapılan bir çalışmada, fibroblast hücrelerinde fenil bütirat ve valproatın SMN2 gen ifadesini arttırdığı ancak aynı hastaya ait lenfoblastoid hücrelerinde kontrole göre değişiklik olmadığı bildirilmiştir (127). Bu durum, aynı bireyin farklı hücrelerinde bile bileşiklere cevabın aynı olmadığını göstermektedir. Bu nedenle PC12 gibi farklı türden deneysel modellerin kullanımıyla elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalar için yol gösterici olmakla birlikte sonuçların insan hücrelerinde de desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca polifenollerin pleiotropik bileşikler olmaları nedeniyle etkileri uygulanan

konsantrasyon ve süreye bağımlı olup hücrelerin verdikleri cevap değişebilmektedir. Bu nedenle resveratrol ve kurkuminin etkilerinin SMA hasta fibroblast hücrelerinin yeniden programlanması (*reprogramming*) yoluyla elde edilen motor nöron hücrelerine uygulanmaları ile tedavi potansiyellerinin daha kapsamlı olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

Son yıllarda kurkuminin tubulin proteinlerine bağlandığını ve MAP2 geni ifadesini arttırmak suretiyle nörit hatalarını düzeltebildiğini açıklayan makaleler yayınlanmıştır (128, 129). Sıçanlarda, Map2 mRNA'sının nörit boyunca taşınmasına Marta1 adlı bir proteinin aracılık ettiği gösterilmiş ve bu proteinin insandaki homoloğu KSRP proteini olarak bildirilmiştir. KSRP proteini ise SMN proteinine bağlanmaktadır (130, 131). Bu nedenle, kurkumin ile indüklenebildiğini gösterdiğimiz nörit uzamasının Map2-aracılı bir mekanizma ile gerçekleşebileceği, Smn proteini eksikliğinde Map2 mRNA'sının nörit boyunca taşınmaması nedeniyle mikrotübül organizasyonunun bozulabileceği ve nörit uzama hatası yaratabileceği düşünülmüştür. Bu görüş, Map2 gen ifadesinin siRNA aracılığıyla susturulması sonrasında nörit uzamasının incelenmesi ile desteklenmelidir.

Bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler, kurkumin ve resveratrol adlı polifenollerin PC12 hücrelerinde Smn ifadesini arttırmaksızın nörit boyunu uzatabildiklerini ve etki edebilmeleri için Smn proteinin hücrelerde var olması gerekliliği göstermiştir. Kurkumin-Smn bağlanma potansiyelinin de yüksek bulunduğu göz önüne alındığında, kurkuminin Smn proteinine bağlanarak Smn'in dahil olduğu protein komplekslerinin kurulmasını kolaylaştıracağı, böylece nörit uzamasında rolü olan protein ve mRNA'ların nörit boyunca taşınmasının hızlanacağı düşünülmüştür. Hücrelerdeki Smn protein miktarının azalması durumunda bu komplekslerin kurulamadığı ve bu nedenle kurkuminin etki edemediği sonucuna varılmıştır. Smn proteininin katıldığı komplekslerde yer alan protein ve mRNA'ların araştırılması, nörit uzamasındaki moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ve tedavide yeni hedef moleküllerin tanımlanmasına ışık tutacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- PC12 hücrelerine 50 ng/ml NGF uygulamasıyla 88 µm olan nörit uzunluğunun 100 ng/ml NGF uygulamasıyla 101 µm olduğu saptandı. Bundan sonraki tüm deneysel çalışmalarda 100 ng/ml NGF kullanıldı.
- PC12 hücrelerinin bazal nörit boyları 3, 5 ve 7. günlük farklılaşma sürelerinde 74 µm, 96 µm ve 160 µm olarak belirlendi. İnkübasyon süresindeki artışa paralel olarak saptanan nörit boyu artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).
- PC12 hücrelerine nörit boyunun indüklenebilirliğinin kontrolü amacıyla uygulanan 2 mM VPA'nın nörit uzunluğunu 102 µm'den 143 µm'ye istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı saptandı ($p<0.001$).
- PC12 hücrelerine uygulanan;
 - 500 nM kurkuminin nörit boyunu 3 günlük inkübasyon sonunda 71 µm'den 109 µm'ye istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde uzattığı ve böylece nörit boyunda yaklaşık 38 µm artış sağladığı saptandı ($p<0.001$).
 - 500 nM kurkuminin nörit boyunu 7 günlük inkübasyon sonunda 153 µm'den 176 µm'ye istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde uzattığı ve böylece nörit boyunda yaklaşık 23 µm artış sağladığı saptandı ($p<0.05$).
 - 5 µM resveratrolün nörit boyunu 3 günlük inkübasyon sonunda 64 µm'den 82 µm'ye istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde uzattığı ve böylece nörit boyunda yaklaşık 18 µm artış sağladığı saptandı ($p=0.05$).

- Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücreleri;
 - 100 ng/ml NGF ile 3 gün farklılaştırıldığında, sağlıklı hücrelerde 83 μm olan nörit boyunun Smn ifadesi baskılandığında 24 μm kısalarak 59 μm olduğu saptandı ($p < 0.001$).
 - 2 mM valproat ile 3 gün inkübe edildiğinde nörit boyunun 59 μm 'den 112 μm 'ye uzadığı, böylece nörit boyunda yaklaşık 53 μm 'lik artış olduğu gösterildi ($p < 0.001$). Bu sayede kısalan nörit boyunun bileşik uygulamasıyla tekrar uzatılabildiği gösterildi.
 - 500 nM kurkumin ve 5 μM resveratrol ile inkübe edildiğinde, bu hücrelerde kısa olan nörit boyunu uzatmadıkları saptandı.
- PC12 ve Smn ifadesi baskılanmış PC12 hücreleriyle yapılan çalışmalar sonucunda, bileşiklerin nörit boyunu uzatabilmeleri için hücrelerde SMN proteini varlığına ihtiyaç duyduklarını göstermiştir.
- Bileşik uygulamalarının sağladığı nörit uzamasının çekirdekteki Smn protein miktarı ile ilişkisi *Gem* sayısı analiziyle araştırıldığında bileşiklerin çekirdekteki Smn protein miktarını arttırmadığı saptandı.
- Resveratrolün nörit boyuna etkisinin kurkumine oranla az olması nedeniyle, PC12 hücrelerindeki total SMN protein miktarı 500 nM kurkumin uygulanarak Western blot ile araştırıldığında, kurkuminin hücrelerdeki total Smn proteini miktarını değiştirmediği saptadı.
- Kurkuminin SMN protein miktarını değiştirmeden nörit boyunu uzatması, SMN proteini ile kurkuminin fiziksel bağlantısı olabileceğini düşündürdü ve bağlanma afiniteleri bilgisayar destekli 3D modelleme ile araştırıldı. Smn-kurkumin bağlanma afinitesi 239.79 μM olarak hesaplandı ve bağlanma potansiyelinin Smn-valproata oranla daha güçlü olduğu belirlendi.

- Bileşiklerin Smn varlığında nörit boyunu uzatabilmeleri, Smn ifadesi baskılandığında ise bu etkilerini kaybetmeleri, etki mekanizmalarının Smn proteini üzerinden olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, bileşik ile indüklenen nörit uzamasının Smn protein miktar artışından kaynaklanmadığını göstermiştir. Nörit boyu uzaması üzerindeki etkisi anlamlı bulunan kurkuminin, Smn proteinine fiziksel olarak bağlanma olasılığının yüksek olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, kurkumin-Smn bağlantısının Smn'in içinde bulunduğu komplekslerin fonksiyonlarını etkileyebileceği düşünülmüştür. Kurkumin-Smn-nörit uzaması arasında varsayılan ilişkinin kanıtlanabilmesi için tez çalışmasında *in silico* olarak gösterilen fiziksel bağlanmanın *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.
- SMN proteini nöritlerde KSRP proteini ile bağlanmaktadır. Bu protein hücre iskeletinde mikrotübül organizasyonunun kurulmasında görevli olan MAP2 geni mRNA'sının nörite taşınmasına aracılık etmektedir. Kurkuminin MAP2 gen ifadesini arttırdığı rapor edilmiştir. Tez çalışmamızın sonuçları ile literatür bilgileri birlikte değerlendirildiğinde, kurkumin ile indüklenen nörit uzamasında MAP2 proteinin rolü olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle kurkumin aracılı nörit uzamasında SMN ile MAP2 proteinlerinin rollerinin birlikte araştırılması önerilmektedir. Bu sayede uzamanın moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi mümkün olabilecektir.
- Sıçan kökenli hücre kültür modeli kullanılarak yapılan bu çalışmanın sonuçları ileride yapılacak araştırmalara yol gösterici nitelik taşımaktadır. Araştırdığımız bileşiklerin tedavi potansiyellerinin kanıtlanabilmesi için SMA hasta hücrelerinin yeniden programlanmasıyla elde edilecek olan motor nöron hücreleri üzerindeki etkilerinin de araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kiselyov, A.S., Gurney, M.E. (2010). Spinal Muscular Atrophy: Current Therapeutic Strategies. *Neurodegenerative Diseases*, 177-191.
2. Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Violette, L. ve diğerleri. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1), 155-165.
3. Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H. ve diğerleri. (1999). A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1177-1183.
4. Wirth, B., Brichta, L. Hahnen, E. (2006). Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13(2), 121-131.
5. Rochette, C., Gilbert, N. Simard, L. (2001). SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Human Genetics*, 108(3), 255-266.
6. Lorson, C.L., Rindt, H. Shababi, M. (2010). Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Human Molecular Genetics*, 19, R1, R111-118.
7. Dayangac-Erden, D., Bora, G., Ayhan, P., Kocaefe, C., Dalkara, S., Yelekci, K. ve diğerleri. (2009). Histone deacetylase inhibition activity and molecular docking of (e)-resveratrol: its therapeutic potential in spinal muscular atrophy. *Chemical Biology and Drug Design*, 73(3), 355-364.
8. Dayangac-Erden, D., Bora-Tatar, G., Dalkara, S., Demir, A.S., Erdem-Yurter, H. (2011). Carboxylic acid derivatives of histone deacetylase inhibitors induce full length SMN2 transcripts: a promising target for spinal muscular atrophy therapeutics. *Archives of Medical Science*, 7(2), 230-234.
9. Burghes, A.H., Beattie, C.E. (2009). Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neuroscience*, 10(8), 597-609.

10. Bowerman, M., Shafey, D., Kothary, R. (2007). Smn Depletion Alters Profilin II Expression and Leads to Upregulation of the RhoA/ROCK Pathway and Defects in Neuronal Integrity. *Journal of Molecular Neuroscience*, 32(2), 120-131.
11. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R. ve diğeri. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *Journal of Cell Biology*, 163(4), 801-812.
12. McWhorter, M.L., Monani, U.R., Burghes, A.H.Beattie, C.E. (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *Journal of Cell Biology*, 162(5), 919-931.
13. Pearn, J. (1978). Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *Journal of Medical Genetics*, 15(6), 409-413.
14. Pearn, J. (1980). Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*, 1(8174), 919-922.
15. Pearn, J.H. (1973). The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England. *Journal of Medical Genetics*, 10(3), 260-265.
16. Ogino, S., Leonard, D.G., Rennert, H., Ewens, W.J., Wilson, R.B. (2002). Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. *American Journal of Medical Genetics*, 110(4), 301-307.
17. Simic, G. (2008). Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathologica*, 116(3,) 223-234.
18. Munsat, T.L., Davies, K.E. (1992). International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscular Disorders*, 2, 5-6, 423-428.
19. Daniels, R.J., Thomas, N.H., MacKinnon, R.N., Lehner, T., Ott, J., Flint, T.J. ve diğeri. (1992). Linkage analysis of spinal muscular atrophy. *Genomics*, 12(2), 335-339.
20. Ogino, S., Wilson, R.B. (2004). Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(1), 15-29.

21. Burglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Cruaud, C. ve diğerleri. (1996). Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*, 32(3), 479-482.
22. Monani, U.R., McPherson, J.D., Burghes, A.H. (1999). Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1445(3), 330-336.
24. Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Howells, K., Phillips, A.D., Thomas, N.S. ve diğerleri. (2009). The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Medicine*, 1(1), 13.
25. Wirth, B. (2000). An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human Mutation*, 15(3), 228-237.
26. Erdem, H., Pehlivan, S., Topaloglu, H., Ozguc, M. (1999). Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy. *Brain Development*, 21, 2, 86-89.
27. Erdem, H., Pehlivan, S., Topaloglu, H., Yalnizoglu, D.Akcoren, Z. (1996). Deletions in the survival motor neuron gene in Turkish spinal muscular atrophy patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 19(6), 724-728.
28. Ogino, S., Wilson, R.B. (2002). Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Human Genetics*, 111(6), 477-500.
29. Scheffer, H., Cobben, J.M., Matthijs, G., Wirth, B. (2001). Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *European Journal of Human Genetics*, 9(7), 484-491.
30. Schrank, B., Gotz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G. ve diğerleri. (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 94(18), 9920-9925.
31. Burghes, A.H. (1997). When is a deletion not a deletion? When it is converted. *American Journal of Human Genetics*, 61(1), 9-15.

32. Lefebvre, S., Bulet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A. ve diğerleri. (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics*, 16(3), 265-269.
33. Covert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R. ve diğerleri. (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1205-1214.
34. Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, S.J. ve diğerleri. (2009). A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *American Journal of Human Genetics*, 85(3), 408-413.
35. Schmid, A., DiDonato, C.J. (2007). Animal models of spinal muscular atrophy. *Journal of Child Neurology*, 22(8), 1004-1012.
36. Monani, U.R., Covert, D.D., Burghes, A.H. (2000). Animal models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2451-2457.
37. Torres-Benito, L., Ruiz, R., Tabares, L. (2012). Synaptic defects in spinal muscular atrophy animal models. *Developmental Neurobiology*, 72(1), 126-133.
38. Tizzano, E. (1998). Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system. *American Journal of Pathology*, 153(2), 355-361.
39. Bulet, P. (1998). The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 7(12), 1927-1933.
40. Gabanella, F., Carissimi, C., Usiello, A., Pellizzoni, L. (2005). The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Human Molecular Genetics*, 14(23), 3629-3642.
41. Matera, A.G., Frey, M.R. (1998). Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *American Journal of Human Genetics*, 63(2), 317-321.
42. Liu, Q., Dreyfuss, G. (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO Journal*, 15(14), 3555-3565.

43. Fan, L., Simard, L.R. (2002). Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Human Molecular Genetics*, 11(14), 1605-1614.
44. Walker, M.P., Rajendra, T.K., Saieva, L., Fuentes, J.L., Pellizzoni, L., Matera, A.G. (2008). SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Human Molecular Genetics*, 17(21), 3399-3410.
45. Akten, B., Kye, M.J., Hao le, T., Wertz, M.H., Singh, S., Nie, D. ve diğ erleri. (2011). Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 108(25), 10337-10342.
46. Coady, T.H., Lorson, C.L. (2011). SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2(4), 546-564.
47. Bowerman, M., Anderson, C.L., Beauvais, A., Boyl, P.P., Witke, W., Kothary, R. (2009). SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42(1), 66-74.
48. Kolb, S.J., Battle, D.J., Dreyfuss, G. (2007). Molecular functions of the SMN complex. *Journal of Child Neurology*, 22(8), 990-994.
49. Pellizzoni, L., Charroux, B., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G. (2001). A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *Journal of Cell Biology*, 152(1), 75-85.
50. Li, Q., Lee, J.A., Black, D.L. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature Review Neuroscience*, 8(11), 819-831.
51. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2004). RNA Processing and Turnover. *The Cell Molecular Approach* (s. 261-280). Sunderland (MA), U.S.A: Sinauer Associates.
52. Cauchi, R.J. (2010). SMN and Gemins: 'we are family' or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. *Bioessays*, 32(12), 1077-1089.

53. Pellizzoni, L. (1998). A Novel Function for SMN, the Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, in Pre-mRNA Splicing. *Cell*, 95, 615-624.
54. Kanning, K.C., Kaplan, A., Henderson, C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, 33, 409-440.
55. Van Ooyen, A. (2005). Competition in neurite outgrowth and the development of nerve connections. *Progress in Brain Reserach*, 147, 81-99.
56. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2004). The cytoskeleton and cell movement. *The Cell: A Molecular Approach* (s.435-482). Sunderland (MA), U.S.A: Sinauer Associates.
57. Conde, C., Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Review Neuroscience*, 10(5), 319-332.
58. Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R.A., Halpain, S. (2004). MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Current Biology*, 14(5), 363-371.
59. Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D. ve diğ erleri. (2005). Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes and Development*, 19(19), 2320-2330.
60. Clelland, A.K., Bales, A.B., Sleeman, J.E. (2012). Changes in intra-nuclear mobility of mature snRNPs provide a mechanism for splicing defects in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Cell Science*, (basımda)
61. Carrel, T.L., McWhorter, M.L., Workman, E., Zhang, H., Wolstencroft, E.C., Lorson, C. ve diğ erleri. (2006). Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 11014-11022.
62. Zhang, H., Xing, L., Rossoll, W., Wichterle, H., Singer, R.H., Bassell, G.J. (2006). Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *Journal of Neuroscience*, 26(33), 8622-8632.

63. Rossoll, W., Bassell, G.J. (2009). Spinal muscular atrophy and a model for survival of motor neuron protein function in axonal ribonucleoprotein complexes. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 48, 289-326.
64. Shafey, D., MacKenzie, A.E., Kothary, R. (2008). Neurodevelopmental abnormalities in neurosphere-derived neural stem cells from SMN-depleted mice. *Journal of Neuroscience Research*, 86(13), 2839-2847.
65. Cifuentes-Diaz, C. (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Human Molecular Genetics*, 11(12), 1439-1447.
66. Jablonka, S., Beck, M., Lechner, B.D., Mayer, C., Sendtner, M. (2007). Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *Journal of Cell Biology*, 179(1), 139-149.
67. Jablonka, S., Karle, K., Sandner, B., Andreassi, C., von Au, K., Sendtner, M. (2006). Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 15(3), 511-518.
68. Fallini, C., Bassell, G.J., Rossoll, W. (2012). Spinal muscular atrophy: The role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain Research*, (basımda)
69. Torres-Benito, L., Neher, M.F., Cano, R., Ruiz, R., Tabares, L. (2011). SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One*, 6(10), e26164.
70. Ruiz, R., Casanas, J.J., Torres-Benito, L., Cano, R., Tabares, L. (2010). Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *Journal of Neuroscience*, 30(3), 849-857.
71. Simic, G., Mladinov, M., Seso Simic, D., Jovanov Milosevic, N., Islam, A., Pajtak, A. ve diğ erleri. (2008). Abnormal motoneuron migration, differentiation, and axon outgrowth in spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathologica*, 115(3), 313-326.
72. Chang, T., Zheng, W., Tsark, W., Bates, S., Huang, H., Lin, R.J. ve diğ erleri. (2011). Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived motoneurons of a spinal muscular atrophy patient. *Stem Cells*, 29(12), 2090-2093.

73. Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M. ve diğeri. (2008). Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, 320(5875), 524-527.
74. Wen, H.L., Lin, Y.T., Ting, C.H., Lin-Chao, S., Li, H., Hsieh-Li, H.M. (2010). Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 19(9), 1766-1778.
75. Stavarachi, M., Apostol, P., Toma, M., Cimponeriu, D.Gavrila, L. (2010). Spinal muscular atrophy disease: a literature review for therapeutic strategies. *Journal of Medicine and Life*, 3(1), 3-9.
76. Sproule, D.M. (2010). Therapeutic developments in spinal muscular atrophy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 3(3), 173-185.
77. Heier, C.R., DiDonato, C.J. (2009). Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. *Human Molecular Genetics*, 18(7), 1310-1322.
78. DiDonato, C.J. (2003). Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Human Gene Therapy*, 14, 179-188.
79. Skordis, L.A., Dunckley, M.G., Yue, B., Eperon, I.C., Muntoni, F. (2003). Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 100(7), 4114-4119.
80. Sendtner, M. (2010). Therapy development in spinal muscular atrophy. *Nature Neuroscience*, 13(7), 795-799.
81. Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Ronchi, D. ve diğeri. (2008). Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *Journal of Clinical Investigations*, 118(10), 3316-3330.
82. Sleiman, S.F. (2009). Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and changes of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(5), 573-584.

83. Bora Tatar, G., Dayangaç Erden, D., Erdem Yurter, H. (2010). Spinal musküler atrofi tedavisinde histon deasetilaz inhibitörlerinin rolü. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 90-96.
84. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2004). Chromosomes and Chromatin. *The Cell: A Molecular Approach* (s.150-158). Sunderland (MA), U.S.A: Sinauer Associates.
85. Grant, P.A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biology*, 2(4), REVIEWS0003.
86. Strahl, B.D., Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45.
87. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S.van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, 370, Pt 3, 737-749.
88. Mehnert, J.M. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Biology and Mechanism of Action. *The Cancer Journal*, 13(1), 23-29.
89. Dokmanovic, M.Marks, P.A. (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(2), 293-304.
90. Hahnen, E., Hauke, J., Tränkle, C., Eyüpoglu, I.Y., Wirth, B., Blümcke I. (2008). Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(2), 169-184.
91. Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F.D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A. ve diğerleri. (2004). Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *European Journal of Human Genetics*, 12(1), 59-65.
92. Brahe, C., Vitali, T., Tiziano, F.D., Angelozzi, C., Pinto, A.M., Borgo, F. ve diğerleri. (2005). Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. *European Journal of Human Genetics*, 13(2), 256-259.
93. Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehnruhl, F.A., Raschke, H., Blumcke, I. ve diğerleri. (2003). Valproic acid increases the SMN2 protein level: a

well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 12(19), 2481-2489.

94. Chang, J.G., Hsieh-Li, H.M., Jong, Y.J., Wang, N.M., Tsai, C.H., Li, H. (2001). Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A.*, 98(17), 9808-9813.

95. Hahnen, E., Eyupoglu, I.Y., Brichta, L., Haastert, K., Trankle, C., Siebzehnruhl, F.A. ve diğerleri. (2006). In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *Journal of Neurochemistry*, 98(1), 193-202.

96. Riessland, M., Ackermann, B., Forster, A., Jakubik, M., Hauke, J., Garbes, L. ve diğerleri. (2010). SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 19(8), 1492-1506.

97. Riessland, M., Brichta, L., Hahnen, E., Wirth, B. (2006). The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Human Genetics*, 120(1), 101-110.

98. Narver, H.L., Kong, L., Burnett, B.G., Choe, D.W., Bosch-Marce, M., Taye, A.A. ve diğerleri. (2008). Sustained improvement of spinal muscular atrophy mice treated with trichostatin A plus nutrition. *Annals of Neurology*, 64(4), 465-470.

99. Avila, A.M., Burnett, B.G., Taye, A.A., Gabanella, F., Knight, M.A., Hartenstein, P. ve diğerleri. (2007). Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Journal of Clinical Investigations*, 117(3), 659-671.

100. Garbes, L., Riessland, M., Holker, I., Heller, R., Hauke, J., Trankle, C. ve diğerleri. (2009). LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate. *Human Molecular Genetics*, 18(19), 3645-3658.

101. Natasha, G., Bandom, K.G., Young, E.C., Young, P.J. (2008). Valproate and spinal muscular atrophy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 1, 161-165.

102. Sumner, C.J., Huynh, T.N., Markowitz, J.A., Perhac, J.S., Hill, B., Coovert, D.D. ve diğeri. (2003). Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Annals of Neurology*, 54(5), 647-654.
103. Bora-Tatar, G., Dayangac-Erden, D., Demir, A.S., Dalkara, S., Yelekci, K., Erdem-Yurter, H. (2009). Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(14), 5219-5228.
104. Han, X. (2007). Dietary Polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 950-988.
105. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348-361.
106. Hu, M.L. (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Medical Journal*, 34(5), 449-460.
107. Visioli, F., De La Lastra, C.A., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A. ve diğeri. (2011). Polyphenols and human health: a prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 524-546.
108. Smoliga, J.M., Baur, J.A., Hausenblas, H.A. (2011). Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(8), 1129-1141.
109. McMurray, C.T. (2000). Neurodegeneration: diseases of the cytoskeleton? *Cell Death and Differentiation*, 7(10), 861-865.
110. Greene, L.A., Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 73(7), 2424-2428.
111. Stevens, C.F. (1998). Culture and experimental use of the PC12 rat pheochromocytoma cell line. *Culturing nerve cells* (161-188). U.S.A.:Massachusetts Institute of Technology.

112. Hsieh, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E., Gage, F.H. (2004). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 101(47), 16659-16664.
113. Siebzehnrubl, F.A., Buslei, R., Eyupoglu, I.Y., Seufert, S., Hahnen, E., Blumcke, I. (2007). Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells. *Experimental Brain Research*, 176(4), 672-678.
114. Balasubramaniyan, V., Boddeke, E., Bakels, R., Kust, B., Kooistra, S., Veneman, A. ve diğeri. (2006). Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. *Neuroscience*, 143(4), 939-951.
115. van Bergeijk, J., Haastert, K., Grothe, C., Claus, P. (2006). Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chemical Biology and Drug Design*, 67(3), 244-247.
116. Ray, B., Lahiri, D.K. (2009). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 434-444.
117. Song, E.J., Hong, H.M., Yoo, Y.S. (2009). Proteasome inhibition induces neurite outgrowth through posttranslational modification of TrkA receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(3), 539-545.
118. Dikshit, P., Goswami, A., Mishra, A., Chatterjee, M., Jana, N.R. (2006). Curcumin induces stress response, neurite outgrowth and prevent NF-kappaB activation by inhibiting the proteasome function. *Neurotoxicology Research*, 9(1), 29-37.
119. Valtorta, F., Leoni, C. (1999). Molecular mechanisms of neurite extension. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 354(1381), 387-394.
120. Hung, W.C., Chen, F.Y., Lee, C.C., Sun, Y., Lee, M.T., Huang, H.W. (2008). Membrane-thinning effect of curcumin. *Biophysical Journal*, 94(11), 4331-4338.

121. Adlerz, L., Beckman, M., Holback, S., Tehranian, R., Cortes Toro, V., Iverfeldt, K. (2003). Accumulation of the amyloid precursor-like protein APLP2 and reduction of APLP1 in retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells upon curcumin-induced neurite retraction. *Brain Research Molecular Brain Research*, 119(1), 62-72.
122. Dasgupta, B., Milbrandt, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 104(17), 7217-7222.
123. Czaplicki C, S.B., Hogan E. (2009). Resveratrol enhances neurite outgrowth by affecting microtubule distribution in growth cones [poster]. Third Annual Neuroscience Research Day, Buffalo University, New York, USA.
124. Guo, W., Qian, L., Zhang, J., Zhang, W., Morrison, A., Hayes, P. ve diğ erleri. (2011). Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *Journal of Neuroscience Research*, 89(11), 1723-1736.
125. Brittes, J., Lucio, M., Nunes, C., Lima, J.L., Reis, S. (2010). Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(8), 747-754.
126. Sakla, M.S., Lorson, C.L. (2008). Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. *Human Genetics*, 122(6), 635-643.
127. Also-Rallo, E., Alias, L., Martinez-Hernandez, R., Caselles, L., Barcelo, M.J., Baiget, M. ve diğ erleri. (2011). Treatment of spinal muscular atrophy cells with drugs that upregulate SMN expression reveals inter- and intra-patient variability. *European Journal of Human Genetics*, 19(10), 1059-1065.
128. Xiao, Z., Lin, L., Liu, Z., Ji, F., Shao, W., Wang, M. ve diğ erleri. (2010). Potential therapeutic effects of curcumin: relationship to microtubule-associated proteins 2 in Abeta1-42 insult. *Brain Research*, 1361, 115-123.
129. Chakraborti, S., Das, L., Kapoor, N., Das, A., Dwivedi, V., Poddar, A. ve diğ erleri. (2011). Curcumin recognizes a unique binding site of tubulin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (18), 6183-6196.

130. Tadesse, H., Deschenes-Furry, J., Boisvenue, S., Cote, J. (2008). KH-type splicing regulatory protein interacts with survival motor neuron protein and is misregulated in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 17(4), 506-524.
131. Rehbein, M., Wege, K., Buck, F., Schweizer, M., Richter, D., Kindler, S. (2002). Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *Journal of Neurochemistry*, 82(5), 1039-1046.