



T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ALZHEIMER HASTALIĞI MODELİ OLUŞTURULMUŞ SH-SY5Y İNSAN
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEDAVİSİNDE HİSTON METİL
TRANSFERAZLARIN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
Aybüke Şeniz ATEŞ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ

İSTANBUL
Mayıs , 2023



T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ALZHEIMER HASTALIĞI MODELİ OLUŞTURULMUŞ SH-SY5Y İNSAN
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEDAVİSİNDE HİSTON METİL
TRANSFERAZLARIN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
Aybüke Şeniz ATEŞ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ

İSTANBUL
Mayıs , 2023

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Aybüke Şeniz Ateş tarafından hazırlanan “Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulmuş SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinin Tedavisinde Histon Metil Transferazların Etkilerinin Moleküler Analizi” konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/05/2023

Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu:

İmzası

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ
Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Gözde KURU TÜRKCAN
Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih SEYHAN
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Bu tez yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zafer UTLU
Müdür

Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulmuş SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinin Tedavisinde Histon Metil Transferazların Etkilerinin Moleküler Analizi

ORJİNALLİK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%1

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

%5

2

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%1

3

www.freepatentsonline.com

İnternet Kaynağı

<%1

4

Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

5

Submitted to Pamukkale Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

6

acikerisim.uludag.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

7

Engelmann, P.. "Earthworm leukocytes kill HeLa, HEP-2, PC-12 and PA317 cells in vitro", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 20041029

Yayın

<%1

TEZ ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulmuş SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinin Tedavisinde Histon Metil Transferazların Etkilerinin Moleküler Analizi” başlıklı bu çalışmayı başından sonuna kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ’nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

(İmza)

Aybüke Şeniz ATEŞ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destekle gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yardımcı olan, tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, tüm yoğunluğu içinde uzak ya da yakın, mesai saatinde ya da dışında olması farketmeksizin benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam; Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ'YE gösterdiği özveri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecimde kullandığım SH-SY5Y hücrelerini bana temin eden Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışma sürecimde bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanını benden esirgemeyerek her ihtiyacım olduğunda bana yardımcı olan değerli Tekn. Uzm. Beyza YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında motivasyonumu her daim yüksek tutan, eğitimim sürecinde mutlu ve üzüntülü her anımı benimle paylaşan, stresli zamanlarımı kolay atlatmamı sağlayan sevgili arkadaşım Erna ÇOPUROĞLU ve manevi olarak hep yanımda olduğunu hissettiğim arkadaşım Deniz KILIÇASLAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde, maddi ve manevi her zaman yanımda olan, tüm vakitsizliklerime ve yoğunluğuma anlayış gösteren, eğitim ve iş hayatımda her zaman yol katetmemi sağlayan biricik eşim Hüseyin ATEŞ'e, evlatlarım H. Rüzgar ATEŞ ve A. Pelin ATEŞ'e, canım annem Sevim KIRGÜLÜ'ye, akademik kariyerim yolunda desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettirdikleri için en derin şükranlarımı sunarım.

Mayıs, 2023

Aybüke Şeniz Ateş

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
TEZ ETİK BEYANI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
SEMBOLLER	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı Nöropatolojisi.....	4
2.1.1. Nörofibriler Yumaklar (NFT).....	4
2.1.2. Amiloid Plaklar (SP)	5
2.2.2.1. Hücrelerde Amiloid Beta Üretimi	6
2.3. Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler	8
2.3.1. APP (Amyloid-beta precursor protein).....	8
2.3.2. BACE1 (Beta Sekretaz-1)	8
2.3.3. PSEN1 (Presenilin-1)	9
2.3.4. GSAP (Gama Sekretaz Aktive Edici Protein)	10
2.3.5. BDNF (Beyin Türevli Nörotrofik Faktör)	11
2.4. Alzheimer Hastalığının Teşhisi	11

2.5. Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Risk Faktörleri	12
2.6. Alzheimer Hastalığında Epigenetik Modifikasyonlar	12
2.6.1. Asetilasyon ve Deasetilasyon	13
2.6.2. DNA ve Histon Metilasyonu	14
2.7. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Umut Verici Epigenetik Terapötikler	15
2.7.1. Azacitidine (AZA)	16
2.7.2. Deazaneplanocin A (DZNep)	17
2.7.3. SGC 0946	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	19
3.1.2. Kimyasallar.....	19
3.1.3. Cihazlar.....	21
3.1.4. Sarf Malzemeler.....	22
3.1.5. Kitler	23
3.1.6. Hücre Hatları Büyüme Ortamları	23
3.1.7. Primerler	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü.....	24
3.2.2. A β 42 Proteinin Hazırlanması	26
3.2.3. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	26
3.2.4. A β 42 Proteinin Uygulanması	27
3.2.5. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	29
3.2.6. Total RNA İzolasyonu.....	31
3.2.7. cDNA Sentezi	32
3.2.8. Gerçek-Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	33
3.2.9. 96 Kuyulu Plaklara Ekim ve MTT Testi	34

3.2.10. Alzheimer Modeli Oluşturulmuş SH-SY5Y Hücrelerine Kimyasal Uygulama İşlemi	36
3.2.11. Kimyasal Uygulaması Sonrası ELISA Testi	37
3.2.12. Kimyasal Uygulaması Sonrası Gerçek Zamanlı PZR testi.....	37
3.3. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. SH-SY5Y Hücre Hatlarının Görüntüleri	39
4.2. SH-SY5Y Hücre Hatlarının A β 42 Uygulaması Sonrası Görüntüleri.....	40
4.3. Alzheimer Modeli Oluşturma Aşaması için ELISA Sonuçların Değerlendirilmesi	40
4.4. Gerçek Zamanlı PZR Analizinin Değerlendirilmesi	42
4.5. MTT Analizinin Değerlendirilmesi	43
4.6. Kimyasal Uygulaması Sonrası ELISA Analizinin Değerlendirilmesi:	45
4.7. Kimyasal Uygulaması Sonrası GZ-PZR ile Gen İfadesi Analizinin Değerlendirilmesi:	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	55
7. ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	67

KISALTMALAR

A	: Absorbans
AH	: Alzheimer Hastalığı
AICD	: Amiloid öncü protein intraselüler domain
APP	: Amiloid öncü protein
Aβ	: Amiloid-beta
AZA	: Azacitidine
BDNF	: Beyin aracılı nörotrofik faktör
BACE1	: Beta Sekretaz-1
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
cDNA	: Komplementer DNA
CTF	: Karboksiterminal fragmanları
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNMT	: DNA Metil transferaz
DZNep	: Deazaneplanocin A
ELISA	: Enzim bağlı immünolojik analiz
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FBS	: Fetal sığır serumu
GSAP	: Gama sekretaz aktive edici protein
G	: Gram
HMT	: Histon Metil Transferaz
KMT	: Lizin Metil Transferaz
HDAC	: Histon deasetilaz

HDACi	: Histon deasetilaz inhibitörü
L	: Litre
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mm	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NB	: Nöroblastoma
NEAA	: Temel olmayan amino asit
NFT	: Nörofibriler yumaklar
Ng	: Nanogram
NT	: Kimyasal veya herhangi bir ek madde uygulaması yapılmayan kontrol koşul
PBS	: Fosfat salin tamponu
Pen-Strep	: Penisilin Streptomisin
PET	: Pozitron Emisyon Taraması
pM	: Pikomolar
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SP	: Senil plak
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi

SEMBOLLER

μl	: Mikro litre
ng/μl	: Nanogram / mikrolitre
Nm	: Nanometre
pg/ml	: Pikogram/mililitre
β	: Beta
Γ	: Gama
μg	: Mikrogram
U	: Ünite

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 3.1. Kimyasallar	19
Tablo 3.2. Cihazlar	21
Tablo 3.3. Sarf Malzemeler	22
Tablo 3.4. Kullanılan Kitler.....	23
Tablo 3.5. Gerçek-Zamanlı PZR’da kullanılan genler ve baz dizileri	24
Tablo 3.6. DMEM üzerine eklenen tamamlayıcı bileşenler.....	24
Tablo 3.7. Dondurma besiyeri bileşenleri	26
Tablo 3.8. A β 42 proteinin amino asit sekansı	26
Tablo 3.9. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri	32
Tablo 3.10. cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları.....	33
Tablo 3.11. Gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılan Gerçek-Zamanlı PZR uygulamasında kullanılan bileşenler	33
Tablo 3.12. GZ-PZR Koşulları.....	34
Tablo 3.13. Uygulanan kimyasalların stok ve son konsantrasyonları	36
Tablo 4.1. ELISA Kit protokolüne göre ölçülen standart değerler (OD 450 nm).....	41
Tablo 4.2. 5 μ M-10 μ M A β 42 proteini uygulaması sonrasında besiyerlerine salınan A β 42 protein seviyesinin ELISA ile ölçüm sonuçları	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No.

Şekil 2.1. Tau'nun hücreler içindeki mikrotübül stabilizasyonu	4
Şekil 2.2. Amiloid plakları (kahverengi) gösteren amiloid beta immün boyama.....	5
Şekil 2.3. (a) Sağlıklı ve (b) Alzheimer hastalığı'na (AH) sahip bireylerin beyin fizyolojik yapısı ve nöronları.....	6
Şekil 2.4. Amiloid öncü proteininin (APP) proteolitik işlenmesi ve A β biyogenezi...	7
Şekil 2.5. Presenilin hipotezi	10
Şekil 2.6. Genlerin aktivasyonuna ve deaktivasyonuna katkıda bulunan histon bağlantıları ve epigenetik değişkenler.	13
Şekil 2.7. AH fare modellerinde gözlemlenen HDAC inhibitörü tedavilerinin umut verici yararlı sonuçları	15
Şekil 2.8. Azacitidine Molekül Yapısı.....	16
Şekil 2.9. Deazaneplanocin A (DZNep) Molekül Yapısı	17
Şekil 2.10. SGC 0946 Molekül Yapısı	18
Şekil 3.1. Thoma lamının sayım yapılan kareleri (toplam görüş sahası).....	27
Şekil 3.2. SH-SY5Y hücrelerine A β 42 proteini uygulaması	28
Şekil 3.3. Alzheimer Modeli Oluşturma Aşamaları.....	28
Şekil 3.4. Hu A β 42 standardının seri dilüsyonları.....	29
Şekil 3.5. ELISA kit aşamaları	30
Şekil 3.6. MTT analizi için yapılan ekim düzeni.....	35
Şekil 3.7. Hücrelere Kimyasal Uygulama Aşamaları	35
Şekil 3.8. ELISA ve GZ-PZR çalışması için ekilen hücrelere uygulanan kimyasalları gösteren 6 kuyucuklu plaka	36
Şekil 3.9. ELISA testi için kullanılan örnekler	37
Şekil 4.1. Süspansiyon SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü	39
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü (20X)	40
Şekil 4.3. A β 42 Proteini uygulanmış SH-SY5Y hücreleri (20X).....	40
Şekil 4.4. ELISA ölçümleri ile elde edilen standart değerlere göre hesaplanan regresyon değeri	41
Şekil 4.5. A β 42 (5 μ M-10 μ M) uygulaması sonrası, süpernatanta salınan A β 42 seviyelerinin ELISA testi ile kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak elde edilen değerlerin grafiği.....	42
Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde AH ile ilişkili genlerin Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonuçları.....	43
Şekil 4.7. Kontrol ve A β 42 SH-SY5Y hücrelerinin 5-AzaC uygulaması sonrası (48 saat) MTT analiz sonuçları	44
Şekil 4.8. Kontrol ve A β 42 SH-SY5Y hücrelerinin DZNep uygulaması sonrası (48 saat) MTT analiz sonuçları	44

Şekil 4.9. Kontrol ve A β 42 SH-SY5Y hücrelerinin SGC0946 uygulaması sonrası (48 saat) MTT analiz sonuçları	45
Şekil 4.10. A β 42 hücrelerinde kimyasal uygulaması sonrası ölçülen protein seviyesi	46
Şekil 4.11. A β 42 hücrelerinde kimyasal uygulaması sonrası ölçülen protein seviyesi	47
Şekil 4.12. A β 42 hücrelerine uygulanan DZNep (1 μ M) sonucunda ölçülen gen anlatımı seviyesi	48
Şekil 4.13. A β 42 hücrelerine uygulanan 5-AzaC (1 μ M) sonucunda ölçülen gen anlatımı seviyesi	48
Şekil 4.14. A β 42 hücrelerine uygulanan SGC0946 (5 μ M) sonucunda ölçülen gen anlatımı seviyesi	49

ÖZET

ALZHEIMER HASTALIĞI MODELİ OLUŞTURULMUŞ SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEDAVİSİNDE HISTON METİL TRANSFERAZLARIN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ANALIZI

Alzheimer hastalığı (AH), 65 yaş üstü kişilerde görülen hafıza, anlama, dil, muhakeme gibi davranışsal ve bilişsel işlevlerde bozulma ile seyreden nörodejeneratif bir hastalık olup, beyinde amiloid beta 42 (A β 42) adı verilen anormal nöritik plakların ve nörofibriller yumakların birikmesiyle karakterizedir. AH, bazı genlerdeki mutasyonlarla bağlantılı otozomal dominant bir hastalık olarak kalıtım gösterebilmekle birlikte bu genlerin çoğu DNA ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların etkisi altındadır. Epigenetik modifikasyonlar geri dönüşümlü oldukları için potansiyel olarak farmakolojik müdahale ile hedef alınabilir. Buna istinaden epigenetik ilaçlar, kanser, kardiyovasküler bozukluklar, beyin bozuklukları gibi önemli hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir. Bu bağlamda gerçekleştirilen bu çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yeterli A β 42 ekspresyonu ile Alzheimer modeli oluşturularak A β plaklarının artmasında rol alan genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirebilecek metil transferaz enzim inhibitörlerinin kullanılmasıyla hastalığın prognozunu olumlu şekilde etkileyebilen teröpotik yaklaşımların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu maksatla SH-SY5Y hücreleri uygun koşullarda kültüre edildikten sonra, yapılan A β 42 protein uygulaması ile Alzheimer modeli oluşturularak hücrelerde üretimi başlayan A β proteininin kantitatif ölçümleri ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. Ayrıca A β üretimi ile ilişkili genlerin ifade seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile ölçülerek hücrelerde oluşturulan Alzheimer modeli gen seviyesinde kontrol edildi. Oluşan A β plaklarının miktarını düşürecek Azasitidin, Deazaneplanocin ve SGC0946 gibi metiltransferaz enzim inhibitörlerinin farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmasıyla, MTT testi ile optimum konsantrasyonlar belirlendi ve bu konsantrasyonlardaki kimyasalların uygulandığı hücrelerdeki A β 42 miktarının ELISA yöntemi ile protein düzeyinde ölçülmesinin yanı sıra hastalıkla ilişkilendirilen APP, PSEN, BACE1, GSAP, BDNF gibi genlerin ifade seviyeleri GZ-PZR ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, kullanılan metiltransferaz inhibitörlerinin etkisiyle A β 42 plak seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Kullanılan her bir kimyasal sonrası farklı oranda olmak üzere A β 42 plaklarıyla ilişkilendirilen genlerin ifade seviyelerinde hastalığın prognozunu olumlu etkileyebilecek şekilde anlamlı değişimler saptanmıştır. Sonuç olarak, kullanılan kimyasalların hücrelerdeki mevcut epigenetik modifikasyonları değiştirerek hücre canlılığında belirgin farklılıklar meydana getirdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Amyloid beta plakları, Metil Transferaz İnhibitörleri, SGC0946, Deazaneplanocin

ABSTRACT

MOLECULAR ANALYSIS OF THE EFFECTS OF HISTON METHYL TRANSFERASES IN THE TREATMENT OF SH-SY5Y HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS FORMED WITH ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that is seen in people over 65 years old and is characterized by deterioration in behavioral and cognitive functions such as memory, comprehension, language and reasoning. AD is characterized by the accumulation of abnormal neuritic plaques called amyloid beta 42 (A β 42) and neurofibrillary tangles in the brain. Although AD can be inherited as an autosomal dominant disease associated with mutations in some genes, most of these genes are under the influence of epigenetic mechanisms such as DNA and histone modifications. Because epigenetic modifications are reversible, they can potentially be targeted by pharmacological intervention. Accordingly, epigenetic drugs may be useful in the treatment of important diseases such as cancer, cardiovascular disorders, and brain disorders. In this context, it was aimed to develop therapeutic approaches that can positively affect the prognosis of the disease by using methyl transferase enzyme inhibitors that will change the expression levels of genes involved in the increase of A β plaques by creating an Alzheimer's model with sufficient A β 42 expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells in this study.

For this purpose, after culturing SH-SY5Y cells under appropriate conditions, the Alzheimer's model was created with the A β 42 protein application, and quantitative measurements of A β protein, which started to be produced in cells, were performed by the ELISA method. In addition, the expression levels of genes associated with A β production were measured by Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and the Alzheimer model formed in the cells was controlled at the gene level. By applying methyltransferase inhibitors to the cells at different concentrations such as Azacitidine, Deazaneplanocin and SGC0946, which will reduce the amount of amyloid beta plaques formed, optimum concentrations were determined with the MTT test and the amount of A β 42 in Alzheimer's model cells is measured at the protein level by ELISA method, as well as the expression levels of genes such as APP, PSEN, BACE1, GSAP, BDNF associated with the disease determined by RT-PCR quantitatively. As a result of the study, a statistically significant decrease was found in A β 42 plaque levels with the effect of methyltransferase inhibitors used. Significant changes were detected in the expression levels of genes associated with A β 42 plaques at different rates after each chemical used, which could positively affect the prognosis of the disease. As a result, it has been observed that the chemicals used cause significant changes in cell viability by changing the existing epigenetic modifications in the cells.

Keywords: *Alzheimer's Disease, Amyloid beta plaques, Methyl Transferase Inhibitors, SGC0946, Deazaneplanocin*

1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), 65 yaş üstü kişilerde (Kumar et al., 2022) davranışların anormalleşmesi ve kişilik bozukluğu ile birlikte görülen hafıza kaybı ve biliş bozukluğu ile ilişkili ciddi, kronik, tedavisi olmayan ve ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluk olarak açıklanabilir (Godyn et al., 2016).

AH'nın ilk evresi olan hücresel evre, tau patolojisinin yayılmasını indükleyen amiloid β birikimi ile paralel olarak ortaya çıkar (Scheltens et al., 2021). A β plakları ilk etapta beynin neokorteks bölgelerinde gelişmeye başlar, 2. fazda hipokampus ve amigdalada görünürler ve ilerleyen fazlarda diensefalon ve bazal ganglionlar etkilenerek plak oluşumu devam eder (Goedert, 2010; 2015).

Epigenetik değişiklikler (DNA metilasyonu/demetilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA düzenlemesi) fizyolojik ve patolojik durumlarda yaygın olarak gerçekleşir ve yaşlanma süreci boyunca farklı dokularda ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda görülür. Epigenetik, yaşam süresini ve uzun ömürlülüğü etkileyen bir süreçtir. AH ile ilişkili genlerde meydana gelen epigenetik değişiklikler ile epigenetiğin demansta patojenik bir rol oynayabileceği anlaşılmaktadır (Cacabelos and Torrellas, 2015).

Histon metilasyonu, histon metil transferaz enzimleri tarafından katalizlenen ve histon proteinlerindeki belirli amino asitlere metil gruplarının eklenmesiyle meydana gelen bir modifikasyondur. Hücre çekirdeğinde DNA, histonların etrafına sarılarak paketlenir. DNA'daki genlerin "kapalı" ve "açık" hale getirilmesi iki şekilde olur: Histonların metilasyonu ve demetilasyonu ile histon kuyrukları gevşeyerek transkripsiyon faktörlerinin ve diğer proteinlerin DNA'ya erişmesine izin verilir ve genler açılır ya da histon kuyrukları ile DNA çevrelenerek DNA'ya erişim kısıtlanır ve DNA'daki genler "kapalı" hale gelir. Böylece nükleozomun özellikleri değişir ve diğer proteinlerle gerçekleşen etkileşimler etkilenir (Whetstine, 2010).

Epigenetik ilaçlar, AH ve kanser gibi önemli sağlık sorunlarının tedavisinde yararlı olabilir. Bu ve diğer ilaçların etkinliği ve güvenliği, farklı gen kümelerinin (patojenik, mekanik, metabolik, taşıyıcı, pleiotropik) dahil olduğu farmakogenetik sürece de bağlıdır çünkü bu genlerin çoğu aynı zamanda epigenetik mekanizmanın etkisi altında çalışır (Cacabelos and Torrellas, 2015).

Alzheimer hastalığında, translasyon sonrası histon modifikasyonlarının etkilediği düşünülen bir epigenetik baskılama veya gen ifadesinde genel bir düşüş sergilendiği bir çok çalışmada ısıpatlanmıştır (Sananbenesi and Fischer, 2009; Gräff et al., 2012). Bu yüzden HDAC inhibitörleri artık AH hastalarında çeşitli etkiler gösteren potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilmektedir (Xu et al., 2011; Esposito and Sherr, 2019).

Şu anda, Alzheimer hastalığının gelişimini engelleyen önleyici veya iyileştirici bir tedavi bulunmadığından dolayı etkili tedavilerin yokluğunda, demansı olan kişi sayısının 2050'ye kadar tahmini 130 milyona ulaşacağı düşünülmektedir (Dubois et al., 2014). Sonuç olarak, farmakoepigenetik çalışmaların ilaç geliştirme ve kişiselleştirilmiş tedavilere dahil edilmesi gerektiği düşünülmektedir (Cacabelos and Torrellas, 2015)

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada Alzheimer modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde histon metil transferazların moleküler etkisini analiz etmek amacıyla inhibitör kimyasallar uygulanacak ve etkileri analiz edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Alzheimer hastalığı (AH), nöronal hücre ölümünün neden olduğu hafıza, anlama, dil, dikkat, akıl yürütme ve muhakeme gibi bilişsel işlevlerin kademeli ve ilerleyici şekilde bozulmasına neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır (Kumar et al., 2022).

Adını 1906'da hastalığı ilk kez karakterize eden Alois Alzheimer'den almıştır (Hippius and Neundörfer, 2003). Demans, bilişsel yeteneklerin günlük yaşam aktivitelerini engelleyecek kadar ciddi bir bozulmayı tarif eden genel bir tabirdir. Alzheimer hastalığı, genellikle 65 yaş üstü kişilerde ortaya çıkan demans vakalarının en az % 66'sını oluşturan en sık görülen bunama türüdür. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ölüm nedenleri arasında 6. sıradadır. Alzheimer hastalığı tipik olarak bir yaşlılık hastalığı olmakla birlikte 65 yaşından önce başlangıç göstermesi beklenmez ve Alzheimer hastalarının çok azında (< %10) erken başlangıçlı Alzheimer görülür. Hastalardaki en sık görülen başvuru sebebi, uzun süreli belleğin nispi olarak korunduğu, seçici ve kısa süreli son bellek kaybıdır (Kumar et al., 2022).

Alzheimer hastalığının belirtileri hastalığın evresine bağlı olarak değişir ve bilişsel bozukluğun derecesine bağlı olarak preklinik, hafif, orta ve geç evre olarak sınıflandırılır. Erken aşamalarda kısa süreli hafıza kaybını problem çözme, dağınıklık, muhakeme yeteneklerinde azalma ve motivasyon eksikliği takip eder ve bu bozukluklar ilk evrelerde hafif seviyede olabilir fakat bu süreci konuşmada bozukluk ve görsel uzamsal becerilerde bozulma izlemektedir. Çevreye karşı duyarsızlık, sosyal izolasyon, nöropsikiyatrik semptomlar gibi sorunlar orta ve ileri aşamalarda ortaya çıkar. Hastalığın geç dönemlerinde öğrenilmiş motor görevleri yerine getirmede zorlanma, uyku bozuklukları ve koku alma işlevlerinde bozulma, kaslarda istemsiz hareketler ve parkinson bulguları ortaya çıkar ve hastalığın son dönemlerinde idrar kaçırma ve bakıcılara tam bağımlılık gözlenir (Zilberzwige and Gazit, 2018; Maccioni et al., 2018; Tang et al., 2019). 65 yaş ve üstü insan nüfusu dünya çapında diğer tüm yaş gruplarından daha hızlı artış gösterdiği için AH prevalansı hızla artmaktadır (Apostolova, 2016).

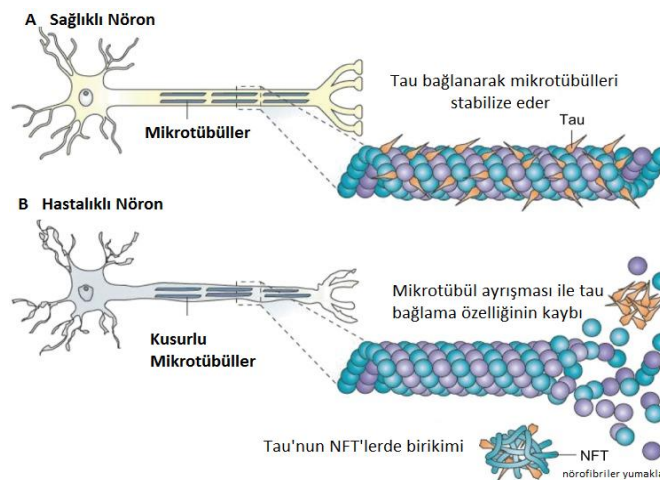
2.1. Alzheimer Hastalığı Nöropatolojisi

AH'da ortaya çıkan iki tip nöropatolojik değişiklik hastalığın ilerlemesi ve semptomları hakkında kanıt niteliğindedir. İlki nörofibriler yumakların, amiloid plakların, distrofik nöritlerin, nöropil liflerinin birikmesiyle karakterize edilen pozitif lezyonlardır.

Diğeri ise nöral, nöropil ve sinaptik kayıplara bağlı olarak gelişen atrofi ile karakterize edilen negatif lezyonlar (Serrano-Pozo et al., 2011; Spires-Jones and Hyman, 2014; Singh et al., 2016).

2.1.1. Nörofibriler Yumaklar (NFT)

Nörofibriler yumaklar (NFT) beyinde nöronal sitoplazma ve süreçlerde çözünmeyen yanlış katlanmış ve hiperfosforile edilmiş tau proteini birikintileridir. Sağlıklı nöronlarda tau proteininde sadece üç rezidü fosforile edilir, böylelikle tubulin düzeneğini mikrotübüllere dönüştürür. Tau, mikrotübüllerle etkileşimi sayesinde hem yapısal hem de dinamik bir role hizmet eder. Tau'nun hiperfosforilasyonu, mikrotübüllere bağlanmasını önleyerek mikrotübüllerin kararsız hale gelmesine sebep olur ve mikrotübüller parçalanır (Şekil 2.1). Dolayısıyla hem aksonal hücre iskeleti hem de aksonal taşıma için gerekli süreçler bozulur. Buna istinaden de nöronal hücre ölümü hızlanabilir. Mikrotübüllerin bozulmasına ek olarak, hiperfosforile edilmiş tau, artık tübülini bağlamayan NFT'ler olan çözünmez inklüzyonlar halinde kendi kendine birikmeye başlar. Tau patolojisi AH'nın erken bir özelliğidir ve agregatların ortaya çıkması nöronal kayıpla ilişkilidir (Sontheimer, 2015).

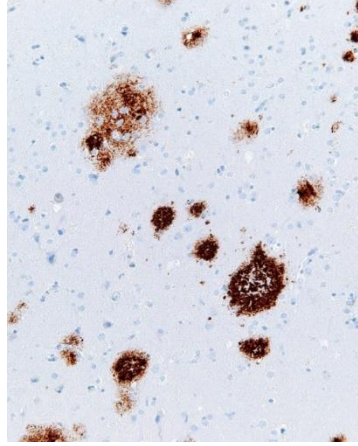


Şekil 2.1. Tau'nun hücreler içindeki mikrotübül stabilizasyonu

Kaynak: Brunden, K. et al., (2009)'dan uyarlanmıştır.

2.1.2. Amiloid Plaklar (SP)

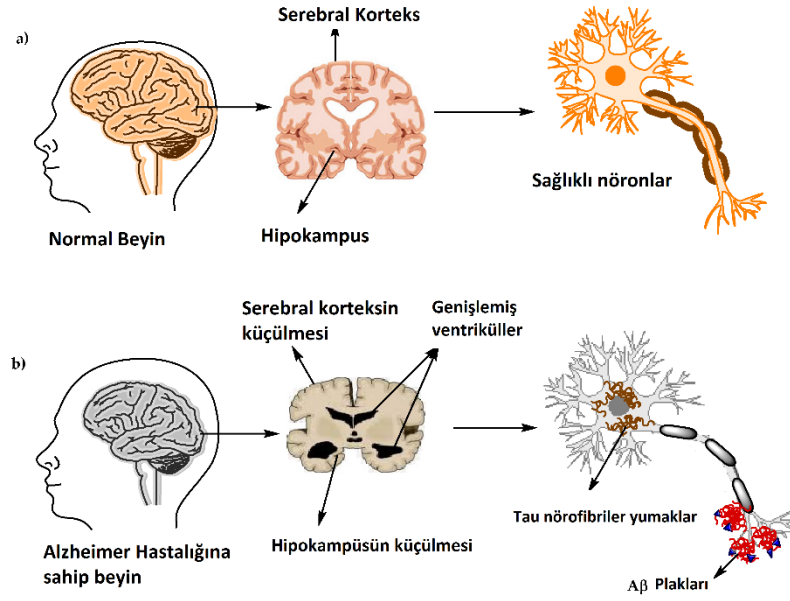
Amiloid plaklar (nöritik plaklar, amiloid beta plakları veya senil plaklar olarak da bilinir), esas olarak beyin gri maddesinde bulunan farklı morfolojik formlara sahip amiloid beta ($A\beta$) proteininin hücre dışı birikintileridir (Cras et al.,1991; Purves et al., 2012; Walker, 2020). Amiloid plaklardaki anormal nöritler kıvrımlı, sıklıkla şişmiş aksonlar ve dendritlerden (Şekil 2.2) oluşur (Hyman et al., 1995).



Şekil 2.2. Amiloid plakları (kahverengi) gösteren amiloid beta immün boyama

Kaynak: URL-1

$A\beta$ yanlış katlandığında ve oligomerler ve daha uzun polimerler halinde biriktiğinde plaklar oluşur (Röhr et al., 2020). Alzheimer hastalığının karakteristik özelliklerinden biri yaşlanmanın bir sonucu olarak beyinde bu şekilde çok sayıda plak ve nörofibriler yumakların (Şekil 2.3) oluşmasıdır (Ballard et al., 2011).



Şekil 2.3. (a) Sağlıklı ve (b) Alzheimer hastalığı'na (AH) sahip bireylerin beyin fizyolojik yapısı ve nöronları

Kaynak: Breijyeh, Z. and Karaman, R., (2020)'den uyarlanmıştır.

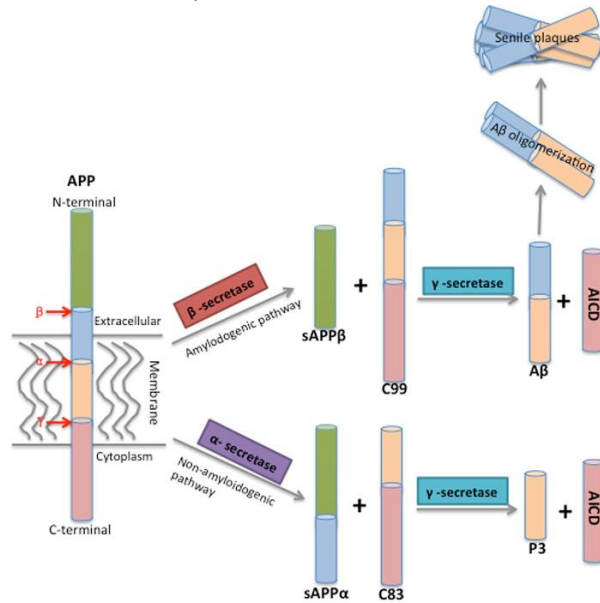
A β şimdiye kadar incelenen tüm omurgalılarda bulunmakla birlikte moleküler dizisi yüksek derecede korunmuş bir proteindir. Bu özellikler A β 'nin beyin için faydalı olan işlevlerin kanıtlarıyla desteklenmiştir. A β 'nin vücudu enfeksiyonlardan korumak, kan-beyin bariyerindeki sızıntıları onarmak, yaralanma sonucu iyileşmeyi desteklemek ve sinaptik işlevi düzenlemek gibi birçok görevi vardır. A β 'nin hücrel üretiminin fizyolojik bir tehdide yanıt olarak hızla arttığını ve genellikle iyileşme üzerine azaldığını gösteren *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar mevcuttur (Brothers et al., 2018).

2.2.2.1. Hücrelerde Amiloid Beta Üretimi

Amiloid beta (A β), A β -öncü protein (APP) adındaki daha uzun bir ana proteinin işlenmesi ile salınan, çoğunlukla 40 veya 42 amino asit uzunluğunda (Gu and Guo, 2013) küçük bir proteindir (Selkoe, 1999). APP vücuttaki birçok hücre tipi tarafından üretilmekle birlikte özellikle nöronlarda bol miktarda bulunur (Haass et al., 2012).

β -amiloid öncü proteininden (APP) β - ve γ -sekretaz enzim aktiviteleri tarafından sıralı bölünmeler yoluyla 38 ila 43 amino asitli bir peptit olan A β üretilir (Fahrenholz et al., 2000; Asai et al., 2003; Tanabe et al., 2007). APP'nin A β segmentinin bir kısmı zarın içinde bir kısmı da zarın dışındadır (Haass et al., 2012).

Başka bir APP işleme enzimi olan α -sekretaz için kesim bölgesi, A β dizisi içinde yer alır ve bu nedenle A β oluşumu engellenir. α veya β -sekretaz yoluyla üretilen amino terminal fragmanı, sırasıyla çözünür APP (Soluble APP-sAPP) α veya β olarak adlandırılır. α ve β -sekretaz tarafından üretilen karboksiterminal fragmanları (CTF) sırasıyla CTF83 ve CTF99 olarak adlandırılır. CTF83 ve CTF99'un γ -Secretase ile bölünmesi, sırasıyla p3 ve A β 'nin oluşması ile birlikte AICD (amino-terminal APP intracellular domain) üretilmesine (Şekil 2.4) neden olur (Fahrenholz et al., 2000; Asai et al., 2003; Tanabe et al., 2007).



Şekil 2.4. Amiloid öncü proteininin (APP) proteolitik işlenmesi ve A β biyogenezi

Kaynak: Sun, X., (2015)

APP'nin hücre içi alanı olarak AICD'nin önemli bir işlevi, APP'nin, hücre içi trafiğini ve/veya sinyal iletim işlevini düzenleyen çeşitli sitozolik faktörlerle etkileşimini kolaylaştırmak ve BACE1, p53, EGFR gibi bir çok genin ekspresyonunu düzenlemek üzere bir transkripsiyon faktörü gibi çalışmaktadır. Bu nedenle, APP metabolizmasını ve işlenme sürecini anlamak AH terapötikleri için önem taşır (Tamayev et al., 2009). Normal fizyolojik koşullarda çözünür bir formda bulunan A β , beyin hücre dışı boşluğuna salgılandıktan sonra beyin omurilik sıvısı (BOS) ve vasküler sistem tarafından temizlenir (Ida et al., 1996; Mo et al., 2015).

Fakat yapılan çalışmalarda A β 'nın oligomerleşerek plaklar halinde kümelenip çözünmeyen formlar oluşturduğunda beyin hücreleri için toksik olduğu gösterilmiştir. Buna istinaden A β , AH'da "toksik bir fonksiyon kazancı" sergilediği için terapötik müdahale açısından mantıklı hedef haline geldiği düşüncesi artarak devam etmektedir (Masters and Selkoe, 2012).

2.3. Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler

AH'nin etiyolojisi net olmamakla birlikte bir kişinin AH geliştirme riskini belirlemede genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan ikiz ve aile çalışmaları AH'nin genetik temelli bir hastalık olduğunu doğrulamaktadır. Yapılan çalışmalar ile AH ile ilişkili APP ve PSEN gibi genlerdeki baskın mutasyonlar ve diğer genlerle olan etkileşimler önem kazanmaktadır (Khanahmadi, 2015).

2.3.1. APP (Amyloid-beta precursor protein)

AH'da meydana gelen β -amiloidden (A β) oluşan hücre dışı nöritik plaklar, β -amiloid öncü proteininin (APP) proteolitik işlenmesiyle üretilir (Tcw and Goate., 2017). Amiloid-beta öncü proteini (APP), birçok dokuda eksprese edilen ve nöronların sinapslarında yoğunlaşan bir integral membran proteinidir. Bir hücre yüzeyi reseptörü olarak işlev görmesiyle birlikte (Deyts et al., 2016) antimikrobiyal aktivitenin (Moir et al., 2018) ve demir çıkışının düzenleyicisi olarak görev yapar (Duce et al., 2010).

İnsanlarda 21. Kromozom üzerinde bulunur ve kromozomal anomalilerinden kaynaklanan yüksek APP ekspresyonu, artmış A β birikimine ve karakteristik AH nöropatolojisine yol açar. APP genindeki mutasyonlar, AH vakalarının bir kısmını açıklasa da, APP'nin duplikasyonu ve yanlış anlamlı mutasyonlar dahil olmak üzere bu mutasyonlar A β oluşumunu doğrudan etkileyerek AH patolojisinde önemli bir yer tutar (Tcw and Goate., 2017).

2.3.2. BACE 1 (Beta-secretase 1)

APP işleme mekanizmasında görev alan beyindeki majör β -sekretaz BACE1 (Vassar et al., 1999) periferik sinir hücrelerinde miyelin kılıflarının oluşumunda önemli olan bir aspartik asit proteazıdır (Willem et al., 2006).

Kromozom 11'de bulunan ve 501 amino asitlik bir proteini kodlayan BACE1'in (Webb and Murphy, 2012) AH'da terapötik bir hedef olup olamayacağı bir dizi çalışma ile araştırılmıştır. BACE1 nakavt farelerin (BACE1 genine sahip olmayan fareler) hiçbir β -sekretaz aktivitesi göstermediği ve bu nedenle vahşi tip kontrollere kıyasla beyinde $A\beta$ ($A\beta 40$ ve $A\beta 42$) üretiminin neredeyse tamamen ortadan kaldırıldığı görülmüştür (Laird et al., 2005).

Ayrıca çeşitli çalışmalarla, BACE1 proteini ve aktivite seviyelerinin, AH'dan etkilenen beyin bölgelerinde yükseldiği gösterilmiştir (Yang et al., 2003; Johnston et al., 2005). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, BACE1'in AH için iyi bir terapötik hedef olduğu anlaşılmaktadır.

BACE1, $A\beta$ oluşumundaki vazgeçilmez rolü ile birlikte, BACE1 ayrıca bir housekeeping enzimi olarak işlev görür ve nöronal dokunun düzgün işleyişinden sorumlu olan diğer birçok proteinin işlenmesinde görev alır. Bu nedenle, BACE1 proteininin enzimatik aktivitesini tamamen ortadan kaldırmak istenmeyen yan etkilere neden olabilir (Das and Yan, 2017).

Teorik olarak bu enzimi bloke eden ilaçlar (BACE inhibitörleri) beta-amiloid oluşumunu önleyebilir (amiloid hipotezine göre) ve Alzheimer hastalığını yavaşlatmaya veya durdurmaya yardımcı olabilir.

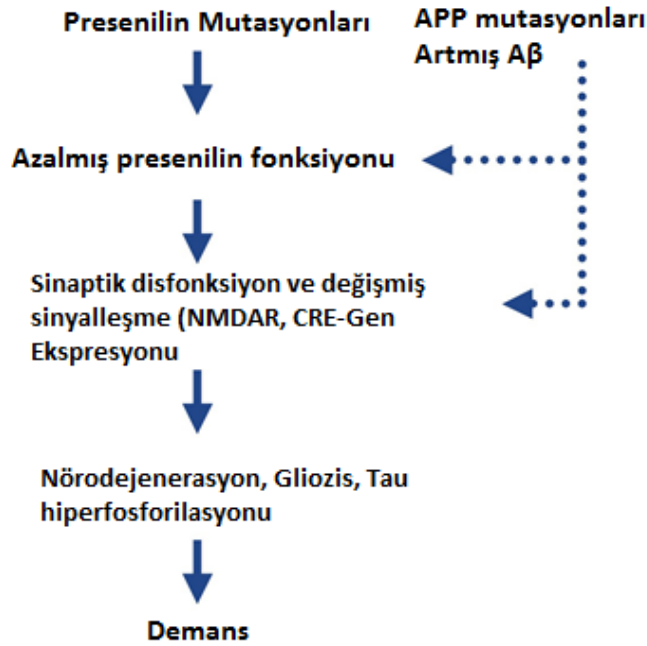
2.3.3. PSEN1 (Presenilin-1)

Presenilin-1 (PSEN-1), insanlarda 14. Kromozomda bulunan (Saunders., 2001) PSEN1 geni tarafından kodlanan bir presenilin proteinidir (Schellenberg et al., 1992).

Presenilin-1, amiloid-beta öncü proteininden (APP) amiloid beta ($A\beta$) oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülen gama (γ) sekretaz kompleksindeki dört çekirdek proteinden biridir (Wolfe, 2008).

PSEN1, özellikle amiloid öncü proteini (APP) ve Notch dahil olmak üzere birçok tip 1 transmembran proteinini parçalayan bir intramembranöz proteaz olan γ -sekretazın katalitik alt birimi olarak işlev görür. Bu özelliğinden dolayı Presenilin-1'i kodlayan PSEN1 geninde meydana gelen mutasyonlar, ailesel Alzheimer hastalığının (FAD) en yaygın nedenidir.. β -sekretaz ile önceki bölünmenin ardından, APP'nin γ -sekretaz tarafından işlenmesi, değişen uzunluklarda β -amiloid ($A\beta$) peptitlerinin üretilmesiyle sonuçlanır (Kelleher and Shen, 2017).

Presenilin hipotezine (şekil 2.5) göre meydana gelen demans tablosu, PSEN'lerin yetişkin serebral kortekste seçici olarak inaktive edildiği koşullu nakavt farelerle ilgili çalışmalarla desteklenmiştir (Saura et al., 2004). Bu fareler, sinaptik kayıp, nöronal hücre ölümü, ve tau hiperfosforilasyonu dahil olmak üzere AH nöropatolojisinin ayırt edici özellikleri ile karakterize edilen yaşa bağlı, progresif nörodejenerasyon geliştirmiştir. Bu koşullu mutant farelerde, PSEN ifadesinin etkisizleştirilmesi ile nörodejenerasyon belirgin hale gelmiştir.



Şekil 2.5. Presenilin hipotezi

Kaynak: Shen, J. and Kelleher, R., (2007)'den uyarlanmıştır.

Aβ42 üretimi, PSEN ve γ-sekretaz aktivitesinin kısmi kaybıyla arttığından, Aβ42 aracılı inhibisyon, PSEN fonksiyonunun giderek daha fazla bozulmasına yol açan bir kısır döngü yaratabilir (Shen and Kelleher, 2007).

2.3.4. GSAP (Gama Sekretaz Aktive Edici Protein)

Gama Sekretaz (γ-Secretase) aktive edici protein (GSAP), γ-sekretaz aktivitesinin ve özgüllüğünün düzenlenmesinde, amiloid öncü protein (APP) bölünmesi sırasında seçici şekilde modülasyon sağlayarak önemli bir rol oynar. GSAP seviyesinin devamlı olarak düşmesi, hücrelerde amiloid-β (Aβ) oluşumunu azaltır (He et al., 2010; Hussain et al., 2013; Wong et al., 2019).

Yapılan çalışmalarda GSAP'nin genetik yıkımı veya farmakolojik inhibisyonunun, AH fare modellerinde amiloid plak birikimini ve tau fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (He et al., 2010; Chu et al., 2014; Chu et al., 2015).

AH fare modellerinde gözlemlenen artmış GSAP seviyelerine ek olarak (Chu et al., 2015), bazı çalışmalarda Alzheimer hastalarının ölüm sonrası beyinlerinde GSAP düzeylerinin önemli ölçüde arttığını gösterilmiştir (Satoh et al., 2012; Chu et al., 2015; Perez et al., 2017). Yapılan çalışmalarda GSAP lokusundaki ve promotor bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) de tanımlanmış ve artan AH riski ile ilişkili olan yüksek GSAP ekspresyonu ile ilişkili bir allel içerdiği gösterilmiştir (Floudas et al., 2014; Zhu et al., 2014). Bu çalışmalar ışığında GSAP'ın AH'da γ -sekretaz aktivitesini ve APP işlenmesini aktive etmedeki rolü dışında, GSAP'a bağlı diğer biyolojik yollar hakkında çok az şey bilinmektedir. Dolayısıyla GSAP, AH tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olmaktadır (He et al., 2010).

2.3.5. BDNF (Beyin Türevli Nörotrofik Faktör)

Beyin türevli nörotrofik faktörler (BDNF'ler), 11. Kromozomda bulunan (Cattaneo et al., 2016), fizyolojik koşullarda öğrenme ve hafızada sinaptik plastisitenin korunmasında, nöronal gelişim ve hayatta kalmada önemli bir rol oynayan büyüme faktörüdür. BDNF seviyesinin düşmesi A β birikimi, tau fosforilasyonu, nöroinflamasyon ve nöronal apoptoz ile bağlantılı olduğu için BDNF, nörodejenerasyonun ilerlemesini yavaşlatabilir ve AH müdahalesi için umut verici bir strateji olarak hizmet edebilir. Artan kanıtlar, BDNF sinyalinin, AH'da A β birikiminin aşağı akış yolağını modüle etmede kritik bir rol oynadığını da göstermektedir. Hastalık ilerledikçe, Alzheimer hastalarının beyin (Peng et al., 2005), kan (Ng et al., 2019) ve beyin omurilik sıvısındaki (Forlenza et al., 2015) BDNF seviyelerinde azalma görülür. Bu yüzden BDNF, AH için potansiyel bir tanısal biyobelirteç ve terapötik bir molekül olarak ilgi çekmektedir (Gao et al., 2022).

2.4. Alzheimer Hastalığının Teşhisi

Hastanın şikayeteri ve tıbbi öyküsüne istinaden AH olduğundan şüphelenilen bir hasta için nörolojik muayene, nöronlar için manyetik rezonans görüntüleme (MRI), B12 vitamini gibi laboratuvar incelemeleri ve diğer testler yapılır (Schachter and Davis, 2000).

Alzheimer hastalığının kesin tanısı için ölüm sonrası beyin dokusunun değerlendirilmesi gerekir ancak beyin omurilik sıvısı (BOS) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) biyobelirteçleri birkaç klinik kriterle birleştğinde canlı hastalarda tanı konulmasına yardımcı olabilir (Budson and Solomon, 2012).

İnvaziv olmayan tanısal görüntülemelerin gelişmesiyle son zamanlarda AH'da tanısal doğruluğu artıran bir test ortaya çıktı (Clark et al., 2012). Hastalara radyoaktif olarak işaretlenmiş bir ajanın enjeksiyonundan sonra, plaklarda biriken amiloid- β ($A\beta$) peptitlerin görüntülenmesini sağlayan özel bir PET taraması yapılır. 2012'de bu yöntem kullanılarak %96'ya varan duyarlılık ve %100 özgüllükle AH doğru bir şekilde teşhis edilebilmiştir. Bu sonuçlar daha sonra otopsi ile kanıtlanmıştır (Saint-Aubert et al., 2013).

2.5. Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Risk Faktörleri

AH, artan yaş, kafa travmaları, damar hastalıkları, enfeksiyonlar, genetik ve çevresel faktörler (ağır metaller, eser metaller ve diğerleri) gibi birkaç risk faktörü ile ilişkili bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen Alzheimer hastalığındaki patolojik değişikliklerin ($A\beta$, NFT'ler ve sinaptik kayıp) altında yatan neden hala bilinmemektedir (Breijyeh and Karaman, 2020).

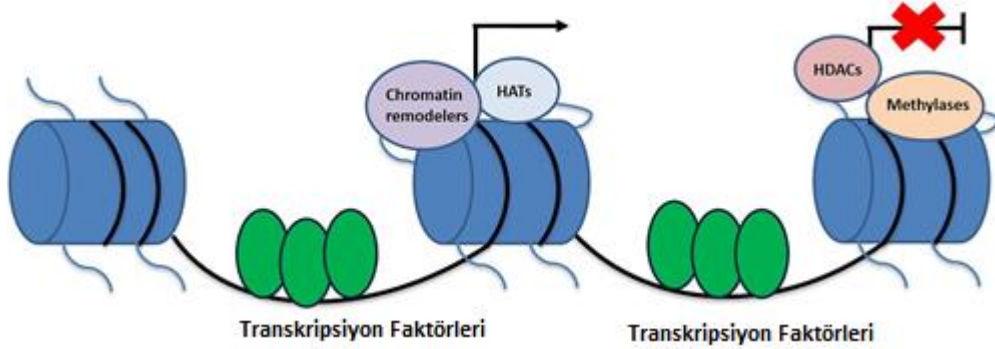
AH'nın nedeni olarak birkaç hipotez önerilmiş ancak kolinerjik fonksiyondaki bir bozukluğun AH için kritik bir risk faktörü olduğu görüşü ile amiloid β -protein üretimindeki değişiklik ve işleme sürecinin ana başlatıcı faktör olduğu görüşü iki ana neden olarak kabul ediliyor (Anand and Singh, 2013; Armstrong, 2019).

2.6. Alzheimer Hastalığında Epigenetik Modifikasyonlar

AH, semptomları iyi bilinmesine rağmen, patogenezi bilinmeyen ve karmaşık patolojik belirtileri olan nörodejeneratif bir hastalıktır (Gao et al., 2022).

Bu sebeple şu anda AH'nı tedavi etmek için bilinen bir tedavi yoktur. Bununla birlikte son bulgular, epigenetik modifikasyonların gen ekspresyonunun düzenlenme sürecinde en temel etken olduğunu göstermektedir (Kosik et al., 2012). Böylelikle epigenetiğin AH'da büyük bir rol oynayabileceği görülüyor. Bu nedenle, AH'daki epigenetik modifikasyonların bozukluklarını daha iyi anlayarak hastalığı tedavi etmek için potansiyel yeni tedaviler tasarlanabileceği düşünülmektedir.

Epigenetik, gerçek DNA sekansındaki değişikliklerden kaynaklanmayan fakat kromatinin modifikasyonu sonucu meydana gelen fenotipik değişikliklerin incelenmesi olarak tanımlanır (Dupont et al., 2009). Epigenetiği anlamak için DNA'nın hücre çekirdeği içinde nasıl paketlenildiğini bilmek gerekir. Ökaryotik bir organizmanın genomu, çekirdek içinde depolanması gereken çok fazla genetik bilgi içerdiği için (Kornberg, 1974; Peterson and Laniel, 2004) bu uzun DNA moleküllerinin boyutu oldukça geniştir ve hücre çekirdeğine sığabilmeleri için sıralı yapılar halinde paketlenmeleri gerekir. Bunun için DNA, nükleozom adı verilen yapısal birimi oluşturan histon proteinlerinin etrafına sarılır (Cairns, 2009). Histon proteinlerinin belirli bölgeleri (Şekil 2.6) gen ekspresyonu ve regülasyonu için son derece önemlidir (Clapier and Cairns, 2009).



Şekil 2.6. Genlerin aktivasyonuna ve deaktivasyonuna katkıda bulunan histon bağlantıları ve epigenetik değişkenler.

Kaynak: Esposito, M. and Sherr, G. L., (2019)'dan uyarlanmıştır.

2.6.1. Asetilasyon ve Deasetilasyon

Histon asetilazlar (HAT), histon kuyruklarının lizin kalıntıları üzerinde asetilasyon gerçekleştirerek histon kuyruklarını nötralize eden ve histon proteinlerini kovalent olarak modifiye eden enzimlerdir (Marmorstein, 2001; Roth et al., 2001).

Asetilasyon, genellikle transkripsiyonel aktivasyon ile sonuçlanan bir histon modifikasyonudur. Histon deasetilazlar veya HDAC'ler ise lizin kalıntılarını deasetilleyerek histon proteinlerini kovalent olarak değiştiren başka bir enzim grubudur. Bu nedenle, histon kuyruklarını doğrudan yüklü durumlarına geri döndürdüklerinden, kromatin yoğunlaşması ve dolayısıyla gen baskılanması ile ilişkilidirler (Pazin ve Kadonaga, 1997).

2.6.2. DNA ve Histon Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA yapısına metil gruplarının eklendiği epigenetik bir değişimdir. Metilasyon hem sitozin hem de adenin bazlarında meydana gelebilir (Esposito and Sherr, 2019). Sitozin metilasyonu, CpG dinükleotitleri denilen DNA sarmalında guanin bazlarından hemen önce gelen sitozin bazlarına, metil gruplarının eklenmesini içerir (Bird, 1986). Son araştırmalar, uzun süreli bellekte DNA metilasyonunun önemine değinerek AH ile potansiyel ilişkisinin çok önemli olduğunu göstermiştir (Miller and Sweatt, 2007; Day and Sweatt, 2010).

Histon metiltransferazlar veya HMT'ler, hem gen aktivasyonu hem de baskılaması ile ilişkilendirilen H3 ve H4 histonlarının histon kuyrukları üzerindeki lizin veya arginin kalıntılarını metilleyen enzimlerdir. HMT'ler metilledikleri kalıntılara göre 2 aile olarak kategorize edilirler: Birinci grup, histon lizin metiltransferazlar, ikinci grup, argininin metillenmesinden sorumlu olan protein arginin metiltransferazlardan oluşur (Wood and Shilatifard, 2004). Histon lizin metiltransferazlar (KMT'ler), S' adenosilmetiyoninin metil grubunu histon kuyruklarında ve çekirdek histonlarındaki lizinin amino grubuna transferini katalize eden enzimlerdir. Alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyele sahip spesifik inhibitörleri tasarlayabilmek için KMT katalizinin kimyasal temelini anlamak önemlidir (Al Temimi et al., 2019).

En çok çalışılan histon modifikasyonlarından ikisi, gen ekspresyonu ile ilişkili histon 3'ün 4. pozisyonundaki lizinin tri-metilasyonu (H3K4me3) ile (Santos-Rosa et al., 2002) baskılama ile ilişkili histon 3'ün 27 pozisyonlarındaki lizinin tri-metilasyonu (H3K27me3)'dur (Ferrari et al., 2014).

Genlerin birinci eksonu olan promotor metilasyonları çoğunlukla gen susturulmasına yol açarak gen ekspresyonu ile ters orantılı olurken (Brenet et al., 2011) genin birinci ekzonu geçen bölgesi olarak kabul edilen gen gövdesinde meydana gelen metilasyonlar, farklı hücre tiplerinde değişiklik göstermekle birlikte transkripsiyon ile pozitif ilişkili olabilir (Moore et al., 2013).

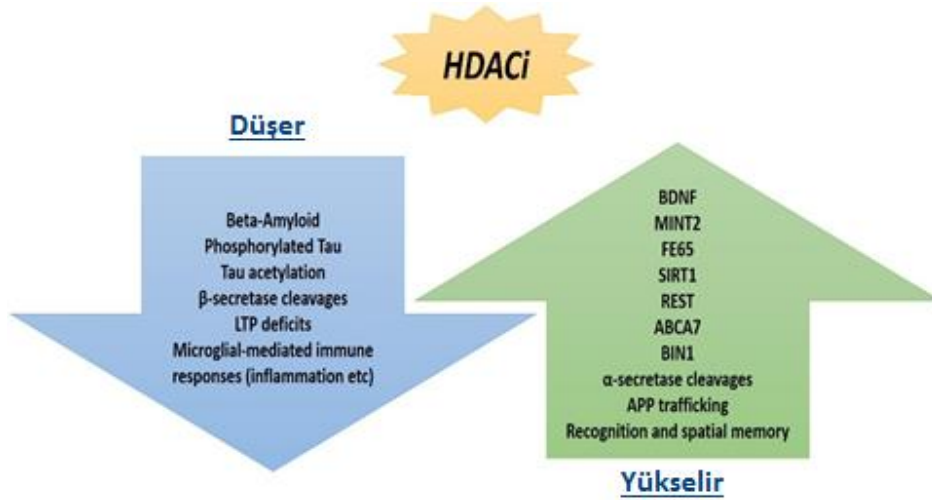
Histonları kovalent olarak değiştiren yukarıdaki üç epigenetik mekanizma haricinde kromatin yeniden modelleme kompleksleri, tamamen kendilerine ait bir kategoriye ait olan enzimlerdir.

Bu enzim kompleksleri, nükleozomu yeniden konumlandırmak ve DNA ile histon proteinleri arasındaki bağlantıları modifiye ederek kromatin yapısının dinamiklerini değiştirmek için ATP'yi kullanır (Tsukiyama et al., 1999) ve bu süreç, nükleozom kayması, nükleozomun yeniden konumlandırılması gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilir (Fazzio and Tsukiyama, 2003; Mohrmann and Verrijzer, 2005; Cairns, 2007; 2009; Clapier and Cairns, 2009).

Bilinen tüm epigenetik düzenleme mekanizmalarından en kapsamlı olarak incelenen ve en iyi anlaşılan mekanizma DNA metilasyonudur (Anderson et al., 2012). AH'da BDNF gibi gelişimsel genlerin hipermetilasyonu gözlenirken (Esposito and Sherr, 2019) amiloid plaklarının daha yüksek seviyelere ulaşması ve nöropatolojiye neden olan APP'nin hipometilasyonu da gözlenir (Gasparoni et al., 2018).

2.7. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Umut Verici Epigenetik Terapötikler

Son on yılda, nörolojik hastalıkların tedavisi için tasarlanan en umut verici epigenetik ilaçlar (şekil 2.7) HDAC inhibitörleri (HDACi) ve Histon/DNA-demetilasyon ajanlarıdır (Bufill et al., 2020).



Şekil 2.7. AH fare modellerinde gözlemlenen HDAC inhibitörü tedavilerinin umut verici yararlı sonuçları

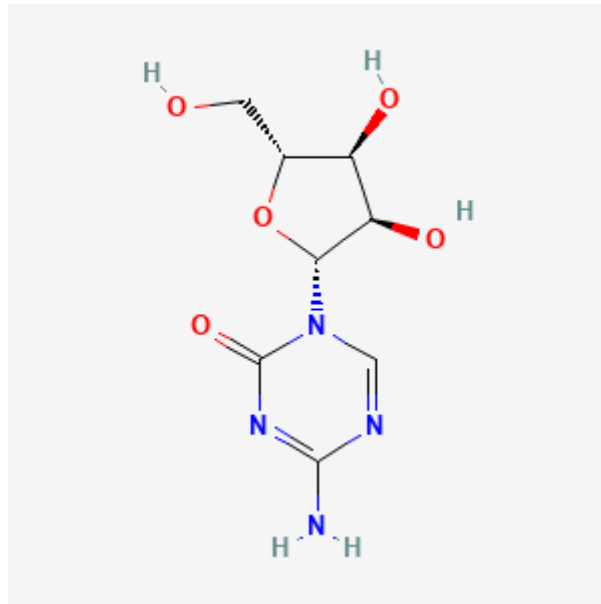
Kaynak: Esposito, M. and Sherr G. L., (2019)'dan uyarlanmıştır.

2.7.1. Azacitidine (AZA)

Azasitidin, düşük dozlarda, DNA metiltransferazı inhibe ederek, DNA'nın hipometilasyonuna neden olan (Müller and Florek, 2010) DNA ve RNA'da bulunan nükleosid sitidinin kimyasal bir analogudur (Şekil 2.8).

5-aza-2'-deoksisitidin bir deoksiribonükleosit olduğundan yalnızca DNA'ya dahil olabilir. Bu özelliği ile DNA sentezini önleyen ve ardından sitotoksositeye yol açan DNA metiltransferazlar tarafından substrat olarak tanınır ve kovalent bağlanma gerçekleşir. Bunun sonucunda DNA metiltransferaz fonksiyonu bloke olur. Kovalent protein eklentisi ayrıca DNA'nın işlevselliğini bozarak DNA hasar sinyalini tetikler ve DNA metiltransferazlarının bozunmasına neden olur.

Sonuç olarak, DNA replikasyonu sırasında metilasyon işaretleri kaybolur (Stresemann and Lyko, 2008; Navada et al., 2014).



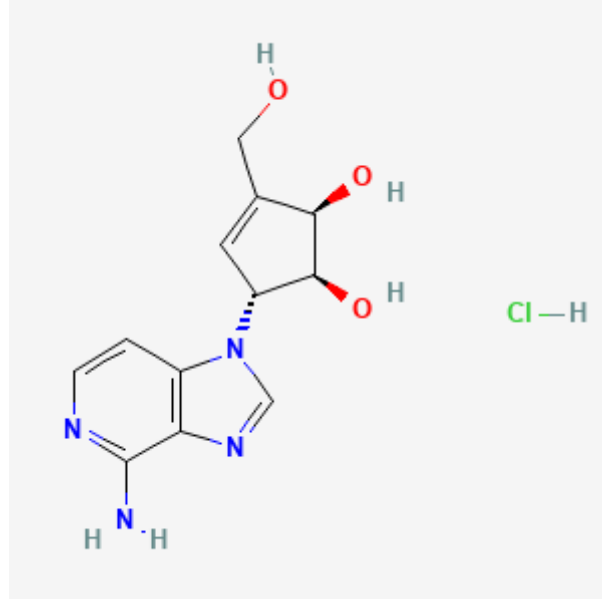
Şekil 2.8. Azacitidine Molekül Yapısı

Kaynak: URL-2

Bu özelliklerinden dolayı AH risk genlerinin metilasyonunu modüle edebilen Azacitidine gibi DNA Metil Transferaz (DNMT) inhibitörleri, DNA metilasyonunu değiştirebilir, böylece göçü ve farklılaşmayı bozabilir (Singh et al., 2009).

2.7.2. Deazaneplanocin A (DZNep)

3-Deazaneplanocin A (DZNep, C-c3Ado), hem bir S-adenosilhomosistein hidrolaz inhibitörü (Fiskus et al., 2009) hem de bir lizin metiltransferaz inhibitörü olarak işlev gören bir kimyasaldır (Şekil 2.9). DZNep'in hedeflerinden biri metiltransferaz EZH2 (KMT6)'dır (Gray, 2012).



Şekil 2.9. Deazaneplanocin A (DZNep) Molekül Yapısı

Kaynak: URL-3

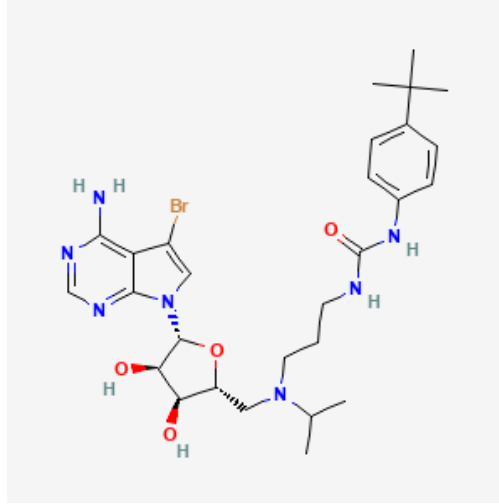
Yapılan çalışmalarda 3-deazaneplanocin A'nın (DZNep), kanser hücrelerinde susturulmuş genleri yeniden aktive etmenin yanı sıra, histon H3 üzerindeki lizin 27'nin (H3K27me3) ve histon H4 üzerindeki lizin 20'nin trimetilasyonunu (H4K20me3) seçici olarak inhibe ettiği bildirildi. Bu bulgu, histon metilasyonunun farmakolojik inhibisyonuna kapı açması sebebiyle DZNep'in etki mekanizması kanser ve AH gibi hastalık süreçlerinde araştırılmaya devam etmektedir (Miranda et. al., 2009).

Karaciğer hastalıklarıyla ilgili epigenetik çalışmalar da ilaç geliştirme üzerinde bazı önemli etkiler ortaya koymuştur (Mann, 2014). Örneğin, DNMT1 inhibitörü 5-azadeoksisitidin (5-AzaC) ve EZH2 inhibitörü 3-deazaneplanocin A (dZNep), hepatit stellat hücre (HSC) aktivasyonunu inhibe eden güçlü moleküllerdir (Mann et al., 2010).

2.7.3. SGC 0946

Histon metiltransferaz inhibitörlerinden SGC 0946 (Cacabelos and Torrellas, 2015) histon metiltransferazlar/HMT'lar için güçlü seçici özellik göstererek histon H3K79 metiltransferaz DOT1L'yi *in-vitro* inhibe eder (Şekil 2.10).

Birçok ökaryotik genomda korunmuş bir epigenetik işaret olan metile edilmiş H3K79 (Histon 3 Lizin 79), yaşlanma süreci boyunca aşamalı olarak artar, bu da DOT1L'nin yaşamsal bir saat olarak işlev görebileceğini düşündürür (Soria-Valles et. al., 2015). Protein metiltransferazların bu seçici inhibisyonu, Alzheimer gibi yaşlanma ile ortaya çıkan hastalıklar için ilaç keşfi adına yapılan çalışmalarda umut verici yeni bir yaklaşımdır (Yu et al., 2012).



Şekil 2.10. SGC 0946 Molekül Yapısı

Kaynak: URL-4

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan tez çalışması Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Tez çalışması için kullanılan sarf malzemelerin tamamı steril tek kullanımlık, malzemeler olup, işlemler steril laminar akış kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Çalışmada kullanılan SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kimyasal Malzemeler

Kimyasallar	Marka	Yöntem
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Kat# 31885-023	Hücre kültürü
Penicilin-Streptomisin	Thermo Fisher Scientific Kat# 15140122	Hücre kültürü
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Kat# 16000044	Hücre kültürü
Phosphate-buffered saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Kat# 70013065	Hücre kültürü
Trypsin	Thermo Fisher Scientific Kat# 25300062	Hücre kültürü

Tablo 3.1. (Devam) Kimyasallar

5-Azacytidine	Tocris Kat# 3842	Kimyasal Uygulaması
3-Deazaneplanocin A hydrochloride	Tocris Kat# 4703	Kimyasal Uygulaması
Ethanol (Molecular Biology Grade $\geq 99,8$)	Sigma-Aldrich Kat# 51976	RNA izolasyonu
Oligonükleotit (Primerler)	Sentromer DNA Teknolojileri	Gerçek-Zamanlı PZR
MTT	Thermo Fisher Scientific Kat# M6494	Canlılık Testi
Absolute Ethanol	Tekkim Kat # TK.200650	Genel
Nükleaz free su	Sigma Aldrich Kat# W4502	RNA izolasyonu
Non-essential amoniacid (NEAA)	Thermo Fisher Scientific Kat# 11140050	Hücre Kültürü
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Kat# D2650-100ML	Hücre kültürü
Aβ42 Protein	Sigma-Aldrich Kat# A9810-1MG	Hücre kültürü
SGC 0946	Tocris Kat# 4541	Kimyasal Uygulaması

3.1.3. Cihazlar

Araştırma sırasında çalışmaların yapıldığı cihazlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Cihazlar

Cihazlar	Firma	İşlem
Laminar Akışlı Kabin	Faster SafeFast Classic	Hücre Kültürü
Tek ve çok kanallı mikropipetler	Thermo Fisher Scientific Finnpipette™ F2	Hücre Kültürü
S1 Pipetör	Thermo Fisher Scientific	Hücre Kültürü
SafeVac Vacuum Aspirator	SCIOGEX	Hücre Kültürü
CO ₂ İnkübaktörü	Memmert	Hücre Kültürü
Su banyosu	Memmert	Hücre Kültürü
AXIO invert Vert.A1 mikroskop	Zeiss	Hücre Kültürü
CK40 ışık mikroskobu	Olimpus	Hücre Kültürü
-80°C Dondurucu	Hoover	Genel
Distile Su Cihazı	Thermo Fisher Scientific	Genel
Real-Time PCR	BioRad CFX Connect™	PZR reaksiyonları
Minisipin	Thermo Fisher Scientific	RNA izolasyonu
Vorteks	Heidolph Reax top	RNA izolasyonu
Mikroplaka Okuyucu	Thermo Fisher Scientific MultiSkan™ GO μDrop	RNA izolasyonu, ELISA ve MTT
Buz Cihazı	Scotsman	RNA izolasyonu
Otoklav (Dik Tip)	BES	Sterilizasyon
Thermal Cycler	Biorad	cDNA sentezi

3.1.4. Sarf Malzemeler

Çalışma sırasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Sarf Malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Kullanım Alanı
10 cm petri kabı	Corning Kat# 430167	Hücre Kültürü
Hücre kültürü plakaları (6 kuyucuklu)	Corning Kat# 3516	Hücre Kültürü
Hücre kültürü plakaları (96 kuyucuklu)	Corning Kat# 3596	Hücre Kültürü
Kriyotüp (2ml)	Corning Kat# 430659	Hücre Kültürü
Pastör pipet (Cam)	Marienfeld Kat# 3233049	Hücre Kültürü
Serolojik pipet (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning Kat# 4487,4488, 4489, 4490	Hücre Kültürü
Stericup vakum filtrasyon sistemi	Millipore Kat# S2HVVU02RE	Hücre Kültürü
Thoma lamı	Marienfeld Kat# 0640011	Hücre Kültürü
Yapıştırma Filmi	Thermo Kat# AB0558	PZR Reaksiyonları
PCR Strip Tüpleri	Axygen Kat# AB1191	PZR Reaksiyonları
10 µl Filtresiz Pipet ucu	Axygen Kat# TXL-10-R-S	Hücre Kültürü
200 µl Filtresiz Pipet ucu	Axygen Kat# T-200-Y-R-S	Hücre Kültürü
1000 µl Filtresiz Pipet ucu	Axygen Kat# T-1000-B-R-S	Hücre Kültürü
Mikrosantrifüj Tüpleri (1,5 ml)	Axygen Kat# MCT-150-C	Hücre Kültürü
Filtre (0,2 µm, 0,45µm)	Corning Kat# 431224, 431231	Hücre Kültürü
PCR tüpü (0.2ml)	Axygen Kat# PCR-02-C	Genel
Santrifüj Tüpleri (15ml, 50ml)	Corning Kat# 352096, 352070	Genel
Eldiven	Beybi	Genel

3.1.5. Kitler

Araştırma sırasında kullanılan kitler Tablo 3.4’te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Kullanılan Kitler

Kitler	Marka	İşlem
Quick RNA Miniprep	Zymoresearch Kat# R1055	RNA izolasyonu
cDNA Synthesis Kit	Bioline Kat# BIO-65054	cDNA sentezi
SensiFAST SYBR® No-ROX Kit	Bioline Kat# BIO-98020	Gerçek Zamanlı PZR
A β 42 Human ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific Kat# KHB3441	Protein ölçümü

3.1.6. Hücre Kültürü Ortamları

SH-SY5Y hücre kültürü çalışmaları %10 FBS, %1 NEAA ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyerinde (DMEM) gerçekleştirildi.

3.1.7. Oligonükleotidler (Primerler)

GZ-PZR ile ifade seviyelerinin referans gen (housekeeping gen) ile karşılaştırmalı ölçümlerini gerçekleştirmek için kullanılan genlerin primer dizileri Tablo 3.5’te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. GZ-PZR’da kullanılan genler ve baz dizileri

Oligo Adı	Baz Dizisi (5' -3')
B-Actin (Housekeeping gen)	İleri Primer: TGA AGT GTG ACG TGG ACA TC Geri Primer: GGA GGA GCA ATG ATC TTG AT
APP	İleri Primer: GGC CCT GGA GAA CTA CAT CA Geri Primer: AAT CAC ACG GAG GTG TGT CA
BACE 1	İleri Primer: TTG TCA CCT TGG ACA TGG AA Geri Primer: CAG GGA GAT GTC ATC AGC AA
BDNF	İleri Primer: GAC GGT CAC AGT CCT TGA A Geri Primer: GCC AGC CAA TTC TCT TTT TG
GSAP	İleri Primer: ACC TCT GCC TCC TGG TTT TC Geri Primer: GGA AGC CGC ACA ATG ATA CT
PSEN1	İleri Primer: GGT AAA GCC TCA GCA ACA GC Geri Primer: GAA AAC AAG CCC AAA GGT GA

3.2. Yöntem

Tez çalışması sırasında kullanılan yöntemler steril ve tek kullanımlık malzemeler ile birlikte laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı, daha önce tanımlanmış ve hücrelerin iyi çoğalma gösterdiği tamamlanmış besiyeri (low glucose ve pyruvate içeren DMEM) içerisinde; %5 CO₂, içeren 37°C’lik inkübatörde kültüre edildi. Tablo 3.6’da belirtilen oranlarda hazırlanıp 0,2 µm’lik filtreden geçirildikten sonra kullanılan ve hücrelerin büyümeleri için gerekli bileşenleri içeren tamamlanmış besiyeri hücrelerin kültüre edilmesinde kullanıldı.

Tablo 3.6. Besiyeri içine eklenen tamamlayıcı bileşenler

FBS	%10
NEAA	%1
Pen-Strep	%1

-80°C soğutucu dolapta kriyotüplerde bulunan SH-SY5Y hücreleri çıkarılıp 37°C'ye getirilmiş su banyosunda çözündürüldükten sonra hızlı bir şekilde daha önce hazırlanmış ve 37°C'de ısıtılmış besiyerinin bulunduğu 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine konuldu.

1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellete zarar vermeden süpernatant mikropipetle çekilerek uzaklaştırıldı ve pellet üzerine bir miktar taze tamamlanmış besiyeri konularak pelletin besiyeri içinde karıştırılarak homojen hale gelmesi sağlandı. Hücre ve besiyeri karışımı 10 cm'lik petri kaplarına aktarıldı ve ardından petri kabı içindeki karışım toplam 10 ml olacak şekilde besiyeri eklendi ve dairesel hareketlerle petri kabı içinde iyice karışım sağlandıktan sonra petri kabı mikroskopta kontrol edilerek etüve kaldırıldı.

İki günde bir çoğalım açısından kontrol edilen hücrelerin besiyerleri taze besiyeri ile değiştirildi ve hücreler kültür kabının tabanını yaklaşık %80 doluluk oranında kapladığında pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama için öncelikle, besiyeri aspirasyon işlemi ile uzaklaştırılan hücreler PBS ile yıkandı. Ardından, 10 cm kültür kabı için 2 ml olacak şekilde proteolitik bir enzim olan tripsin ile muamele edilen hücrelerin 3-5 dk. inkübatörde bekletilmesiyle kültür kabından ayrılması sağlandı. Hücrelerin petri tabanından ayrılıp ayrılmadığı mikroskopla kontrol edilip kalkmamış hücre var ise petri kabına hafifçe vurularak mekanik etkiyle yapışık kalan hücrelerin de ayrılması sağlandı. Ardından hücrelere tripsin ile aynı hacimde (2 ml) taze besiyeri eklenerek besiyeri içinde bulunan FBS sayesinde tripsin etkisi inhibe edildi. Hücrelerin uygun hacimde bir tüpe toplanmasından sonra, kullanılan kültür kaplarının yüzey alanlarına uygun miktarlarda yayılarak ekildi. Böylelikle pasaj işlemi tamamlanmış olan hücreler 37°C %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

Pasajlanan hücrelerin bir kısmının kültürü devam ettirilirken bir kısmı da sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Bu işlem için öncelikle Tablo 3.7'de gösterildiği şekilde dondurma besiyeri hazırlandı. Besiyeri hazırlanırken kullanılan bileşenler 50 ml'lik bir tüpe aktarılırken filtreden geçirildi.

Dondurma işlemi yapılacak hücreler 1.500 rpm'de 5 dak. santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Ardından pellet, hazırlanmış dondurma besiyeri ile çözündürülerek 2 ml'lik kriyotüplere alındı ve -80°C'ye kaldırıldı.

Tablo 3.7. Dondurma besiyeri bileşenleri

DMEM	%50
FBS	%40
DMSO	%10

3.2.2. A β 42 Proteinin Hazırlanması

Aminoasit sekansı tablo 3.8’de gösterilen, stok 1 mg olarak gelen ve moleküler ağırlığı 4.514,04 gr/mol olan A β (1-42) Protein Fragmenti, son konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde hesaplanarak ürün kitapçığında belirtildiği gibi DMSO ile çözüldü.

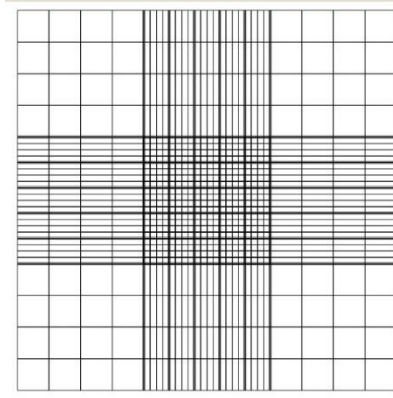
Hazırlanan A β 42 protein solüsyonu 10 μ l olacak şekilde alikotlanarak -20°C’lik derin dondurucuya kaldırıldı.

Tablo 3.8. A β 42 proteinin amino asit sekansı

Aβ42 amino asit sekansı	NH₂-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-COOH
---	--

3.2.3. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

SH-SY5Y hücreleri kültür kabının tabanını yaklaşık %70-%80 doluluk oranında kapladıktan sonra tripsin muamelesiyle kaldırılıp, 1:1 oranında besiyeri ile tripsin aktivitesi inhibe edildikten sonra elde edilen hücre süspansiyonundan 10 μ l alınarak şekil 3.1’de gösterilen Thoma Lamı üzerine konuldu ve ışık mikroskopunda sayım yapıldı. Sayım esnasında çeper yapısı bozulmuş ve ölmüş hücreler sayıma dahil edilmedi. Elde edilen hücre sayısı aşağıda belirtilen Thoma Lamı formülasyonuna göre ml’deki toplam hücre sayısı bulundu.



Şekil 3.1. Thoma lamininin sayım yapılan kareleri (toplam görüş sahası)

Kaynak: URL-5

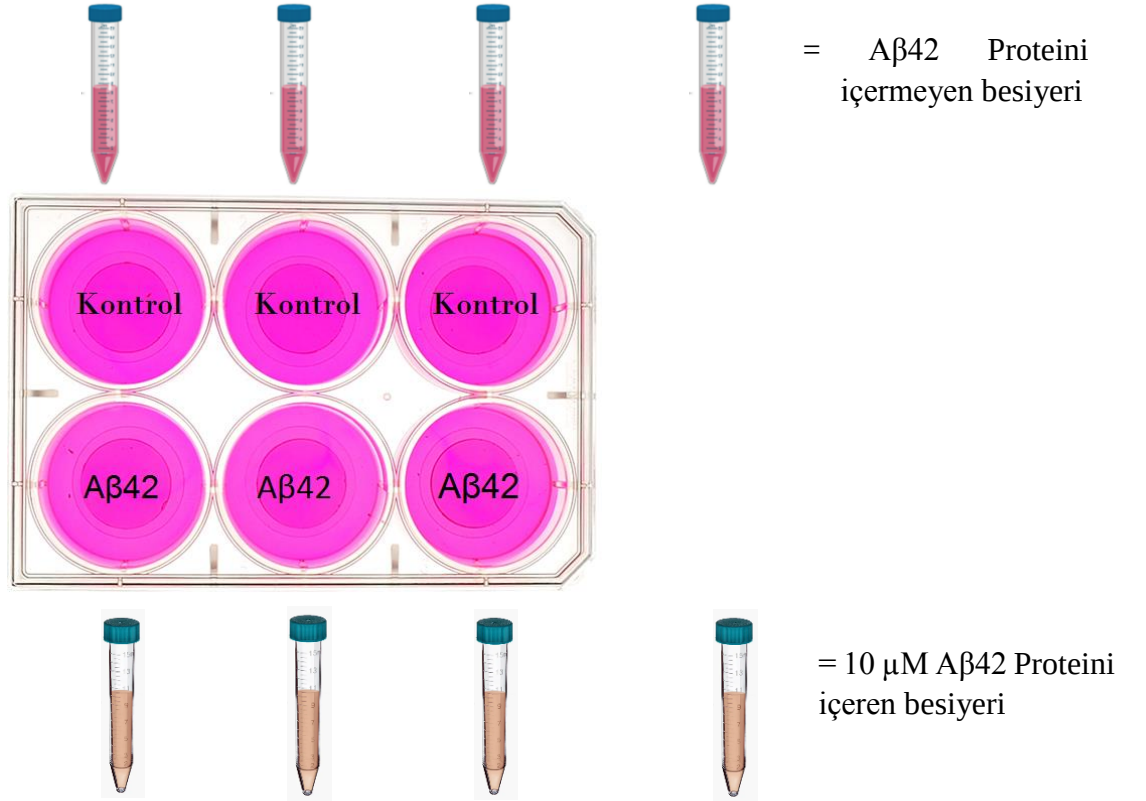
$$\frac{(\text{Hücre sayısı})}{\text{ml}} \cong (\text{Sayılan canlı hücre}) \times (\text{Dilüsyon faktörü}) \times 10^4 \times 2$$

3.2.4. Aβ42 Proteinin Uygulanması

6 kuyucuklu hücre kültür plağına ekimi yapılmak istenen SH-SY5Y hücreleri her kuyuda toplam 2 ml besiyeri içinde 100.000 olacak şekilde sayıldı ve plak yüzeyine oturmaları için 48 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Şekil 3.2’de gösterildiği düzende 3 kuyuya protein uygulaması 3 kuyu da kontrol (NT) olacak şekilde hücre plağı işaretlendi. Öncelikle kontrol hücreleri içeren kuyuların besiyerleri tamamlanmış ve Aβ42 proteini içermeyen taze besiyeri ile değiştirildi.

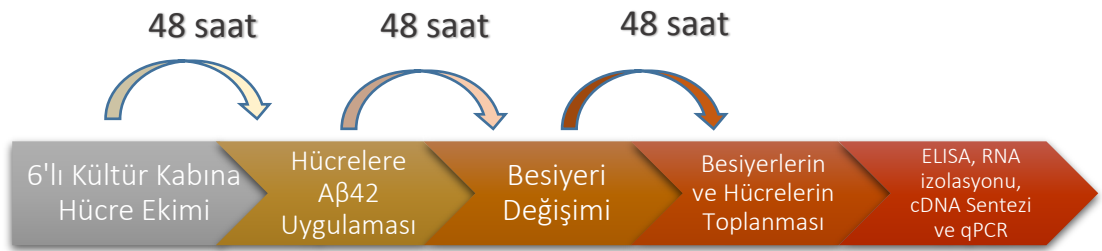
Aβ42 uygulanacak 3’er kuyuya, konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde Aβ42 proteini içeren tamamlanmış besiyeri konuldu. Bunun için 2,5 mM olarak hazırlanan stok solüsyonundan 10 µM kullanmak için 2 ml’lik besiyerine 8 µl Aβ42 proteini eklendi. Bu işlemin ardından hücreler yeniden 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda besiyeri içerisinde Aβ42 bulunan uygulama grubu olan kuyuların ve besiyeri içerisinde Aβ42 bulunmayan kontrol grubu olan kuyuların besiyerleri çekilerek taze tamamlanmış besiyeri konuldu. Taze besiyerinde 2 gün daha bekletilen hücrelerin besiyerleri daha sonra karşılaştırmalı Aβ42 protein seviyesi ölçümü için ELISA testi yapmak üzere 2 ml’lik tüplere toplanıp kısa süreli saklama için -20°C’lik dondurucuya konuldu.

Besiyerleri toplanan hücreler de gen ifadesi ölçümü için RNA izolasyonu yapılmak üzere PBS ile yıkandıktan sonra 500 µl tripsin ile muamele edildi. 3-5 dakika inkübatörde bekletildikten sonra kalkan hücelere 1:1 oranında besiyeri eklenerek 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre pelleti RNA izolasyonu için -80°C’lik dolaba kaldırıldı.



Şekil 3.2. SH-SY5Y hücrelerine Aβ42 proteini uygulaması

Kaynak: Caldas, G. C., (2022) ve URL-6



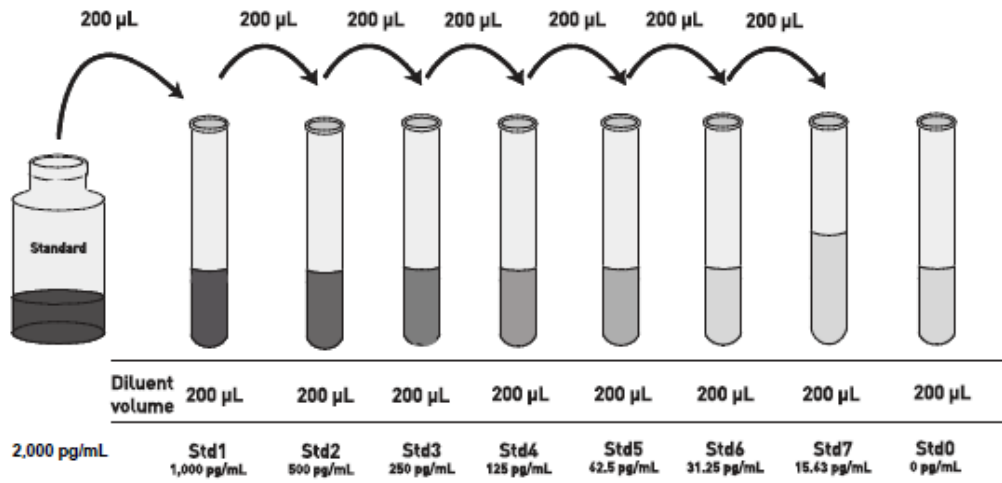
Şekil 3.3 Alzheimer Modeli Oluşturma Aşamaları

3.2.5. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

A β 42 proteinin seviyesi ölçümü yapılmak üzere ELISA testi için toplanan besiyerleri, Invitrogen™ Human A β 42 ELISA Kit prosedürü takip edildikten sonra kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak MultiSkan™ GO μ Drop cihazı ile ölçüldü.

-20°C’de bulunan A β 42 proteini uygulanan ve uygulanmayan SH-SY5Y hücrelerinden toplanan süpernatantlar ve +4°C’de muhafaza edilen kit içerisindeki kimyasallar oda sıcaklığına getirildi.

Numune konsantrasyonlarının standart eğri aralığında olması gerektiğinden ilk aşamada Şekil 3.4’de gösterildiği şekilde seyreltilmiş standartlar hazırlandı.



Şekil 3.4. Hu A β 42 standardının seri dilüsyonları

Kaynak: URL-7

Bunun için öncelikle kit içinde bulunan Hu A β 42 standardı, 2.000 pg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Daha sonra içinde 200 μ l standart diluent buffer bulunan 1,5 ml’lik tüpe 200 μ l standart konuldu ve ilk tüp 1000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı. Aynı işlem, 200 μ l standart diluent buffer içeren 7 tüpe de şekil 3.4’de gösterildiği sırayla uygulandı ve 500, 250, 125, 62.5, 31.35, 15.63 ve 0 pg/mL olacak şekilde human A β 42 standart konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar ve örneklerden 50’şer μ l çekilerek kuyulara yüklendi. Son olarak bir kuyu kromojen blank için boş bırakıldı.



Şekil 3.5. ELISA kit aşamaları

Kaynak: URL-7'den uyarlanmıştır.

Şekil 3.5'deki ilk aşamada gösterildiği şekilde öncelikle kromojen blank için ayrılan kuyu dışındaki kuyuların hepsine 50 µl Human Aβ42 Detection Antibody solüsyonu eklendi. ELISA plağının kenarına hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı ve kuyuların üstü bir yapışkan film ile kapatılarak oda sıcaklığında 3 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi bittikten sonra ELISA plağı hızlı bir şekilde ters çevrilerek lavaboya döküldü. Daha önceden kit prosedüründe belirtildiği şekilde konsantre Wash Buffer'ın distile su kullanarak seyreltilmesi ile hazırlanan solüsyon ile tüm kuyular 4 kere yıkandı.

Daha sonra kit prosedüründe belirtildiği şekilde hazırlanan Anti-Rabbit IgG HRP solüsyonu, Şekil 3.5'de gösterilen 2. aşama için kromojen blank hariç tüm kuyucuklara 100'er µl eklendi ve yine kuyuların üstü bir film ile kapatılarak 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonunda ilk aşamada olduğu gibi Wash Buffer ile 4 kere yıkandı.

Şekil 3.5'de gösterilen 3. aşama için kromojen blank kuyusu dahil bütün kuyulara 100 µl Stabilized Chromogen eklendi ve tüm kuyularda bulunan solüsyonun maviye dönüşmesi sağlandı. Ardından plaka karanlık bir ortamda yine üstü kapalı bir şekilde 30 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı.

Şekil 3.5'de gösterilen son aşama için yine her kuyuya 100 µl Stop Solution eklendi ve solüsyonun maviden sarıya dönmesi beklendi. Ardından ELISA plağı kenarlarına hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı.

Durdurma solüsyonu eklendikten en fazla 2 saat içerisinde kit prosedüründe belirtildiği şekilde 450 nm'deki absorbans değerleri ELISA Reader cihazında ölçüldü.

3.2.6. Total RNA İzolasyonu

Kontrol grubu ve A β 42 proteini uygulanan hücrelerden total RNA izolasyonu işlemi Zymoresearch marka RNA kiti ile kit protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

1. Daha önce RNA izolasyonu yapılmak üzere -80°C'de saklanan hücre pelletleri üzerine kit protokolünde belirtilen şekilde 300-400 μ l RNA Lysis Buffer eklenerek karıştırıldı.

2. Elde edilen karışım kit içinde bulunan toplama tüpüne yerleştirilmiş sarı renkteki Spin Away Filtreye aktarılıp 14.000 rpm'de 30 sn santrifüjlenerek genomik DNA uzaklaştırıldı.

3. Santrifüj işlemi sonrasında toplama tüpünde kalan süpernatant üzerine aynı hacimde %90-100'lük etanol eklenerek toplama tüpüne yerleştirilmiş kit içinde bulunan yeşil renkli kolona aktarıldıktan sonra 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi ve supernatant atıldı.

4. Daha sonra kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve kolonu yıkamak için 400 μ l RNA Wash Buffer eklenerek 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj işlemi yapıldı ve supernatant atıldı.

5. Santrifüj sonunda nükleaz içermeyen bir tüpte 75 μ l DNA Digestion Tamponu ve daha önce kit içinde liyofilize halde bulunan ve belirtilen oranda nükleaz free su ile hazırlanmış olan DNaz I (1U/ μ l)'den 5 μ l alınarak karışım hazırlandı ve karışım toplama tüpünde bulunan kolonun matrisine eklendi. Sonrasında kolon oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.

6. Bekleme süresi sonunda kolona 400 μ l RNA Prep Tamponu eklenerek 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj yapıldı ve kolonda bulunan supernatant atıldı.

7. Yıkama aşamasına geçildiğinde 700 μ l RNA Wash Tamponu kolona eklenerek 14.000 rpm'de 30 sn. santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı.

8. İkinci yıkama için kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 400 μ l RNA Wash Tamponu eklendi ve yıkama tamponunun iyice uzaklaştırılması sağlamak amacıyla 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı.

9. Son aşamada kolon, nükleaz içermeyen bir eppendorf tüpe yerleştirildi ve direkt olarak kolonun matrisine gelecek şekilde 60 µl DNaz/RNaz içermeyen su eklenip 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj yapıldı.

10. Konsantrasyon ölçümü için santrifüj işlemi sonrası eppendorf tüpte toplanan 60 µl RNA örneğinden 2 µl alınarak MultiSkan™ GO µDrop okuyucu cihazın okuyucu aparatı üzerinde bulunan kuyuya konuldu. Ölçüm için referans almak amacıyla izolasyonun son aşamasında kullanılan DNaz/RNaz içermeyen 2 µl su, blank olarak diğer kuyuya konuldu ve 230, 260 ve 280 nm’de absorban ölçümü yapıldı.

11. RNA konsantrasyonu $A_{260} \times 40 \times 10/0,52$ formülü ile ng/µl cinsinden; saflığı ise A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı ile cihazın otomatik hesaplayıcı sistemiyle hesaplandı.

12. Kalan RNA örnekleri kısa süreli saklama için -20°C’lik dondurucu dolaba kaldırıldı.

3.2.7. cDNA Sentezi

İzolasyon işleminden sonra konsantrasyon ölçümü yapılan ve -20°C’de muhafaza edilen RNA örneklerinden 1 µg kullanılarak Bioline marka (kat no: BIO-65054) kit ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için Tablo 3.9’da gösterilen bileşenler kullanılarak buz üzerinde mastermix hazırlandı.

Tablo 3.9. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Hacim	Konsantrasyon
Total RNA	15 µl’ye kadar	1 µg
TransAmp Buffer	4 µl	5X
Reverse Transcriptase	1 µl	-
DNase/RNase içermeyen su	Değişken	-
Toplam Hacim:	20 µl	-

Hazırlanan mastermix uygun hacimdeki bir tüp içine konularak termal döngü cihazına (Thermo Cycler, BIO-RAD) yerleştirildi ve Tablo 3.10’da verilen reaksiyon koşullarında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Sentez sonunda elde edilen cDNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -20°C’lik dondurucuda saklandı.

Tablo 3.10. cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları

Primer bağlanması	25°C, 10 dk.
Ters Transkripsiyon	42°C, 15 dk.
Enzim İnaktivasyonu	80°C, 5 dk.

3.2.8. Gerçek-Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

SH-SY5Y hücrelerine uygulanan A β 42 proteini ile Alzheimer modeli oluşturulması ile, ilgili genlerin (APP, PSEN1, GSAP, BDNF, BACE1) kontrol grubu ile gen seviyesinde bir karşılaştırma yapılabilmesi açısından SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı. Hedef genlerin ifade seviyeleri, referans gen (β -actin) ile karşılaştırılarak belirlendi. İlgili genlere spesifik primerler üretici firmanın önerdiği şekilde daha önceden standardize edilip hazırlandı. Tablo 3.11.'de gösterildiği şekilde kit protokülüne göre hazırlanıp 8'li strip PZR tüplerine aktarılan karışım ile, Tablo 3.12'de gösterildiği koşullarda Gerçek-Zamanlı PZR uygulandı.

Tablo 3.11. Gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılan Gerçek-Zamanlı PZR uygulamasında kullanılan bileşenler

Reaktifler	Kullanılan Miktar	Çalışma Konsantrasyonu
cDNA	1,5 μ l	-
SensiFAST SYBR No-Rox karışımı (2X)	10 μ l	1X
İleri Primer	1 μ l	2,5 μ M
Geri Primer	1 μ l	2,5 μ M
dH ₂ O	6,5 μ l	-
Son Hacim	20 μ l	-

Tablo 3.12. GZ-PZR Koşulları

Aşama	Sentez Reaksiyon Koşulları
Polimeraz Enzim Aktivasyonu	95°C, 3 dk.
Denatürasyon	95°C, 10 sn
Bağlanma	55°C, 10 sn
Uzama	72°C, 30 sn
Erime Eğrisi Analizi	55°C - 95°C, 5 sn

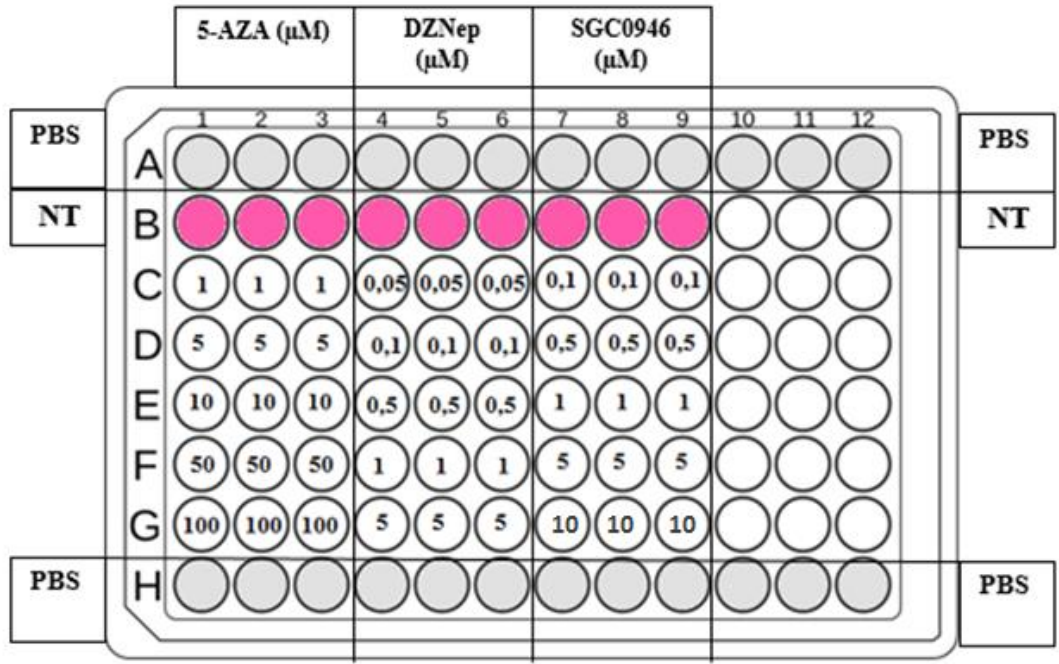
3.2.9. 96 Kuyulu Plaklara Ekim ve MTT Testi

Kültür sonrası Alzheimer modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerine uygulanacak olan, hedef genlerin protein seviyesini etkileyecek kimyasalların, kontrol hücre grubuyla karşılaştırılarak uygun konsantrasyonlarının saptanması ve hücre canlılığının tespiti amacıyla MTT testi yapıldı. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi, MTT'nin canlı hücreler tarafından mitokondriyal aktivite ile formazan kristallerine dönüştürülmesi temeline dayanır.

Hücrelerdeki mitokondriyal aktivite, genellikle canlı hücre sayısı ile bağlantılı olduğu için, ilaçların hücreler üzerindeki *in-vitro* sitotoksik etkilerinin tespiti için MTT testi kullanılır.

Bunun için daha önce 6 kuyucuklu plakalara ekilen A β 42 proteini ile Alzheimer modeli oluşturulan hücreler ve kontrol grubu hücreleri belli bir sayıya ulaştığında thoma lamında sayılarak 96 kuyulu plakalara ekim için toplandı.

Ardından 96 kuyulu plakanın en üst (A) ve en alt (H) sırasındaki tüm kuyulara 100 μ l PBS eklendi. Ardından 100 μ l hacimde besiyeri içindeki hücreler diğer kuyulara ekilerek 24 saat oturması için inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonunda uygulanacak kimyasalların optimum etki göstereceği konsantrasyonlarının belirlenmesi için birkaç farklı konsantrasyonda denemesinin yapılması amacıyla daha öncesinde tablo 3.13'de belirtilen stok konsantrasyonlardan yapılan hesaplamalarla şekil 3.6'da gösterildiği şekilde kimyasal uygulaması yapıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. A β 42 ve kontrol grubu için biyolojik tekrarlı olması adına ikişer plaka şeklinde ekim yapıldı.

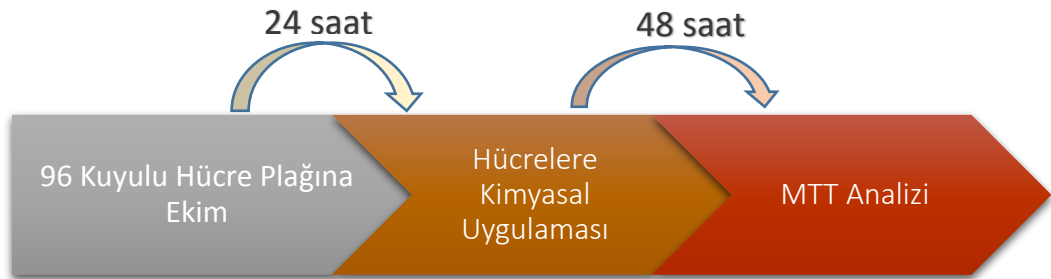


Şekil 3.6. MTT analizi için yapılan ekim düzeni

Kaynak: URL-8

48 saat sonrasında MTT analizi için her kuyuya hücrelerin besiyeri içerisinde son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde MTT solusyonu eklendi ve reaksiyonun gerçekleşmesi için 3-4 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra mavi kristallerin gözlemlenmesinin ardından plaktaki kuyuların boşaltılması için plaka hızlıca lavaboya döküldü ve tüm kuyular 100 μ l PBS ile yıkandı.

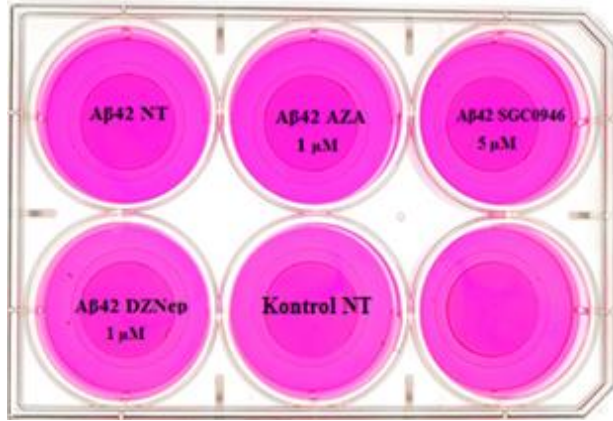
PBS uzaklaştırıldıktan sonra kuyulara 100 μ l DMSO eklendi ve 10 dk. karanlıkla bekletildi. Bekleme süresinin ardından gözlemlenen mor renk sonrasında MultiSkan™ GO μ Drop cihazında 570 nm’de ölçüm yapıldı.



Şekil 3.7. Hücrelere Kimyasal Uygulama Aşamaları

3.2.10. Alzheimer Modeli Oluşturulmuş SH-SY5Y Hücrelerine Kimyasal Uygulama İşlemi

MTT işleminden sonra elde edilen sonuçlara istinaden hücrelere uygulama yapılacak kimyasalların uygun konsantrasyonları belirlendi. Daha önce petri kaplarına ekimi yapılan Alzheimer modeli oluşturulmuş hücreler sayılarak her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde, şekil 3.8’de gösterildiği gibi Alzheimer modeli oluşturulmuş hücrelere uygulanacak olan 3 kimyasal, Kontrol NT ve A β 42 NT (kimyasal uygulanmayacak olan) hücreleri için kuyular belirlenerek 6 kuyulu kültür plakalarına biyolojik tekrarlı olarak ekim yapıldı. 24 saat oturması için inkübasyona bırakılan hücrelere, 24 saat sonunda tablo 3.13’de belirtilen konsantrasyonlarda kimyasal uygulaması yapıldı.



Şekil 3.8. ELISA ve GZ-PZR çalışması için ekilen hücrelere uygulanan kimyasalları gösteren 6 kuyucuklu plaka

Kaynak: URL-9

Tablo 3.13. Uygulanan kimyasalların stok ve son konsantrasyonları

	5-AZA	DZNep	SGC0946
Stok Konsantrasyon	10 mM	1mM	0,1 mM
Son Konsantrasyon	1 μM	1 μM	5 μM

48 saatlik inkübasyondan sonra A β 42 protein seviyesinin ölçümü için ELISA testi yapılabilmesi adına besiyerleri toplandı. Daha sonra hücreler PBS ile yıkandı ve PBS aspirasyonla uzaklaştırıldıktan sonra kuyulara tripsin eklenerek 3-5 dk. hücrelerin plaka tabanından ayrılması sağlandı. Plaka tabanından ayrılıp ayrılmadığı mikroskopla kontrol edilen hücrelere taze besiyeri eklenerek tripsin etkisi inhibe edildi.

Ardından hücreler 1,5ml santrifüj tüplerine toplanarak 5 dk. 1500 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve hücre pelleti RNA izolasyonu için -20°C'lik dondurucuda saklandı.

3.2.11. Kimyasal Uygulaması Sonrası ELISA Testi

Kimyasal uygulaması sonrası hedef protein seviyesinin NT hücrelere göre karşılaştırma yapılabilmesi için şekil 3.8'de gösterilen besiyerlerinin toplanmasıyla beraber Amyloid beta 42 Human ELISA Kit (KHB3441) protokolü takip edilerek ELISA testi yapıldı. Yapılan testte kullanılan örnekler şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. ELISA testi için kullanılan örnekler

Kaynak: URL-10

3.2.12. Kimyasal Uygulaması Sonrası Gerçek Zamanlı PZR testi

Şekil 3.6.'da gösterilen plakadan toplanan hücrelerdeki hedef genlerin ifade seviyeleri, öncelikle Quick RNA Miniprep (R1055) kit ile RNA izolasyonu, sonrasında SENSIFEST cDNA Synthesis Kit (BIO-65054) ile cDNA sentezi yapıldıktan sonra, SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit protokolü takip edilerek biyolojik tekrarlı olacak şekilde GZ-PZR işlemi ile kantitatif olarak ölçüldü. Hedef genlerin ifade seviyeleri, referans gen (β -actin) ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.3. İstatistiksel Analiz

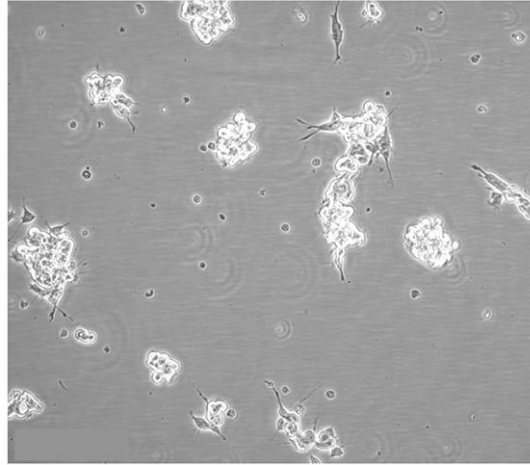
Her deney için en az 2 teknik ve 3 biyolojik tekrar yapıldı ve elde edilen veriler standart sapma göz önünde bulundurularak analiz edildi. Yapılan MTT ve GZ-PZR uygulamaları sonucundaki veriler, Multiskan Go mikro-plate okuyucu ve BIO-RAD CFX Connect™ GZ-PZR cihazlarının analiz programlarındaki anlamlılık değerleri ile yorumlanarak iki kuyruklu Öğrenci t-testi (Two-tailed Student's t-test) ile değerlendirildi. Kontrol grubu ve deney grubu arasındaki farklar için istatistiksel anlamlılık sınırı $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. SH-SY5Y Hücre Hatlarının Görüntüleri

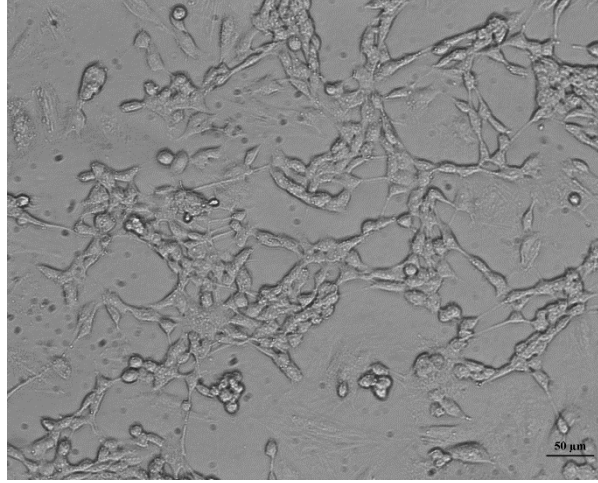
SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri tipik olarak doku kültüründe iki farklı şekilde büyür. Bazıları süspansiyon olarak (Şekil 4.1) ortamda yüzen hücre yığınlarına dönüşürken, diğerleri plakaya yapışan kümeler oluşturur (Kovalevich and Langford, 2013). Çalışma için kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin uygun şartlarda kültürü yapıldıktan sonra faz kontrast mikroskopisi ile kontrol edildiklerinde morfolojik olarak plakaya yapışan şekilde kümeler oluşturduğu görüldü (şekil 4.2).

SH-SY5Y hücrelerinin kültür ortamında yıldızimsı yapıda olan nöronal hücrelerle büyük ölçüde morfolojik benzerlik gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 4.1. Süspansiyon SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü

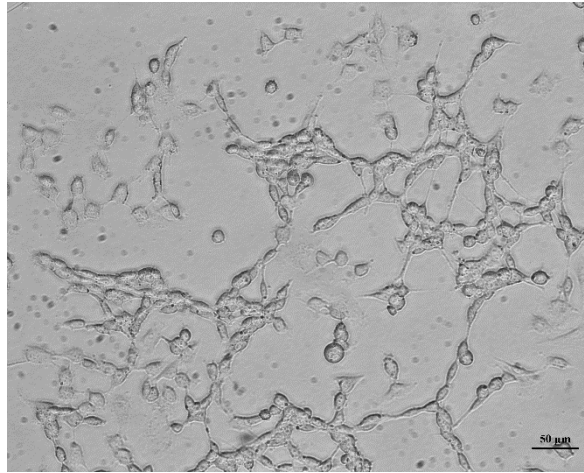
Kaynak: URL-11



Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü (20X)

4.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin A β 42 Uygulaması Sonrası Görüntüleri

Uygun koşullarda kültüre edilen SH-SY5Y hücrelerine A β 42 proteini uygulanmasının ardından hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler faz kontrast mikroskopunda incelendi (Şekil 4.3).



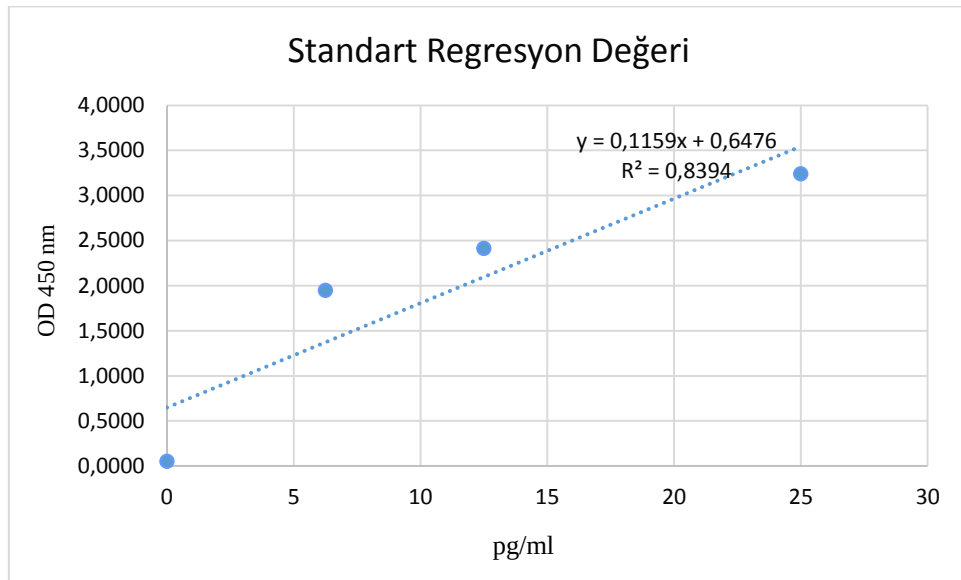
Şekil 4.3. A β 42 Proteini uygulanmış SH-SY5Y hücreleri (20X)

4.3 Alzheimer Modeli Oluşturma Aşaması için ELISA Sonuçların Değerlendirilmesi

10 cm'lik kültür kabında %70-80 doluluk oranına ulaştıktan sonra pasajlanarak kültürü devam ettirilen SH-SY5Y hücreleri, 6 kuyucuklu kültür plakalarına uygun miktarda ekildi.

Ekimden 48 saat sonra son konsantrasyonu 5 µM ve 10 µM olacak şekilde Aβ42 protein uygulaması yapıldı. Hücreler, içerisinde Aβ42 bulunan ve bulunmayan besiyerindeki 48 saatlik inkübasyondan sonra besiyerleri, taze besiyeri ile değiştirildi ve 48 saatlik inkübasyondan sonra besiyerleri ELISA yapılmak üzere toplandı.

Böylelikle ELISA testi ile, Aβ42 proteini içeren besiyerine maruz bırakılan hücrelerle, Aβ42 proteini içermeyen besiyeri ile muamele edilmiş kontrol grubu olan hücreler arasındaki Aβ42 proteininin miktarı karşılaştırmalı olarak ölçüldü ve hücrelerde Alzheimer modeli oluşturulup oluşturulmadığı belirlendi. Kit protokolüne göre hazırlanan standartların ölçüm sonrası verdiği değerlere göre (tablo 4.1) bir standart eğri çizilerek hücre besiyerlerindeki protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.4).



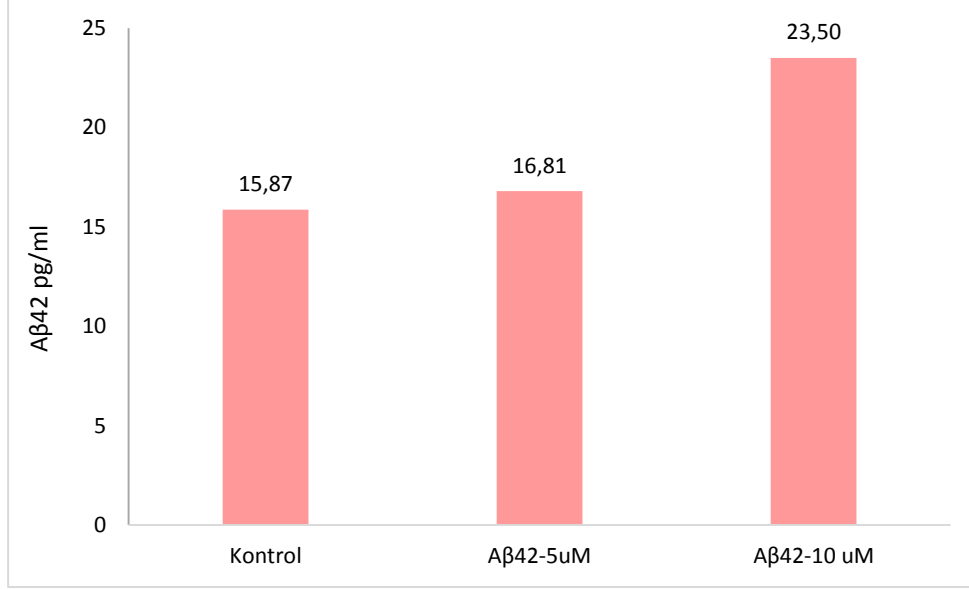
Şekil 4.4. ELISA ölçümleri ile elde edilen standart değerlere göre hesaplanan regresyon değeri

Tablo 4.1. ELISA Kit protokolüne göre ölçülen standart değerler (OD 450 nm)

Blank	Std 0 pg/ml	Std 6,25 pg/ml	Std 12,5 pg/ml	Std 25 pg/ml
0,0636	0,0554	1,9485	2,4155	3,2405

Hücrelere son konsantrasyon 5µM ve 10µM Aβ42 proteini uygulaması sonrasında besiyerleri toplanan hücrelerdeki protein seviyesinin tespiti için yapılan ELISA ölçümü sonucunda 5µM protein uygulaması sonrası anlamlı bir fark tespit

edilmezken 10µM protein uygulandığında bu hücrelerin kontrol hücelere oranla çok daha fazla Aβ42 proteini içerdiği belirlendi (Şekil 4.5. ve Tablo 4.2).



Şekil 4.5. Aβ42 (5 µM-10 µM) uygulaması sonrası, süpernatanta salınan Aβ42 seviyelerinin ELISA testi ile kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak elde edilen değerlerin grafiği

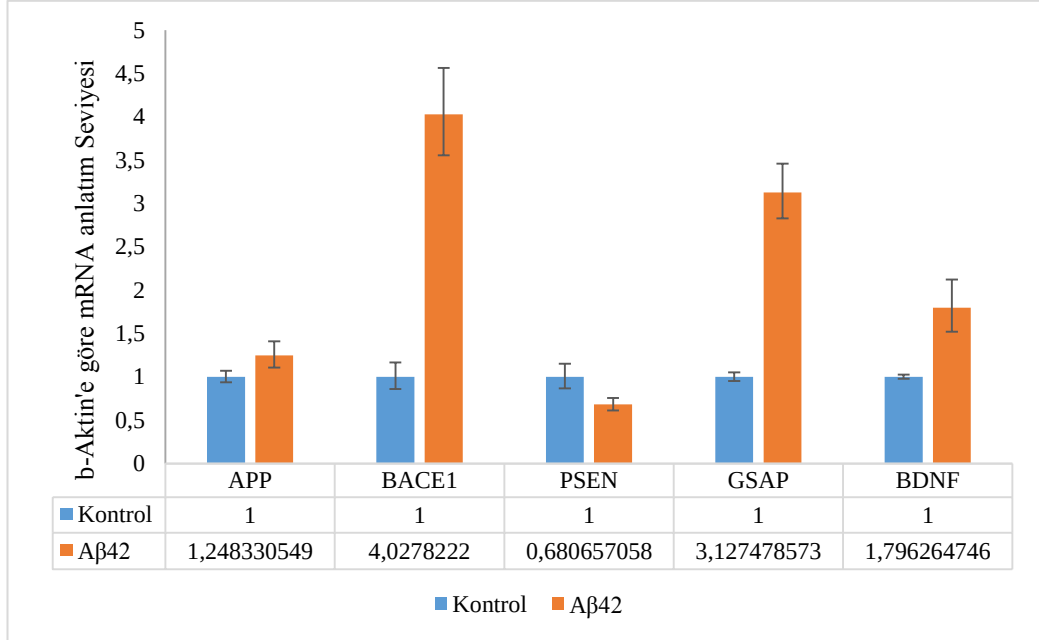
Tablo 4.2. 5µM-10 µM Aβ42 proteini uygulaması sonrasında besiyerlerine salınan Aβ42 protein seviyesinin ELISA ile ölçüm sonuçları

	SH-SY5Y Kontrol	SH-SY5Y (+Aβ42-5 µM)	SH-SY5Y (+Aβ42-10 µM)
OD (450 nm)	2,4873	2,5956	3,3712

4.4. GZ-PZR Analizinin Değerlendirilmesi

Aβ42 uygulamasının ardından toplanarak RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilen SH-SY5Y hücrelerinde GZ-PZR işlemi ile Alzheimer ile ilişkili genlerin ifade seviyeleri uygulama yapılmayan kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak belirlenerek Alzheimer modeli oluşturulup oluşturulmadığı gen seviyesinde analiz edildi (Şekil 4.6). Yapılan bu kantitatif analiz sonucunda Aβ42 proteini uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde genlerin çoğunluğunda ifade seviyelerinde artış

gözlenirken; BACE1 ve GSAP genlerinin ifadesindeki artış ve PSEN geninin ifadesindeki düşüş anlamlı bulunmuştur.

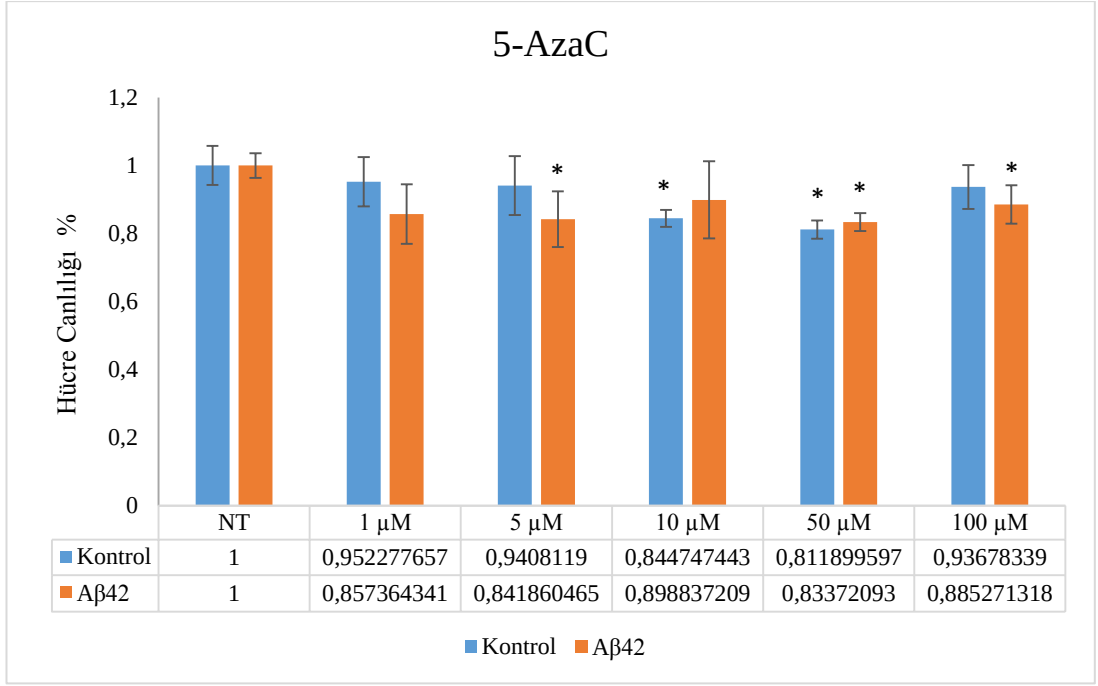


Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde A β 42 ile ilişkili genlerin Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonuçları

4.5. MTT Analizinin Değerlendirilmesi

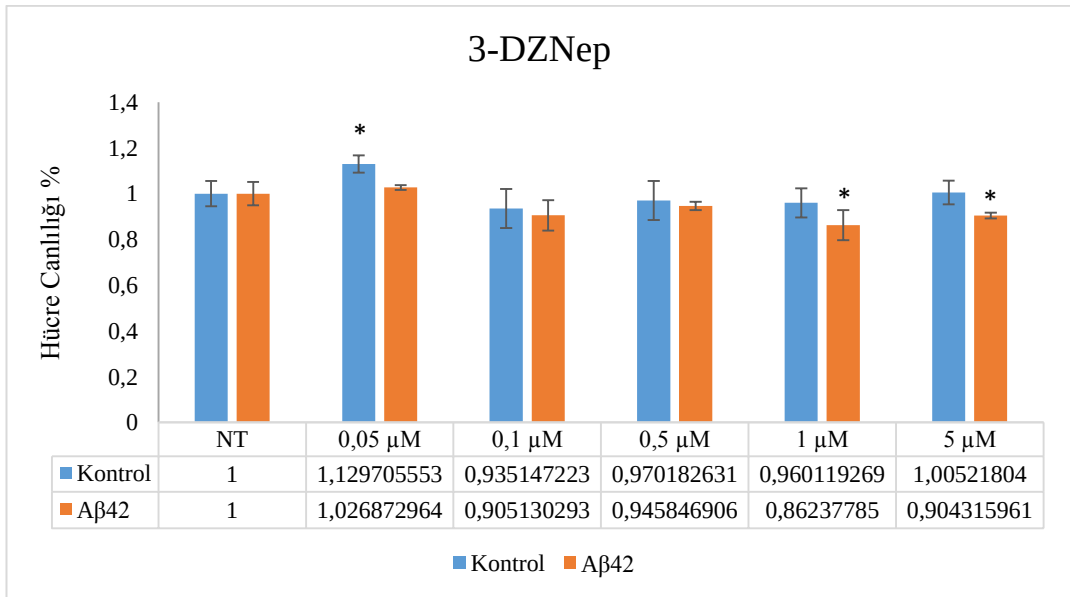
A β 42 proteini uygulaması sonrasında SH-SY5Y hücrelerine uygulanacak kimyasalların hücre canlılığına etkisi ile birlikte kontrol edilerek optimum konsantrasyonunu belirleyebilmek için MTT analizi yapıldı. A β 42 uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde Alzheimer modeli oluşturulduğu belirlendikten sonra uygun şartlarda çoğalmaya bırakılan hücreler, 3-4 pasaj ilerletildikten sonra yapılan kimyasal uygulamasının ardından gerçekleştirilen MTT analizi ile kimyasalların en uygun konsantrasyonları ölçüldü.

5-AzaC uygulaması yapıldıktan sonra elde edilen ölçümlere göre hücre canlılığını en yüksek oranda düşüren (~%11) en düşük konsantrasyon 1 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.7).



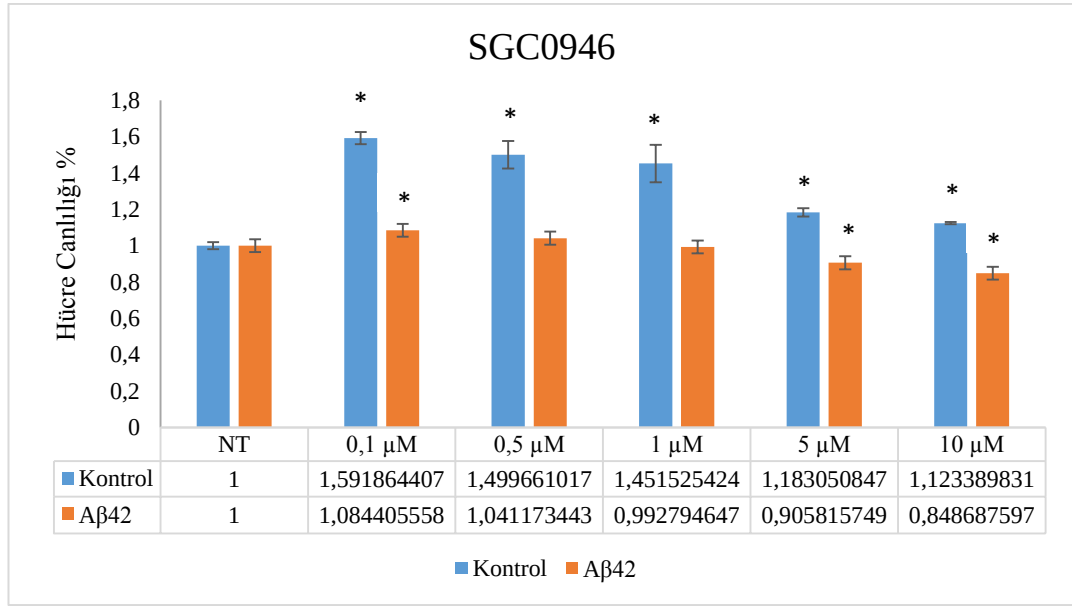
Şekil 4.7. Kontrol ve A β 42 SH-SY5Y hücrelerinin 5-AzaC uygulaması sonrası (48 saat) MTT analiz sonuçları

DzNEP uygulaması yapıldıktan sonra elde edilen ölçümlere göre hücre canlılığını en yüksek oranda düşüren (~%12) en düşük konsantrasyon 1 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kontrol ve A β 42 SH-SY5Y hücrelerinin DZNep uygulaması sonrası (48 saat) MTT analiz sonuçları

SGC0946 uygulaması yapıldıktan sonra elde edilen ölçümlere göre SGC0946'nın SH-SY5Y hücrelerinde canlılığı arttırdığı tespit edildi. Ölçümler sonrası kontrol hücre gruplarında canlılığı en düşük seviyede arttıran ve A β 42 hücrelerinde canlılığı en yüksek oranda düşüren en düşük konsantrasyon 5 ve 10 μ M (~%23 ve ~%24) olarak belirlendi (Şekil 4.9). Benzer oranlarda bir düşüş oranı gösteren bu iki konsantrasyon arasından düşük konsantrasyondaki kimyasal (5 μ M) optimum konsantrasyon olarak seçildi (şekil 4.9).

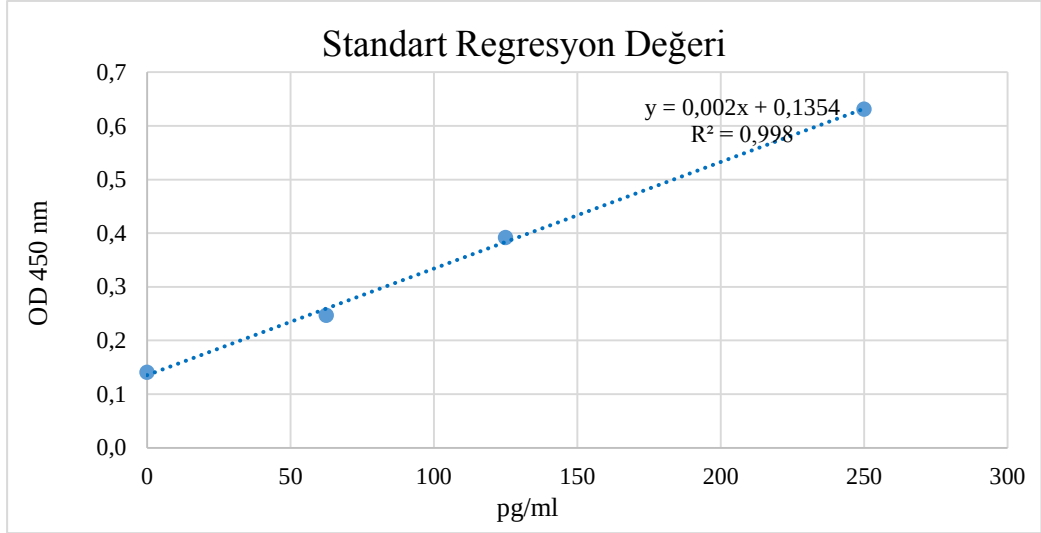


Şekil 4.9. Kontrol ve A β 42 SH-SY5Y hücrelerinin SGC0946 uygulaması sonrası (48 saat) MTT analiz sonuçları

4.6. Kimyasal Uygulaması Sonrası ELISA Analizinin Değerlendirilmesi:

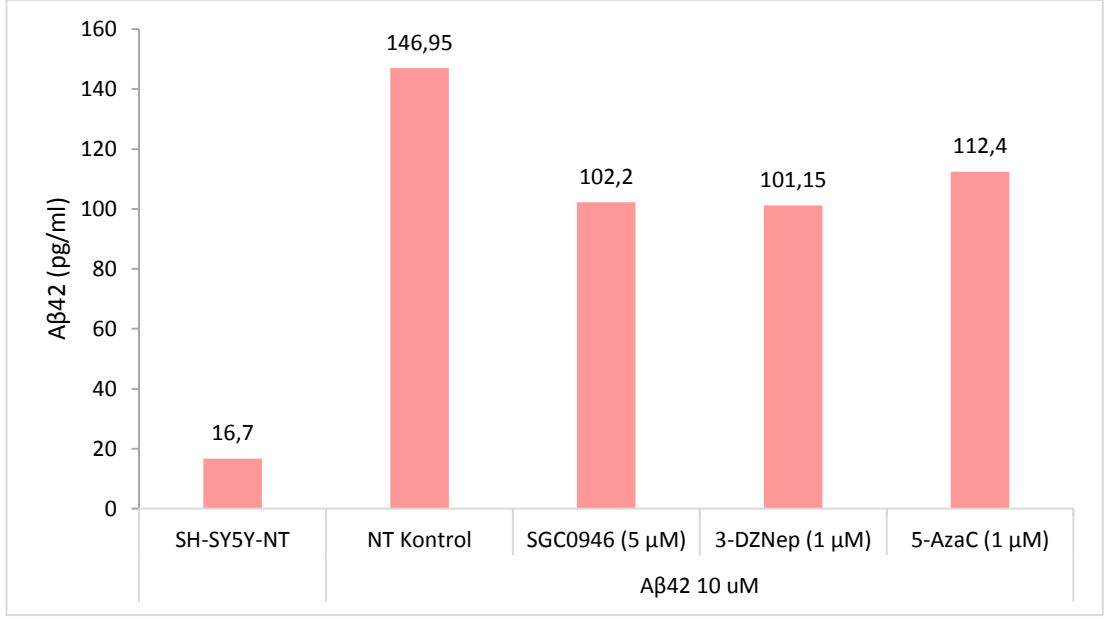
MTT analizi ile optimum kimyasal konsantrasyonu belirlendikten sonra kontrol grubu ve A β 42 hücreleri uygun koşullarda ekilerek, belirlenen konsantrasyonlarda kimyasal uygulandı ve 48 saat sonra toplanan besiyerlerinden alınan ELISA sonuçları ile bu konsantrasyonlarda AH ilişkili protein seviyesinin ne şekilde değiştiği tespit edildi.

Kit protokolüne göre hazırlanan standartların ölçüm sonrası verdiği değerlere göre bir standart eğri çizilerek hücre besiyerlerindeki protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. ELISA ölçümleri ile elde edilen standart değerlere göre hesaplanan regresyon değeri

Yapılan bu ölçüm sonucunda uygulanan 3 kimyasalın da SH-SY5Y hücrelerinde A β 42 seviyesini anlamlı seviyede düşürdüğü görüldü. Ek olarak A β 42 uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin 3-4 pasajlama sonrasında, Alzheimer modeli ilk oluşturulduğundaki A β 42 protein seviyesinden çok daha yüksek oranda A β 42 proteini içerdiği tespit edildi (Şekil 4.11).

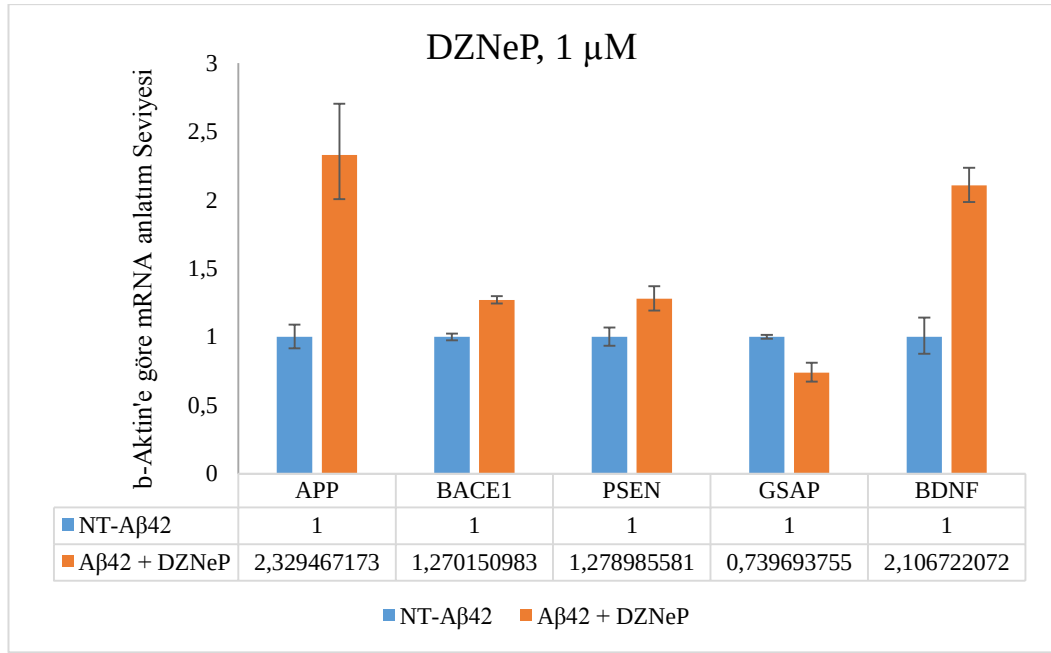


Şekil 4.11. Aβ42 hücrelerinde kimyasal uygulaması sonrası ölçülen protein seviyesi

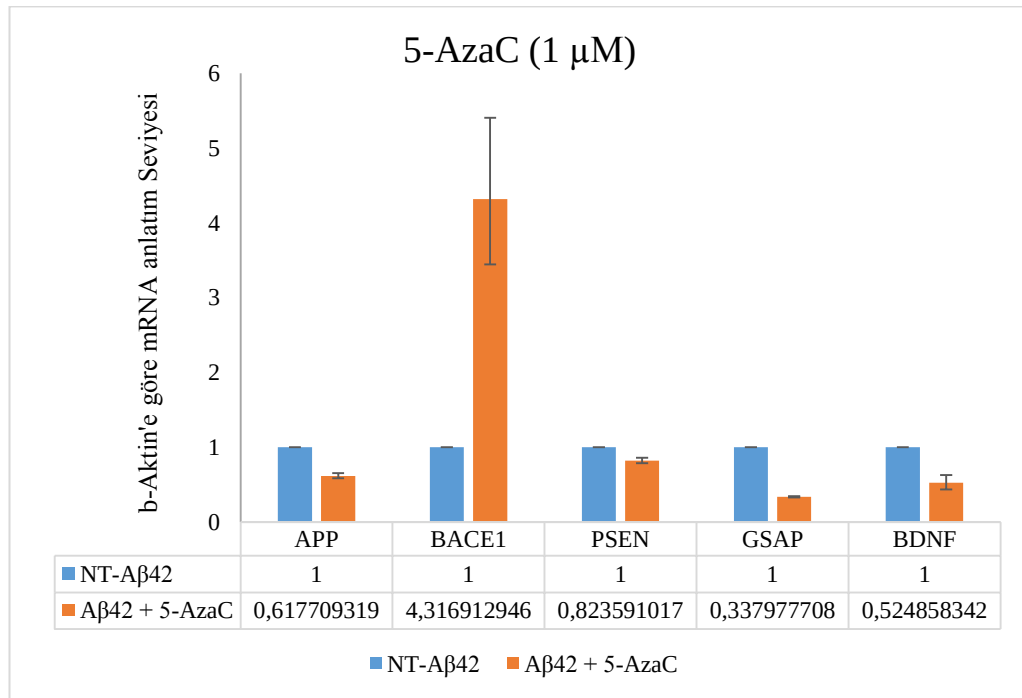
4.7. Kimyasal Uygulaması Sonrası GZ-PZR ile Gen İfadesi Analizinin Değerlendirilmesi:

MTT analizi ile optimum kimyasal konsantrasyonu belirlendikten sonra kontrol grubu ve Aβ42 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda kimyasallar uygulandıktan 48 saat sonra toplanan hücrelerden öncelikle RNA izolasyonu ve cDNA sentezi, ardından GZ-PZR analizi yapıldı.

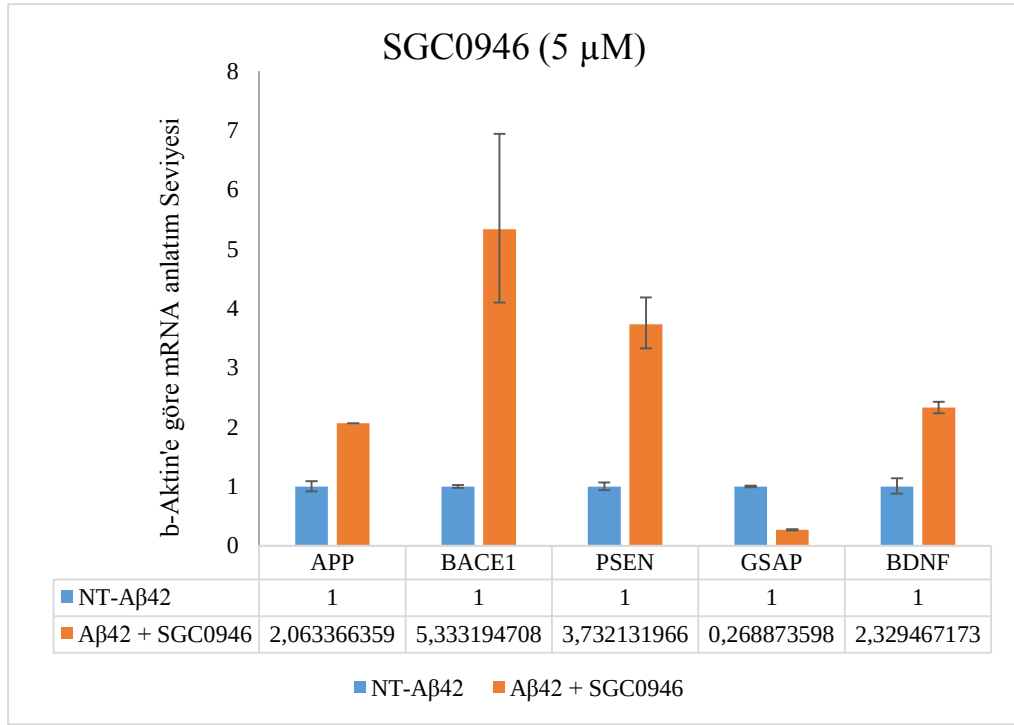
Alınan sonuçlar ile bu konsantrasyonlarda kimyasal uygulaması ile AH ilişkili genlerin ifade seviyelerinin ne şekilde değiştiği tespit edildi (Şekil 4.12, 4.13, 4.14).



Şekil 4.12. A β 42 hücrelerine uygulanan DZNeP (1 μ M) sonucunda ölçülen gen anlatımı seviyesi



Şekil 4.13. A β 42 hücrelerine uygulanan 5-AzaC (1 μ M) sonucunda ölçülen gen anlatımı seviyesi



Şekil 4.14. A β 42 hücrelerine uygulanan SGC0946 (5 μ M) sonucunda ölçülen gen anlatımı seviyesi

5. TARTIŞMA

AH hafıza, dil, biliş ve problem çözme becerilerinde kayıp, davranış değişiklikleri ve nihayetinde ölümle kendini gösteren, bunamanın en yaygın şekli ve kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. AH'nın ortaya çıkmasında genetik, epigenetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (Alagiakrishnan et al., 2012).

Genetik faktörler arasında ilk sırada APP, PSEN1 ve PSEN2'deki otozomal dominant kalıtsal mutasyonları yer almaktadır (Sheppard and Coleman, 2020). Buna istinaden hem APP hem de presenilin genlerinde bulunan mutasyonlar nedeniyle Amiloid hipotezi, AH araştırmalarında baskın hipotez olmaya devam etmektedir.

AH patogenezinde etkin olduğu bilinen diğer faktörlerin başında epigenetik değişimler gelmektedir. Bu epigenetik faktörlerin araştırılması adına doğrudan ölüm sonrası AH beyin örnekleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Sharma et al., 2020). Epigenetik değişiklikler, gen ekspresyonunu DNA mutasyonu olmadan DNA'yı paketleyen ve koruyan, histon adı verilen proteinlerin işaretlenmesiyle meydana gelir (URL-12). Alzheimer hastalığına bağlı yolaklar ve hastalığın ilerlemesi üzerinde önemli etkiye sahip olan DNA metilasyonu, histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalar, Alzheimer hastalığında düzensizleşerek DNA hiper metilasyonu, histon deasetilasyonu ve transkripsiyon seviyesinde gen ekspresyonunu genlerin yukarı/aşağı regülasyonu veya susturulması ile değiştiren durumlar ile karakterize edilir. Bu nedenle, bu epigenetik süreçlerde rol alan düzenleyiciler Alzheimer hastalığında terapötik bir hedef olarak gösterilmiştir (Sharma et al., 2020).

AH'nın nasıl başladığına ve ilerlediğine ilişkin önde gelen “amiloid hipotezi”, Aβ'nin toksik birikiminin nöronal hasara yol açan bir dizi olayı başlattığını öne sürmesiyle oldukça geniş çapta kabul görse de arkasında bir çok soru bırakıyor. Bu yüzden AH'da en iyi ilaç hedefinin ne olduğu belirsizliğini korumaya devam ediyor (Sheppard and Coleman, 2020).

Bu bilgilere istinaden yapılan tez çalışmasında SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde Alzheimer hastalığını modelleyerek hastalığın gidişatını olumlu yönde

etkileyeceği düşünölen metiltransferaz inhibitörlerinin hücrelere uygulanmasını takiben hastalıkla ilişkili gen ve protein seviyelerinin saptanması amaçlandı. SH-SY5Y hücreleri insandan türetilen, dolayısıyla birincil kültürlerinde insana özgü bir dizi protein ve protein izoformlarını ifade eden, nörobiyolojide yaygın olarak kullanılan hücrelerdir (Kovalevich and Langford, 2013). Bu çalışmada nörodejeneratif hastalıkların araştırılması için uygun olduğu düşünölen SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır.

Amiloid hipotezine göre, beyinde A β birikimi, AH patogeneziini yönlendiren temel etkidir (Prasansuklab and Tencomnao, 2013). Bu hipoteze istinaden çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerine A β 42 proteini uygulamasıyla, amiloid beta üretimini tetikleyerek hücrelerde Alzheimer modeli oluşturmayı hedefledik. Ayrı ayrı 5 ve 10 μ M A β 42 protein uygulaması ile 48 saat A β 42'ye maruz bırakılan hücrelerin besiyerleri A β 42 içermeyen besiyeri ile değıştirilip, 2 gün daha inkübe edildikten sonra toplanan besiyerleri ile yapılan ELISA ölçümleri sonucunda, 10 μ M A β 42 uygulanan hücrelerin, 5 μ M A β 42 uygulanan hücrelere kıyasla kontrol hücrelere oranla çok daha yüksek konsantrasyonda A β 42 proteini salınımı tespit edildi. Bu sonuçlara istinaden 10 μ M protein uygulaması yapılan hücrelerin A β 42 üretimine başlayarak Alzheimer modeli oluşturduğu görölmüşür. Ayrıca A β 42 proteini uygulaması sonrası yapılan mikroskop incelemeleri ile A β 42 proteininin SH-SY5Y hücrelerine uygulanmasının ardından proliferasyonun attığı gözlemlendi. Amiloid beta, nöral büyüme ve onarımda önemli bir rol oynayan büyük bir zar proteindir (Chen et al., 2017). Bu rolü düşünöldüğünde başta görölen proliferatif artış bu bilgiyle örtüşmektedir.

Karmaşık ve genetik olarak heterojen bir hastalık olan AH'nın gelişiminde yer alan genlerin belirlenmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. AH gelişiminde rol oynadığı bilinen önemli genlerden ikisi APP ve PSEN genleridir (Blacker and Tanzi, 1998). Yapılan çalışmalarda yüksek APP ekspresyonunun, artmış A β birikimine ve karakteristik AH nöropatolojisine yol açtığı bildirilmektedir (Tcw and Goate, 2017).

Alzheimer modeli oluşturulan hücrelerdeki gen ifadesinin kantitatif ölçümü için yapılan GZ-PZR ile elde edilen sonuçlara göre APP geninin ifadesinde artış görölrken PSEN gen ifadesinde düşüş tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, presenilin hipotezine göre PSEN gen ifadesi azaldığında/etkisizleştğinde amyloid beta üretiminin artması ve nörodejenerasyonun

belirgin hale gelmesiyle (Shen and Kelleher, 2007) örtüşmektedir.

BACE1, APP'yi β -bölgesinde bölen ve bunun sonucunda Ap peptidinin üretimine ve salınmasına yol açan transmembran aspartil proteazdır (Coimbra et al., 2018). Yapılan çalışmalarda BACE1 proteininin AH'dan etkilenen beyin bölgelerinde yükseldiği gösterilmiştir (Yang, 2003; Johnston, 2005) ve çalışmamızda elde ettiğimiz BACE1 ifade seviyesindeki yüksek artışın bu verilerle uyuşmasıyla birlikte yapılan A β 42 uygulamasının hücrelerde BACE1 üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir.

GSAP (γ -sekretaz proteaz), amiloid-beta protein üretimini spesifik olarak aktive eden dört temel bileşenden oluşan büyük bir intramembran protein kompleksidir. Yapılan çalışmalarda kültürlenmiş hücrelerde GSAP'nin devre dışı bırakılmasının A β üretimi için γ -sekretaz aktivitesini doğrudan azalttığı gösterilmiştir (Wong et al., 2019). Ek olarak Down sendromlu (DS) bireylerin yaşamlarının erken dönemlerinde yüksek seviyelerde A β peptitleri ve Alzheimer hastalığı benzeri beyin amiloidozu geliştirmesinin γ -sekretaz aktive edici proteinin (GSAP) DS beyinlerinde artması sonucu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chu et al., 2016). Yaptığımız çalışmada Alzheimer modeli oluşturduğumuz hücreler üzerinde yapılan GZ-PZR sonucunda GSAP gen ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmesiyle, literatür ile uyumlu veriler elde edildiği görülerek bu artışın hücrelerde amiloid seviyelerinin arttığını net bir şekilde açıklamaktadır.

BDNF sinaptik plastisite ve nöronal hayatta kalma açısından çok önemli bir proteindir (Diniz and Teixeira, 2011). Alzheimer hastalığının (AH) patogeneğinde, BDNF geninin azalmış ifadesi önemli bir yer tutar (Jiao et al., 2016).

Yaptığımız GZ-PZR analizi sonucunda SH-SY5Y hücrelerindeki BDNF ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edildi. Elde edilen bu artışın BDNF'in sinir hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen bir protein olmasından dolayı, hücrelere uygulanan patolojik A β 42'nin toksisitesine karşı gösterdikleri ilk reaksiyon olabileceği gibi, model oluşturma aşamasında SH-SY5Y hücrelerindeki diğer tüm genlerde Alzheimer hastalarının hücrelerindeki genlerin ifade seviyelerine yaklaşılmış olsa da, *in-vitro* çalışmalar sırasında %100 benzerlik yakalamanın mümkün olamama ihtimalinden de kaynaklanabileceği düşünüldü.

Yapılan çalışmaların artmasıyla AH patogeneğinde epigenetik değişikliklerin

önemli bir rol oynadığı doğrulanmaktadır (Gao et al., 2022). Bu çalışmalar, histon belirteçlerinin, A β 'nin anormal tau fosforilasyonu ve AP protein plakları gibi patolojik özellikleriyle büyük ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir (Narayan et al., 2015).

Bu bilgiler ışığında Alzheimer modeli oluşturduğumuz SH-SY5Y hücrelerindeki A β 42 seviyesini düşürecek kimyasallar için optimum konsantrasyonu belirlemek ve bu konsantrasyona maruz kalan hücrelerin canlılık analizi için yapılan MTT testi sonucunda 5-AZA'nın 1 μ M konsantrasyon ile %11, 3-DZNep'in 1 μ M konsantrasyon ile %12 ve SGC0946'nın 5 μ M konsantrasyon ile %23 oranında Alzheimer modeli hücrelerinde canlılığı en çok düşüren en düşük konsantrasyonlar olduğu tespit edildi.

3-DZNep, EZH2'nin degradasyonunu hedefleyen bir S-adenosil metiyonin bağımlı metiltransferaz inhibitörüdür. Yapılan çalışmalarda EZH2'nin yüksek ekspresyonunun NB hastalarının kötü prognozu ile korele olduğu gösterilmiştir (Li et al., 2018). Yaptığımız bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki DZNep'in hem kontrol SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hem de A β 42 hücrelerinde hücre canlılığını beklenildiği gibi anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir.

SGC0946'nın uygulanan tüm konsantrasyonlarının kontrol hücrelerde canlılığı arttırdığı görülmüştür. Fakat uygulanan konsantrasyon oranı arttıkça kontrol hücrelerde yükselmiş canlılık oranı düşmeye başlamış, A β 42 hücrelerde de beklenildiği gibi hücre canlılığında anlamlı şekilde düşüş gözlemlenmiştir.

SH-SY5Y hücre hattı bir nöroblastoma türevi olarak elde edilen ve bu nedenle hücrelerin farklılaşma kaderini, canlılığını, büyüme performansını, metabolik özelliklerini ve genomik stabilitesini etkileyen kanserli özelliklere sahiptir. Bu yüzden SH-SY5Y hücreleri fizyolojik açıdan normal nöronal özelliklerden büyük ölçüde farklılık gösterir (Xicoy et al., 2017).

Bu bilgilere istinaden elde ettiğimiz sonuçlar; SGC0946'nın kontrol nöroblastoma hücrelerinde kullanılan düşük konsantrasyonların hücrede başlangıçtaki moleküler olayları tetiklemiş olabileceğini ve nöroblastoma gibi DNA hasarı olan hücrelerin düşük konsantrasyondaki kimyasallara direnç göstererek canlılıklarının artmasına neden olmuş olabileceğini düşündürdü.

Kullanılacak kimyasalların optimum konsantrasyonları belirlendikten sonra NT ve belirlenen konsantrasyonlarda kimyasal uygulanan Alzheimer modeli

hücrelerine, uygulama sonrası A β 42 seviyesinin ölçümü için yapılan ELISA analizi sonucunda, DZNep'in ~%31, SGC0946'nın ~%30, 5-AZA'nın ~%24 oranında A β 42 seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Ek olarak hücrelerde Alzheimer modeli oluşturulduğunda A β 42 seviyesinin ölçümü için yapılan ilk ELISA analizi ile daha sonra kimyasal uygulaması için 3-4 pasaj ilerletilen A β 42 hücrelerinde yapılan ELISA analizi karşılaştırıldığında bu hücrelerin kontrol hücrelere göre çok daha yüksek oranda A β 42 üretmeye başladığı görülmüştür.

Hücrelere uygulanan epigenetik inhibitörlerin gen seviyesindeki etkilerinin analizi için yapılan GZ-PZR analizi sonucu 1 μ M DZNep uygulaması sonrasında NT A β 42 hücrelerine göre PSEN ve BDNF genlerinin anlatımında görülen anlamlı artış ve GSAP gen anlatımındaki düşüş DZNep'in AH ilişkili bu genlerin ifadesini hastalığın seyrinde olumlu olarak değiştirdiğini göstermiştir.

1 μ M 5-AzaC uygulamasından sonra APP ve GSAP genlerinin ifadesinde görülen düşüş 5-AzaC'nın AH ilişkili bu genlerin ifadesini hastalığın seyrinde olumlu olarak değiştirdiğini göstermiştir.

5 μ M SGC0946 uygulanan A β 42 hücrelerindeki PSEN ve BDNF gen ifadelerindeki anlamlı artış ve GSAP gen ifadesindeki düşüş SGC0946'nın AH ilişkili bu genlerin ifadesini hastalığın seyrinde olumlu olarak değiştirdiğini göstermiştir.

6. SONUÇLAR

Alzheimer hastalığının bilinen en ayırt edici özellikleri arasında bulunan amiloid- β plakları ile ilgili son yıllarda kapsamlı araştırmalar yürütülmesine rağmen bu protein kümelerinin hastalıktaki kesin rolü belirsizliğini korumaktadır (Sheppard et al., 2020).

AH vakalarının büyük çoğunluğu genetik olmayan faktörlerin bir sonucu olarak kabul edilir. AH'nın baskın risk faktörü olan yaşlanmada düzensiz epigenetik mekanizmaların birikmesi, epigenetik mekanizmalarının birkaç enzimindeki mutasyonlar, bozulmuş öğrenme ve hafıza oluşumu gibi değişen nörodejeneratif süreçlerle ilişkilendirilmiştir (Sanchez and Gräff, 2015).

Yapılan çalışmalarda epigenetik düzenleyicilerin aktivitesinin bazı ilaçlar tarafından inhibe edilebileceği gösterilmiştir (URL-12) . Bu tez çalışmasında, AH araştırmalarında kullanılan SH-SY5Y hücreleri AH'nı modellemek amacıyla A β 42 proteini ile muamele edilerek, kontrol grubuyla karşılaştırmalar yapıldı. A β 42 proteinin SH-SY5Y hücrelerinde kendiliğinden üretilmeye başladığı ELISA ve GZ-PZR yöntemleriyle tespit edildi. Hastalığın modellenmesinden sonra A β plaklarının seviyesini olumlu yönde değiştireceği beklenen metil transferaz inhibitörleri uygulanarak Gerçek-Zamanlı PZR ile hastalıkla ilişkilendirilmiş olan genlere ve ELISA yöntemi ile A β protein seviyesine bakılması sonucu anlamlı ilişkiler bulundu. SGC0946, 5-AZA ve DZNep'in A β 42 plaklarının seviyesini anlamlı şekilde düşürmesinin tespiti ve ilişkili genlerin çoğunda tespit edilen değişimler ile bu kimyasalların A β metabolizması üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

Şu anda, AH'da A β için hedeflenen ilaçlarla ilgili çok sayıda çalışma başarısızlıkla sonuçlanmakla birlikte piyasada dolaylı olarak AH üzerine etki eden bazı ilaçlar varsa da etkinlikleri çok düşük ve yan etkileri çok fazladır. Bu nedenle AH tedavisi için yeni bir strateji geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Gao et al., 2022).

Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar ile amiloid beta proteininin AH'da önemli bir etken olduğu bir kez daha gösterilerek çalışmamızda kullanılan

56

7. ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasıyla elde edilen veriler ışığında Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik daha fazla epigenetik inhibitör kimyasallar üzerine çalışmalar yapılabilir ve yapılacak bu çalışmalarda söz konusu kimyasallar kombine olarak kullanılabilir.

Bu tez çalışması ve devamında yapılacak araştırma projelerinde Alzheimer hastalığı tedavisindeki epigenetik faktörlerin daha iyi anlaşılabilmesi açısından RNA sekanslaması ve kromatin immünopresipitasyonu gibi yöntemler ile çalışılabilir ve bu çalışmalarda kullanılabilecek kitlerin üretimi gerçekleştirilebilir. Bu sayede şuan tedavisi olmayan Alzheimer hastalığı için yeni tedavi seçenekleri ortaya çıkabilir.

KAYNAKLAR

- Anand, P., & Singh, B.** (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*, 36(4), 375–399. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0036-3>.
- Armstrong, R.** (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia neuropathologica*, 57(2), 87–105. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>.
- Al Temimi, A. H. K., Amatdjais-Groenen, H. I. V., Reddy, Y. V., Blaauw, R. H., Guo, H., Qian, P., & Mecinovic, J.** (2019). The nucleophilic amino group of lysine is central for histone lysine methyltransferase catalysis. *Commun Chem.*, 2, 112. doi.org/10.1038/s42004-019-0210-8.
- Alagiakrishnan, K., Gill, S. S., Fagarasanu, A.** (2012). Genetics and epigenetics of Alzheimer's disease. *Postgraduate Medical Journal*, 88, 522-529.
- Anderson, O. S., Sant, K. E., & Dolinoy, D. C.** (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(8), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003>.
- Apostolova L. G.** (2016). Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 22(2 Dementia), 419–434. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000307>.
- Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., & Ishiura, S.** (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(1), 231–235. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02999-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02999-6).
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E.** (2011). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 377(9770), 1019–1031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).
- Bird, A. P.** (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209–213. doi: 10.1038/321209a0.
- Blackner D., & Tanzi RE.** (1998). The Genetics of Alzheimer Disease: Current Status and Future Prospects. *Arch Neurol.*, 55(3), 294–296. doi:10.1001/archneur.55.3.294.
- Breijyeh, Z., & Karaman, R.** (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., & Scandura, J. M.** (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS one*, 6(1), e14524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014524>.

- Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R.** (2018). The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 118. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>.
- Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.** (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(10), 783–793. <https://doi.org/10.1038/nrd2959>.
- Budson, A. E., & Solomon, P. R.** (2012). New criteria for Alzheimer disease and mild cognitive impairment: implications for the practicing clinician. *The neurologist*, 18(6), 356–363. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31826a998d>.
- Bufill, E., Ribosa-Nogu  , R., & Blesa, R.** (2020). The Therapeutic Potential of Epigenetic Modifications in Alzheimer's Disease. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications. doi: 10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch9.
- Cacabelos, R., & Torrellas, C.** (2015). Epigenetics of Aging and Alzheimer's Disease: Implications for Pharmacogenomics and Drug Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30483–30543. <https://doi.org/10.3390/ijms161226236>.
- Cairns, B. R.** (2007). Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 989. doi: 10.1038/nsmb1333.
- Cairns, B. R.** (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature*, 461, 193. doi: 10.1038/nature08450.
- Caldas, G.C., Barth, O.M., & Barreto-Vieira, D.F.** (2022). *Transmission Electron Microscopy Studies of Dengue Viruses*. In: Mohana-Borges, R. (eds) *Dengue Virus. Methods in Molecular Biology*, 2409. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1879-0_2.
- Cattaneo, A., Cattane, N., Begni, V., Pariante, C. M., & Riva, M. A.** (2016). The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Translational psychiatry*, 6(11), e958. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.214>.
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E.** (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chu, J., Lauretti, E., Craige, C. P., & Pratic  , D.** (2014). Pharmacological modulation of GSAP reduces amyloid- β levels and tau phosphorylation in a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 41(3), 729–737. <https://doi.org/10.3233/JAD-140105>.
- Chu, J., Li, J. G., Joshi, Y. B., Giannopoulos, P. F., Hoffman, N. E., Madesh, M., & Pratic  , D.** (2015). Gamma secretase-activating protein is a substrate for caspase-3: implications for Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, 77(8), 720–728. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.06.003>.

- Chu, J., Wisniewski, T., & Praticò, D.** (2016). GATA1-mediated transcriptional regulation of the γ -secretase activating protein increases A β formation in Down syndrome. *Annals of neurology*, 79(1), 138–143. <https://doi.org/10.1002/ana.24540>.
- Clapier, C. R., and Cairns, B. R.** (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 78, 273–304. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
- Clark, C. M., Pontecorvo, M. J., Beach, T. G., Bedell, B. J., Coleman, R. E., Doraiswamy, P. M., Fleisher, A. S., Reiman, E. M., Sabbagh, M. N., Sadowsky, C. H., Schneider, J. A., Arora, A., Carpenter, A. P., Flitter, M. L., Joshi, A. D., Krautkramer, M. J., Lu, M., Mintun, M. A., Skovronsky, D. M., & AV-45-A16 Study Group.** (2012). Cerebral PET with florbetapir compared with neuropathology at autopsy for detection of neuritic amyloid- β plaques: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, 11(8), 669–678. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70142-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70142-4).
- Coimbra, J. R. M., Marques, D. F. F., Baptista, S. J., Pereira, C. M. F., Moreira, P. I., Dinis, T. C. P., Santos, A. E., & Salvador, J. A. R.** (2018). Highlights in BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Frontiers in chemistry*, 6, 178. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00178>.
- Cras, P., Kawai, M., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Greenberg, B., & Perry, G.** (1991). Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7552–7556. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7552>.
- Das, B., & Yan, R.** (2017). Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Translational neurodegeneration*, 6, 23. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0093-5>.
- Day, J. J., & Sweatt, J. D.** (2010). DNA methylation and memory formation. *Nature neuroscience*, 13(11), 1319–1323. <https://doi.org/10.1038/nn.2666>
- Deyts, C., Thinakaran, G., & Parent, A. T.** (2016). APP Receptor? To Be or Not To Be. *Trends in pharmacological sciences*, 37(5), 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.005>.
- Diniz, B. S., & Teixeira, A. L.** (2011). Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular medicine*, 13(4), 217–222. <https://doi.org/10.1007/s12017-011-8154-x>.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., DeKosky, S. T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Fox, N. C., Galasko, D., Habert, M. O., Jicha, G. A., Nordberg, A., Pasquier, F., ... Cummings, J. L.** (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *The Lancet. Neurology*, 13(6), 614–629. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0).
- Duce, J. A., Tsatsanis, A., Cater, M. A., James, S. A., Robb, E., Wikke, K., Leong, S. L., Perez, K., Johanssen, T., Greenough, M. A., Cho, H. H., Galatis, D., Moir, R. D., Masters, C. L., McLean, C., Tanzi, R. E., Cappai, R., Barnham, K. J., Ciccotosto, G. D., Rogers, J. T., ... Bush, A. I.** (2010). Iron-export ferroxidase activity of β -

- amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 142(6), 857–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.014>.
- Dupont, C., Armant, D. R., and Brenner, C. A.** (2009). Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.*, 27, 351–357. doi: 10.1055/s-0029-1237423.
- Esposito, M., & Sherr, G. L.** (2019). Epigenetic Modifications in Alzheimer's Neuropathology and Therapeutics. *Frontiers in neuroscience*, 13, 476. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00476>.
- Fahrenholz, F., Gilbert, S., Kojro, E., Lammich, S., & Postina, R.** (2000). Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920, 215–222. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06925.x>.
- Fazio, T. G., & Tsukiyama, T.** (2003). Chromatin remodeling in vivo: evidence for a nucleosome sliding mechanism. *Molecular cell*, 12(5), 1333–1340. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00436-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00436-2).
- Ferrari, K. J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T., & Pasini, D.** (2014). Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Molecular cell*, 53(1), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030>.
- Fiskus, W., Wang, Y., Sreekumar, A., Buckley, K. M., Shi, H., Jillella, A., Ustun, C., Rao, R., Fernandez, P., Chen, J., Balusu, R., Koul, S., Atadja, P., Marquez, V. E., & Bhalla, K. N.** (2009). Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood*, 114(13), 2733–2743. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213496>.
- Floudas, C. S., Um, N., Kamboh, M. I., Barmada, M. M., & Visweswaran, S.** (2014). Identifying genetic interactions associated with late-onset Alzheimer's disease. *BioData mining*, 7(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13040-014-0035-z>.
- Forlenza, O. V., Diniz, B. S., Teixeira, A. L., Radanovic, M., Talib, L. L., Rocha, N. P., & Gattaz, W. F.** (2015). Lower Cerebrospinal Fluid Concentration of Brain-Derived Neurotrophic Factor Predicts Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease. *Neuromolecular medicine*, 17(3), 326–332. <https://doi.org/10.1007/s12017-015-8361-y>.
- Gao, L., Zhang, Y., Sterling, K., & Song, W.** (2022). Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Translational neurodegeneration*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00279-0>.
- Gao, X., Chen, Q., Yao, H., Tan, J., Liu, Z., Zhou, Y., & Zou, Z.** (2022). Epigenetics in Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 14, 911635. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.911635>.
- Gasparoni, G., Bultmann, S., Lutsik, P., Kraus, T. F. J., Sordon, S., Vlcek, J., Dietinger, V., Steinmaurer, M., Haider, M., Mulholland, C. B., Arzberger, T., Roeber, S., Riemenschneider, M., Kretschmar, H. A., Giese, A., Leonhardt, H., & Walter,**

- J.** (2018). DNA methylation analysis on purified neurons and glia dissects age and Alzheimer's disease-specific changes in the human cortex. *Epigenetics & chromatin*, 11(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0211-3>.
- Godyń, J., Jończyk, J., Panek, D., & Malawska, B.** (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological reports*, 68(1), 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.07.006>.
- Goedert M.** (2015). NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6248), 1255555. <https://doi.org/10.1126/science.1255555>.
- Goedert, M., Clavaguera, F., & Tolnay, M.** (2010). The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, 33(7), 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.04.003>.
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J. S., Wang, W. Y., Seo, J., Hennig, K. M., Nieland, T. J., Fass, D. M., Kao, P. F., Kahn, M., Su, S. C., Samiei, A., Joseph, N., Haggarty, S. J., Delalle, I., & Tsai, L. H.** (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*, 483(7388), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature10849>.
- Gray, S.G.** (2012). *The Potential of Epigenetic Compounds in Treating Diabetes*, In *Translational Epigenetics, Epigenetics in Human Disease*, Chapter 17, Academic Press, 331-367, ISSN 25425358, ISBN 9780123884152, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388415-2.00017-2>.
- Gu, L., & Guo, Z.** (2013). Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of neurochemistry*, 126(3), 305–311. <https://doi.org/10.1111/jnc.12202>.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S.** (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(5), a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- He, G., Luo, W., Li, P., Remmers, C., Netzer, W. J., Hendrick, J., Bettayeb, K., Flajolet, M., Gorelick, F., Wennogle, L. P., & Greengard, P.** (2010). Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*, 467(7311), 95–98. <https://doi.org/10.1038/nature09325>.
- Hippius, H., & Neundörfer, G.** (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 5(1), 101–108. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius>.
- Hussain, I., Fabrègue, J., Anderes, L., Ousson, S., Borlat, F., Eligert, V., Berger, S., Dimitrov, M., Alattia, J. R., Fraering, P. C., & Beher, D.** (2013). The role of γ -secretase activating protein (GSAP) and imatinib in the regulation of γ -secretase activity and amyloid- β generation. *The Journal of biological chemistry*, 288(4), 2521–2531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.370924>.
- Hyman, B. T., West, H. L., Rebeck, G. W., Buldyrev, S. V., Mantegna, R. N., Ukleja, M., Havlin, S., & Stanley, H. E.** (1995). Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer disease: observation of log-normal size distribution and molecular

epidemiology of differences associated with apolipoprotein E genotype and trisomy 21 (Down syndrome). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3586–3590. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3586>.

- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., & Beyreuther, K.** (1996). Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *The Journal of biological chemistry*, 271(37), 22908–22914. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22908>.
- Jiao, S. S., Shen, L. L., Zhu, C., Bu, X. L., Liu, Y. H., Liu, C. H., Yao, X. Q., Zhang, L. L., Zhou, H. D., Walker, D. G., Tan, J., Götz, J., Zhou, X. F., & Wang, Y. J.** (2016). Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Translational psychiatry*, 6(10), e907. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.186>.
- Johnston, J. A., Liu, W. W., Todd, S. A., Coulson, D. T., Murphy, S., Irvine, G. B., & Passmore, A. P.** (2005). Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 5), 1096–1100. <https://doi.org/10.1042/BST20051096>.
- Kelleher, R. J., 3rd, & Shen, J.** (2017). Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(4), 629–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619574114>.
- Khanahmadi, M., Farhud, D. D., & Malmir, M.** (2015). Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article. *Iranian journal of public health*, 44(7), 892–901.
- Kornberg, R. D.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868–871. doi: 10.1126/science.184.4139.868.
- Kosik, K. S., Rapp, P. R., Raz, N., Small, S. A., Sweatt, J. D., & Tsai, L. H.** (2012). Mechanisms of age-related cognitive change and targets for intervention: epigenetics. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 67(7), 741–746. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls110>.
- Kovalevich, J., & Langford, D.** (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1078, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2.
- Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W.** (2022). Alzheimer Disease. *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/> adresinden erişildi.
- Laird, F. M., Cai, H., Savonenko, A. V., Farah, M. H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H. C., Xu, G., Koliatsos, V. E., Borchelt, D. R., Price, D. L., Lee, H. K., & Wong, P. C.** (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(50), 11693–11709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2766-05.2005>.
- Li, Z., Takenobu, H., Setyawati, A. N., Akita, N., Haruta, M., Satoh, S., Shinno, Y., Chikaraishi, K., Mukae, K., Akter, J., Sugino, R. P., Nakazawa, A., Nakagawara,**

- A., Aburatani, H., Ohira, M., & Kamijo, T.** (2018). EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications. *Oncogene*, 37(20), 2714–2727. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0133-3>.
- Maccioni, RB., González, A., Andrade, V., Cortés, N., Tapia JP., & Guzmán-Martínez L.** (2018). Alzheimer's Disease in the Perspective of Neuroimmunology. *Open Neurol J.*, 12, 50-56.
- Mann D. A.** (2014). Epigenetics in liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(4), 1418–1425. <https://doi.org/10.1002/hep.27131>.
- Mann, J., Chu, D. C., Maxwell, A., Oakley, F., Zhu, N. L., Tsukamoto, H., & Mann, D. A.** (2010). MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*, 138(2), 705–714.e7144. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.002>.
- Marmorstein, R.** (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 422–431.
- Masters, C. L., & Selkoe, D. J.** (2012). Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(6), a006262. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006262>.
- Miller, C. A., & Sweatt, J. D.** (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53(6), 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.022>.
- Miranda, T. B., Cortez, C. C., Yoo, C. B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T. K., Marquez, V. E., & Jones, P. A.** (2009). DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Molecular cancer therapeutics*, 8(6), 1579–1588. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0013>.
- Mo, J. A., Lim, J. H., Sul, A. R., Lee, M., Youn, Y. C., & Kim, H. J.** (2015). Cerebrospinal fluid β -amyloid1-42 levels in the differential diagnosis of Alzheimer's disease--systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 10(2), e0116802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116802>.
- Mohrmann, L., & Verrijzer, C. P.** (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochimica et biophysica acta*, 1681(2-3), 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.10.005>.
- Moir, R. D., Lathe, R., & Tanzi, R. E.** (2018). The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 14(12), 1602–1614. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.3040>.
- Moore, L., Le, T. & Fan, G.** (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
- Müller, A., Florek, M.** (2010). 5-Azacytidine/Azacitidine. In: Martens, U. (eds) *Small Molecules in Oncology*. Recent Results in Cancer Research, vol 184. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8_11.
- Narayan, P. J., Lill, C., Faull, R., Curtis, M. A., & Dragunow, M.** (2015). Increased acetyl and total histone levels in post-mortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of disease*, 74, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.023>.

- Navada, S. C., Steinmann, J., Lübbert, M., & Silverman, L. R.** (2014). Clinical development of demethylating agents in hematology. *The Journal of clinical investigation*, 124(1), 40–46. <https://doi.org/10.1172/JCI69739>.
- Ng, T. K. S., Ho, C. S. H., Tam, W. W. S., Kua, E. H., & Ho, R. C.** (2019). Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer's Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 257. <https://doi.org/10.3390/ijms20020257>.
- Pazin, M. J., & Kadonaga, J. T.** (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*, 89, 325–328. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80211-1.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E. J., & Fahnstock, M.** (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 93(6), 1412–1421. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x>
- Perez, S. E., Nadeem, M., Malek-Ahmadi, M. H., He, B., & Mufson, E. J.** (2017). Frontal Cortex and Hippocampal γ -Secretase Activating Protein Levels in Prodromal Alzheimer Disease. *Neuro-degenerative diseases*, 17(6), 235–241. <https://doi.org/10.1159/000477937>.
- Peterson, C. L., & Laniel, M. A.** (2004). Histones and histone modifications. *Current biology*, 14(14), R546–R551. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
- Prasansuklab, A., & Tencomnao, T.** (2013). Amyloidosis in Alzheimer's Disease: The Toxicity of Amyloid Beta (A β), Mechanisms of Its Accumulation and Implications of Medicinal Plants for Therapy, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 413808, 10, <https://doi.org/10.1155/2013/413808>.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaManita, A-S., White, L. E., Mooney, R. D., & Platt, M. L.** (2012). *Neuroscience (5th ed.)*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. p. 713. ISBN 978-0-87893-695-3.,
- Dickson, D. W.** (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56(4), 321–339. doi:10.1097/00005072-199704000-00001. PMID 9100663
- Röhr, D., Boon, B. D. C., Schuler, M., Kremer, K., Hoozemans, J. J. M., Bouwman, F. H., El-Mashtoly, S. F., Nabers, A., Großerueschkamp, F., Rozemuller, A. J. M., & Gerwert, K.** (2020). Label-free vibrational imaging of different A β plaque types in Alzheimer's disease reveals sequential events in plaque development. *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 222. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01091-5>.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D.** (2001). Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry*, 70, 81–120. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.81>.
- Saint-Aubert, L., Barbeau, E. J., Péran, P., Nemmi, F., Vervueren, C., Mirabel, H., Payoux, P., Hitzel, A., Bonneville, F., Gramada, R., Tafani, M., Vincent, C., Puel, M., Dechaumont, S., Chollet, F., & Pariente, J.** (2013). Cortical florbetapir-PET amyloid load in prodromal Alzheimer's disease patients. *EJNMMI research*, 3(1), 43. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-43>

- Sananbenesi, F., & Fischer, A.** (2009). *The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases*. *Biol. Chem.* 390, 1145–1153. doi: 10.1515/BC.2009.131.
- Sanchez-Mut, J. V., & Gräff, J.** (2015). Epigenetic Alterations in Alzheimer's Disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 347. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00347>.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., & Kouzarides, T.** (2002). Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905), 407–411. <https://doi.org/10.1038/nature01080>.
- Satoh, J., Tabunoki, H., Ishida, T., Saito, Y., & Arima, K.** (2012). Immunohistochemical characterization of γ -secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and applied neurobiology*, 38(2), 132–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01206.x>.
- Saunders A. M.** (2001). Gene identification in Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics*, 2(3), 239–249. <https://doi.org/10.1517/14622416.2.3.239>.
- Saura, C. A., Choi, S. Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Chattarji, S., Kelleher, R. J., 3rd, Kandel, E. R., Duff, K., Kirkwood, A., & Shen, J.** (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, 42(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00182-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00182-5).
- Schachter, A. S., & Davis, K. L.** (2000). Alzheimer's Disease. *Current treatment options in neurology*, 2(1), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11940-000-0023-0>.
- Schellenberg, G. D., Bird, T. D., Wijsman, E. M., Orr, H. T., Anderson, L., Nemens, E., White, J. A., Bonnycastle, L., Weber, J. L., & Alonso, M. E.** (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5082), 668–671. <https://doi.org/10.1126/science.1411576>.
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M.** (2021). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10284), 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4).
- Selkoe, D. J.** (1999). *Biology of β -amyloid precursor protein and the mechanism of Alzheimer disease*. Chapter 19 In Terry, RD; Katzman, R; Bick, KL; Sisodia, SS (eds.). *Alzheimer Disease*. Lippincott Williams and Wilkins. 293–310. ISBN 0-7817-1503-2.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T.** (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.
- Sharma, V. K., Mehta, V., & Singh, T. G.** (2020). Alzheimer's Disorder: Epigenetic Connection and Associated Risk Factors. *Current neuropharmacology*, 18(8), 740–753. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200128125641>.
- Shen, J., & Kelleher, R. J.** (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 104(2), 403–409.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0608332104>.

- Sheppard, O., & Coleman, M.** (2020). Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications.
- Singh, R. P., Shiue, K., Schomberg, D., & Zhou, F. C.** (2009). Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation. *Cell transplantation*, 18(10), 1197–1211. <https://doi.org/10.3727/096368909X12483162197204>.
- Singh, S. K., Srivastav, S., Yadav, A. K., Srikrishna, S., & Perry, G.** (2016). Overview of Alzheimer's Disease and Some Therapeutic Approaches Targeting A β by Using Several Synthetic and Herbal Compounds. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 7361613. <https://doi.org/10.1155/2016/7361613>.
- Sontheimer, H.** (2015). *Diseases of the Nervous System. Chapter 4 - Aging, Dementia, and Alzheimer Disease*, 99-131, Academic Press, ISBN 9780128002445, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800244-5.00004-5>.
- Soria-Valles, C., Osorio, F. G., & López-Otín, C.** (2015). Reprogramming aging through DOT1L inhibition. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(21), 3345–3346. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093443>.
- Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T.** (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 82(4), 756–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.
- Stresemann, C., & Lyko, F.** (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer*, 123(1), 8–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.23607>.
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D.** (2015). β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 6, 221. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>.
- Tamaye, R., Zhou, D., & D'Adamio, L.** (2009). The interactome of the amyloid beta precursor protein family members is shaped by phosphorylation of their intracellular domains. *Molecular neurodegeneration*, 4, 28. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-28>.
- Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K., & Ishiura, S.** (2007). ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.181>.
- Tang, Y., Lutz, M. W., & Xing, Y.** (2019). A systems-based model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 15(1), 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.3058>.
- Tcw, J., & Goate, A. M.** (2017). Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(6), a024539. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024539>.

- Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C. C., Shiloach, J., & Wu, C.** (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 13(6), 686–697. <https://doi.org/10.1101/gad.13.6.686>.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., ... Citron, M.** (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.
- Walker, L. C.** (2020). A β plaques. *Free Neuropathology*, 1, 31. <https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2020-3025>.
- Webb, R. L., & Murphy, M. P.** (2012). β -Secretases, Alzheimer's Disease, and Down Syndrome. *Current gerontology and geriatrics research*, 362839. <https://doi.org/10.1155/2012/362839>.
- Whetstone, J.R.** (2010). *Histone Methylation: Chemically Inert but Chromatin Dynamic*, Handbook of Cell Signaling (Second Edition), Chapter 287, Academic Press, 2010, Pages 2389-2397, ISBN 9780123741455, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00287-4>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741455002874>)
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., & Haass, C.** (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5799), 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.1132341>.
- Wolfe M. S.** (2008). Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 5(3), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.05.010>.
- Wong, E., Liao, G. P., Chang, J. C., Xu, P., Li, Y. M., & Greengard, P.** (2019). GSAP modulates γ -secretase specificity by inducing conformational change in PS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), 6385–6390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820160116>.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J.** (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
- Xu, K., Dai, X. L., Huang, H. C., & Jiang, Z. F.** (2011). Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 143269. <https://doi.org/10.1155/2011/143269>.
- Yang, L. B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X. L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R., & Shen, Y.** (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nature medicine*, 9(1), 3–4. <https://doi.org/10.1038/nm0103-3>.

- Yu, W., Chory, E. J., Wernimont, A. K., Tempel, W., Scopton, A., Federation, A., Marineau, J. J., Qi, J., Barsyte-Lovejoy, D., Yi, J., Marcellus, R., Iacob, R. E., Engen, J. R., Griffin, C., Aman, A., Wienholds, E., Li, F., Pineda, J., Estiu, G., Shatseva, T., ... Schapira, M. (2012). Catalytic site remodelling of the DOT1L methyltransferase by selective inhibitors. *Nature communications*, 3, 1288. <https://doi.org/10.1038/ncomms2304>.
- Zhu, M., Tao, Y., He, Q., Gao, H., Song, F., Sun, Y. M., Li, H. L., Wu, Z. Y., & Saffen, D. (2014). Common GSAP promoter variant contributes to Alzheimer's disease liability. *Neurobiology of aging*, 35(11), 2656.e1–2656.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.018>.
- Zilberzwige-Tal, S., & Gazit, E. (2018). Go with the Flow-Microfluidics Approaches for Amyloid Research. *Chemistry, an Asian journal*, 13(22), 3437–3447. <https://doi.org/10.1002/asia.201801007>.
- URL-1 https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Cerebral_amyloid_angiopathy_-2a-_amyloid_beta_-_high_mag.jpg&oldid=478462355, Erişim tarihi: 17.01.2023.
- URL-2 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azacitidine>, Erişim tarihi: 17.01.2023.
- URL-3 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Deazaneplanocin-A-hydrochloride>, Erişim tarihi: 19.01.2023.
- URL-4 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sgc0946>, Erişim tarihi: 23.01.2023.
- URL-5 <https://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber>, Erişim tarihi: 06.03.2023.
- URL-6 <https://images.dutscher.com/reference/hd/949893.webp>, Erişim tarihi: 06.03.2023.
- URL-7 https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0014629_KHB3441_HuAbeta42_ELISA_PI.pdf, Erişim tarihi: 06.03.2023.
- URL-8 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:96-Well_plate.svg, Erişim tarihi: 06.03.2023.
- URL-9 <https://www.mattek.com/store/p06q-0-20-f-case/>, Erişim tarihi: 07.03.2023.
- URL-10 <http://www.clker.com/clipart-eppendorf-open-pink-fluid.html>, Erişim tarihi: 07.03.2023.
- URL-11 <https://www.atcc.org/products/crl-2266>, Erişim tarihi: 07.03.2023.
- URL-12 <https://www.sciencedaily.com/releases/2020/09/200928152907.htm>, Erişim tarihi: 10.04.2023.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Aybüke Şeniz ATEŞ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2008, Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2023, Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM:

2008-2009, Centro Laboratuvarları, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Laboratuvar Asistanı

2009-2010, Elips Sağlık  r nleri - Satıő Sorumlusu

2010-2011, Sacem Hayat Teknolojileri - Satıő Sorumlusu

2012-halen, Genteknik Medikal Tic. Ltd. őti - Firma sahibi