



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AMİLOİD BETA İLE PDIA3 ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
NÖRONA FARKLILAŞTIRILMIŞ SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
İNCELENMESİ**

İDİL YÜKSEKEL

**DANIŞMAN
PROF. DR. ERDİNÇ DURSUN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon No	Revizyon Tarihi	Sayfa No
414.1.17F	04.03.2020	00	00.00.0000	1 / 1

Bu çalışma 12.12.2022 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans
Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Erdiñ DURSUN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Nörolojik Bilimler Enstitüsü
Sinirbilim A.D.

Prof. Dr. Duygu Gezen-Ak
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Nörolojik Bilimler Enstitüsü
Sinirbilim A.D.

Prof. Dr. Erdem Tüzün
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Sinir Bilimi A.D.

İTHAF

Alzheimer Hastalığından yitirdiğimiz *Mimi*'miz Rümeysa Yüksekkel'e ithafen..

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan ve yönlendiren, tüm zorluklar karşısında beni cesaretlendiren, bu süreçte karşıma çıkan her türlü sorunda çözüm yolu gösterip hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, akademik kişiliği ve başarılarıyla bana örnek olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Erdinç DURSUN'a, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyip çalışma prensibiyle bana rol modeli olan, bilgi birikimiyle bana her zaman yol gösteren, çalışmamın hipotezini oluşturan ve çalışmama yön veren, birlikte çalışmış olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım saygıdeğer Prof. Dr. Duygu GEZEN-AK'a ve çalışmamda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans sürecimde bana yol gösterip bilgi ve yardımlarıyla daima destek olan Dr. Öğr. Üyesi Merve ALAYLIOĞLU'na, birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım M.Sc. Büşra ŞENGÜL, M.Sc. Ebru KESKİN, M.Sc. Zuhale YURTTAŞ, M.Sc. Tugay ÇAMOĞLU, M.Sc. Pelin SORDU, B.Sc. Nazlıcan İLHAN, B.Sc. Sümeyra İLDİZ, B.Sc. Buse ÜNLÜ'ye, dostlukları ve hiç bitmeyen moral kaynakları oldukları için bölüm arkadaşlarım B.Sc. Semiha YILMAZ, B.Sc. Jansed YILDIZ, M.Sc. Elif ÇITAK ve M.Sc. Efruz İrem AKKUŞ'a teşekkür ederim.

Sevgilerini, desteklerini ve bana olan inançlarını tüm kalbimle hissettiğim, eğitimimde daima arkamda olan, moral, motivasyon ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Gülay YÜKSEKEL, babam Yekta YÜKSEKEL, manevi babam Prof. Dr. Teoman AKÜNAL ve manevi annem Eldebran AKÜNAL'a, desteği ve içten dostluğu için Barış SELÇUK'a ve bütün tez sürecim boyunca desteği ve sevgisiyle varlığını yanımda hissettiren Alkan ATAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı	2
2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi.....	4
2.1.1.1. Amiloid Öncül Proteini, Amiloid Beta Peptidi'nin Üretimi ve Amiloid Plaklar	6
2.1.1.2. Nörofibriler Yumaklar	12
2.2. Protein Disülfid İzomeras Ailesi	13
2.2.1. PDIA3, PDIA3'ün Yapısı ve Hücredeki Konumlarına Göre İşlevleri.....	15
2.2.1.1. Endoplazmik Retikulum'da PDIA3	19
2.2.1.2. Mitokondri, Nükleus ve Sitozol'de PDIA3.....	21
2.2.1.3. Hücre Membranı'nda Bulunan ve Hücre Dışına Salınan PDIA3	28
2.2.2. PDIA3 ve Nörodejeneratif Hastalıklar.....	33
2.2.2.1. PDIA3 ve Alzheimer Hastalığı	40
2.3. Alzheimer Hastalığı'nda ER Stresi, Katlanmamış Protein Yanıtı ve Şaperonların Önemi.....	46
2.4. SH-SY5Y Hücre Hattı ve SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması.....	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
3.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü Deneyleri	54
3.1.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması	54
3.1.2. Hücre Açılması ve Çoğaltılması	55
3.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması Önce Poli-L-Ornitin (PLO) Kaplı Hücre Kültürü Petri'lerinin Hazırlanması.....	56

3.1.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması	56
3.1.5. Hemasitometre ile Hücre Sayımı	57
3.1.6. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması.....	57
3.1.6.1. Farklılaştırma Medyumunun Hazırlanması.....	58
3.2. A β 1-42 Peptidi'nin Hazırlanması	59
3.3. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerine A β 1-42 Peptidi'nin Uygulanması ve Hücre Kültürü Grupları.....	59
3.3.1. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinin Fiksasyonu	60
3.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinin Çift İmmü floresan İşaretleme Yöntemiyle Nöral Karakterlerinin Gösterilmesi.....	61
3.5. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde, Endojen A β 1-42 ve Endojen PDIA3'ün Lokalizasyonlarının Çift İmmü floresan İşaretleme Yöntemiyle Gösterilmesi	61
3.5.1. Çift İmmü floresan İşaretleme Protokolü.....	61
3.6. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinden Protein İzolasyonu.....	63
3.7. Western Blot Protokolü.....	64
3.7.1. Membran Soyma ve Referans Protein İşaretlemesi	65
3.8. Sitotoksikite Testi.....	66
3.9. İstatistiksel Analizler	67
4. BULGULAR.....	69
4.1. Çift İmmü floresan İşaretleme Sonuçları	69
4.1.1. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinin Nöral Karakterlerinin Gösterimi	69
4.1.2. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Endojen A β 1-42 ve Endojen PDIA3'ün Lokalizasyonlarının Gösterimi.....	69
4.2. Sitotoksikite Ölçüm Sonuçları.....	71
4.3. Western Blot Sonuçları	72
4.3.1. Hücre İçindeki Protein Disülfid İzomeras A3'ün (PDIA3) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler	72
4.3.2. Hücre Dışındaki Protein Disülfid İzomeras A3'ün (PDIA3) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler	74
5. TARTIŞMA	76
KAYNAKLAR	83
HAM VERİLER	100
FORMLAR	101

PATENT HAKKI İZNİ	102
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	103



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: SH-SY5Y Hücre Kültür Medyumu İçeriği	55
Tablo 3-2: SH-SY5Y Nörona Farklılaştırma Medyumu İçeriği	58
Tablo 3-3: IF deneylerinde kullanılan antikorların listesi	63
Tablo 3-4: Protein İzolasyonunda Kullanılan Lizis Tamponu Bileşenleri ve Miktarları	63
Tablo 3-5: Western Blot'ta Kullanılan Antikorlar ve Seyreltme Oranları	64
Tablo 3-6: Soyma Tamponunun İçeriği*	66



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Alzheimer hastalığının beyinde patolojik yayılımı.	3
Şekil 2-2: Farklı radyoaktif işaretleyiciler kullanılarak, yapısal MRG veya PET ile elde edilen beyin görüntüleri.	5
Şekil 2-3: Multifaktöriyel AH patogenezi ve ilerlemesinde kritik rol oynayan beyindeki çeşitli patofizyolojik süreçler.....	6
Şekil 2-4: APP'nin proteolitik işlenmesi.....	8
Şekil 2-5: Protein Disülfid İzomeras ailesinin üyeleri ve üyelerin yapıları	15
Şekil 2-6: PDIA3'ün moleküler yapısı	16
Şekil 2-7: PDIA3 ile indüklenen disülfid bağı oluşumu ve izomerizasyonu ile ilgili redoks reaksiyonları.....	17
Şekil 2-8: PDIA3'ün bağlanma partnerleri ve hücredeki konumuna göre işlevleri.	18
Şekil 2-9: 1,25-dihidroksivitamin D3 ve reseptörleri tarafından, nöronlardaki amiloid işleme yolağında yer alan proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinin gösterimi ..	25
Şekil 2-10: AH'de ER stresi ile ilişkili farklı patofizyolojik olaylar.....	49
Şekil 3-1: Toplam Hücre Sayısı Formülü	57
Şekil 3-2: Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücre Kültürü Grupları ve Deney Akış Şeması. 60	
Şekil 3-3: Sitotoksosite Yüzdesi Formülü	67
Şekil 4-1: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin nöral karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi	69
Şekil 4-2: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde endojen $A\beta_{1-42}$ ve endojen PDIA3'ün lokalizasyonlarının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.....	70
Şekil 4-3: 48 saat boyunca $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların ortama salınan LDH seviyesi yüzdeleri.....	71
Şekil 4-4: 72 saat boyunca $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların ortama salınan LDH seviyesi yüzdeleri.....	72
Şekil 4-5: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü gruplarında hücre içi PDIA3 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.....	72
Şekil 4-6: 48 saat boyunca $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültüründeki tüm grupların hücre içi PDIA3'ün protein ekspresyon seviyesi	73
Şekil 4-7: 72 saat boyunca $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültüründeki tüm grupların hücre içi PDIA3'ün protein ekspresyon seviyesi	74

Şekil 4-8: Hücre dışındaki PDIA3 seviyelerini gösteren Western Blot görüntüsü.....	74
Şekil 4-9: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü gruplarının 48 saatlik $A\beta_{1-42}$ uygulaması sonrası hücre dışı PDIA3 protein ekspresyon seviyeleri.....	75
Şekil 4-10: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü gruplarının 72 saat boyunca $A\beta_{1-42}$ uygulaması sonrasında hücre dışı PDIA3 ekspresyon seviyeleri	75



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- µg: Mikro gram
µM: Mikro molar
1,25D3-MARRS: 1,25 D3-membran ilişkili hızlı-yanıt steroid-bağlayıcı protein
Aβ₁₋₄₂: amiloid beta 1-42
ACTB: Beta aktin
ADAM: bir disintegrin ve metalloproteaz
AH: Alzheimer Hastalığı
AICD: Transkripsiyonel olarak aktif hücre içi C-terminal alan
AIF: Apoptoz indükleyici faktör
ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPA: α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit
APH-1: Anterior farinks-kusurlu-1
APLP: APP benzeri protein
APOE: Apolipoprotein E
APP: Amiloid öncül proteini
ATF6: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
ATRA: All-trans retinoik asit
BACE: Beta-alanı amiloid öncül protein kesim enzimi
BDNF: Beyin türevli nörotrofik faktör
BIN1: Myc-box'a bağlı-etkileşimli protein 1
BSA: Bovin serum albumin
CDK5: Sikline bağımlı kinaz-5
CJH: Creutzfeldt-Jakob hastalığı
CLU: Clusterin
CNX: Kalneksin
CRT: Kalretikulin
EBAH: Erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
EGF: Epidermal büyüme faktörü
ER: Endoplazmik retikulum
ERAD: Endoplazmik retikulum ilişkili protein degradasyonu
ERp57: Endoplazmik retikulum-yerleşik proteini 57
FBS: Fetal sığır serumu

FTD: Frontotemporal demans
GBAH: Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GRP58: Glukozla ilişkili protein 58
GSK3 β : Glikojen sentaz kinaz-3 β
HH: Huntington Hastalığı
IL-6: İnterlökün 6
IRE1: İnositol-gerektiren kinaz 1
KBB: Kan Beyin Bariyeri
LDH: Laktat dehidrogenaz
LTP: Uzun süreli güçlenme
MAM: Endoplazmik retikulumun mitokondri-ilişkili membranları
MAP: Mikrotübül ilişkili protein
MEM: minimum esansiyel medyum
MHC: Majör doku uygunluk kompleksi
mM: Mili molar
MOMP: Mitokondrial dış membran geçirgenliği
MRG: Manyetik rezonans görüntüleme
mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NB: Nöroblastoma
NBM: Nörobazal medyum
NFT: Nörofibriler Yumaklar
NIA-AA: Ulusal Yaşlanma ve Alzheimer Derneği
NMDA: N-metil-D-aspartat
OD: Optik yoğunluk
PDI: Protein disülfid izomeraz
PDIA1: Protein disülfid izomeraz A1
PDIA3: Protein disülfid izomeraz A3
PEN-2: Presenilin arttırıcı-2
PERK: Protein kinaz R (PKR)-benzeri endoplazmik retikulum kinaz
PET: Pozitron emisyon tomografisi
PFA: Paraformaldehit
PH: Parkinson Hastalığı
PHF: Çift sarmal filamentler
PICALM: Fosfatidilinositol-bağlayıcı klatrin düzenek proteini

PLC: Peptit yükleme kompleksi
PLO: Poli-L-ornitin
PN: Periferik nöropati
PrH: Prion hastalıkları
PrP: Prion proteini
PSEN: Presenilin
p-tau: Fosforile tau
RA: Retinoik asit
RAR- α : Retinoik asit reseptörü-alfa
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SERCA2b: Sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz 2b
SORL1: Sortilin-ilişkili reseptör
STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
SV2: Sinaptik vesikül 2
TBI: Travmatik beyin hasarı
TGN: Trans-golgi ağı
TH: Tirozin hidroksilaz
TNF: Tümör nekroz faktörü
TREM2: Myeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör 2
TRX: Tioredoksin
UPR: Katlanmamış protein yanıtı
VDR: Vitamin D reseptörü
WB: Western blot

ÖZET

Yüksekel, İ. (2022). Amiloid beta ile PDIA3 Arasındaki İlişkinin Nörona Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sağlıklı bireylerin beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda protein disülfid izomeras A3 (PDIA3)'ün serbest amiloid-beta ($A\beta$) peptitleriyle kompleks oluşturarak agregasyonunu önleyebildiği ve nöronlarda koruyucu etkisi olduğu, PDIA3 susturulmuş primer nöronlarda hücre içi $A\beta$ 1-42 üretiminin arttığı ve tam uzunluktaki amiloid öncül proteini (APP)'nin ER'de PDIA3 dahil olmak üzere çeşitli kalite kontrol şaperonları ile etkileşim gösterdiği bilinmektedir. Bu bilgiler, nöronlarda PDIA3'ün $A\beta$ işleme yolağında önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu doğrultuda, çalışmamızda RA/BDNF ile nörona farklılaştırılan insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre kültüründe 0,1 μ M ve 5 μ M olmak üzere iki farklı dozda ve 48 ve 72 saat olmak üzere iki saat aralığında $A\beta$ 1-42 peptit uygulamalarıyla Alzheimer-benzeri patolojiye sahip model oluşturuldu. Gerçekleştirilen Western blot yöntemiyle PDIA3'ün hücre içi ve hücre dışı protein ekspresyon seviyeleri hem sağlıklı nöronal hücre popülasyonunda hem de amiloid uygulaması yapılan patolojik gruplarda araştırıldı. Gruplardaki hücresel stres LDH sitotoksikite testi ile ölçüldü. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre, 0,1 μ M $A\beta$ 1-42 uygulanan grubun hücre içindeki PDIA3 seviyesinin 48. saatte kontrole kıyasla azalırken ($p<0,05$), 72 saat sonunda arttığı ($p<0,05$), hücre dışına salınan PDIA3'ün protein seviyesinin ise 48 saat 0,1 μ M ve 5 μ M $A\beta$ 1-42 uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla arttığı saptandı (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$) ve bu değişimlerin doza ve uygulanma süresine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlendi. Bu çalışma, $A\beta$ 'nın PDIA3 seviyesi üzerine etkisini nöronal hücrelerde ortaya koyan ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Amiloid Beta 1-42, Protein Disülfid İzomeras A3, SH-SY5Y Hücre Kültürü, Protein Etkileşimi

ABSTRACT

Yuksekel, I. (2022). Investigation of the Association between Amyloid beta and PDIA3 in Neuron Differentiated SH-SY5Y Cells. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

Studies have shown that by forming a complex with free amyloid-beta (A β) peptides in the cerebrospinal fluid (CSF) of healthy individuals, protein disulfide isomerase A3 (PDIA3) can prevent its aggregation and has a protective effect on neurons, that intracellular A β 1-42 production is increased in PDIA3-silenced primary neurons, and that full-length amyloid precursor protein (APP) interacts with various quality control chaperones in the ER, including PDIA3. These suggest that PDIA3 may have an important role in the A β processing pathway in neurons. Accordingly in our study, a model with Alzheimer's-like pathology was created with A β 1-42 peptide treatments at two different doses as 0.1 μ M and 5 μ M and at intervals of 48 and 72 hours within the human neuroblastoma SH-SY5Y cell culture differentiated into neurons by RA/BDNF. Intracellular and extracellular protein expression levels of PDIA3 were investigated both in healthy neuronal cell populations and in pathological groups treated with amyloid. Cellular stress was measured by the LDH cytotoxicity test. According to our findings, the intracellular PDIA3 levels of the 0.1 μ M A β 1-42 administered group decreased compared to the control at the 48th hour ($p < 0.05$) and increased at the end of 72 hours ($p < 0.05$). The extracellular protein levels of released PDIA3 were found to be increased in the groups treated with 0.1 μ M and 5 μ M A β 1-42 for 48 hours ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), and these changes were determined to differ depending on the dose and the duration of administration. This study is the first to reveal the effect of A β on PDIA3 levels in neuronal cells.

Key Words: Alzheimer's Disease, Amyloid Beta 1-42, Protein Disulfide Isomerase A3, SH-SY5Y Cell Culture, Protein Interaction



1. GİRİŞ VE AMAÇ

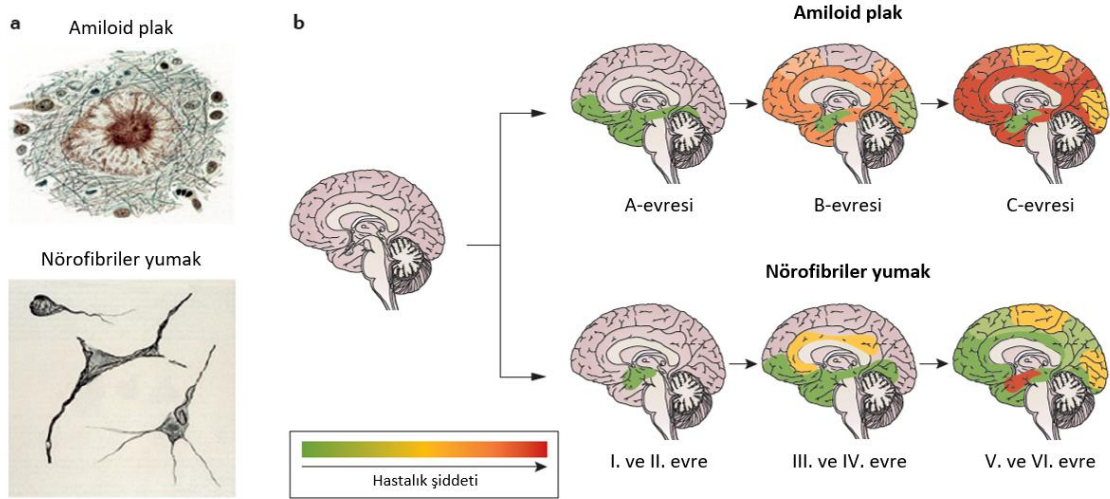
Demansın bir formu olan Alzheimer hastalığı (AH) dünya genelinde en sık rastlanan nörodejeneratif hastalık olarak sayılmaktadır. Bu hastalığın patolojisine amiloid beta ($A\beta$) fibrillerinin amiloid plaklar halinde agregat oluşturması eşlik etmektedir. Proteinlerin düzgün katlanması ve kalite kontrolünde yer alan protein disülfid izomeras A3'un (PDIA3), redoks ve şaperon aktiviteleriyle, fizyolojik koşullarda hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu bilinmektedir. Ancak şaperonların fonksiyon kayıplarının veya ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin nörodejeneratif hastalıkların gelişmesini teşvik edebildiği de bilinmektedir. Birikmeye başlayan $A\beta$ oligomerleri veya fibrilleri endoplazmik retikulum stresini tetiklemektedir. Dolayısıyla AH'nin başlangıcını ve ilerlemesini yavaşlatmak adına, yanlış katlanan ve/veya nörotoksik proteinlerin temizlenmesinde yer alan mekanizmaları araştırmak büyük önem taşır. Literatürde PDIA3'un ekzojen bir aktivatörünün amiloid plaklarını azalttığını gösteren veya HMO6 mikrogial hücrelerde $A\beta$ patolojisinin PDIA3 protein seviyesi üzerine etkisini araştırmış olan çalışmalar olsa da mevcut veriler oldukça kısıtlıdır ve bu etkiyi nöronal hücrelerde araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna göre çalışmamızda, nörona farklılaştırılmış insan nöroblastoma hücrelerine (SH-SY5Y) amiloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptit uygulaması yaparak AH benzeri bir model oluşturulması, bu hücrelerde AH'nin patolojik bileşenlerinden biri olan $A\beta$ peptidinin işlenme yolağında önemli bir rolü olabileceği ileri sürülen PDIA3'un hücre içi ve hücre dışı protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve sağlıklı bir nöronal hücre popülasyonundaki seviyeleri ile karşılaştırmalı analizinin yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilmiş olan çalışmamızın, PDIA3'un AH'deki rolü üzerine katkı sağlayacağını ve $A\beta$ 'yı hedef alan terapötik yaklaşımların ilerlemesine destek olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AH), demansın en yaygın formu ve dünyada en sık görülen nörodejeneratif hastalık olarak kabul edilmekle birlikte, birey ve toplumlar açısından son derece olumsuz etkileri olan ve giderek artan bir sağlık sorunudur (Lane ve ark., 2018). AH klinik olarak günlük yaşamı etkileyecek şekilde akıl yürütme, konuşma, problem çözme ve hafızada ilerleyici ve kademeli bir gerilemeye ek olarak davranış değişiklikleri ile karakterize edilen, yaşla ilişkili, kompleks ve multifaktöriyel etiyolojiye sahip bir nörolojik hastalıktır (Murphy & LeVine, 2010). Mevcut semptomatik tedaviler bilişte klinik olarak ölçülebilir bir etki sunsa da, hastalığı değiştirici tedavilere olan ihtiyaç halen devam etmektedir (Soria Lopez ve ark., 2019).

AH'deki anatomik analizler; korteks ve çevre yapılara ek olarak özellikle hafıza oluşumu ve konsolidasyonun meydana geldiği hippokampusta yayılan patolojik değişikliklerin, genel bir kortikal gri madde kaybına ve hastalığın ilerlemesi sırasında tüm nörotransmitter sistemler etkileniyor olsa da özellikle bazal ön beyin kolinerjik nöronların erken kaybına neden olduğunu göstermektedir (Wu ve ark., 2005). AH ilk kez 1906 yılında psikiyatrist ve nöropatolog Alois Alzheimer tarafından 51 yaşındaki Auguste Deter vakası tarif edildiğinde niteliksel olarak tanımlanmış olmasına rağmen, hastalığın iki patolojik belirtecinin, –amiloid (senil) plaklarda bulunan amiloid beta (A β) peptidi ve nörofibriler yumaklarda (NFT'ler) bulunan hiperfosforile tau proteininin– moleküler kimlikleri 1980'lerin ortalarına kadar tanımlanmamıştır (Soria Lopez ve ark., 2019). Nöropatolojik düzeyde temel olarak, serebral korteks boyunca yaygın bir dağılımda bulunan hücre dışı amiloid plakların ve başlangıçta medial temporal lobda (entorinal korteks ve hippokampus), ardından temporal, parietal ve frontal lobların izokortikal bölgelerinde meydana gelen intraselüler alandaki nörofibriler yumakların oluşumu ve birikiminin, AH patolojisini daha da şiddetlendiren pozitif bir geri besleme döngüsünü indükleyen nöroinflamasyonu desteklediği, sonuç olarak ortaya çıkan nörodejenerasyonun, nöronların işlev bozukluğunun ve ölümünün beyin hacminde muazzam bir kayba ve belirli beyin bölgelerinde kortikal incelmeye katkıda bulunduğu ve ardından AH semptomlarını başlattığı (bilışsel ve dil bozukluğunu tetiklediği) düşünülmektedir (Ashraf ve ark., 2014; Knopman ve ark., 2021; Masters ve ark., 2015) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Alzheimer hastalığının beyinde patolojik yayılımı.

A) Amiloid plak ve nörofibriler yumaklar; B) Alzheimer hastalarının beyinlerinde, hastalığın şiddetine bağlı olarak Aβ plak birikimlerinin (A, B ve C evreleri) ve nörofibriler yumakların (I-VI evreleri) dağılımı gösterilmektedir. Masters ve ark. 2015'ten uyarlanmıştır.

AH'nin ortaya çıkmasında hem genetik hem de çevresel risk faktörleri rol oynamaktadır ve çevresel risk faktörleri arasında kafa yaralanmaları, damar hastalıkları, ağır metaller, eser metaller ve enfeksiyonlara ilaveten değiştirilebilir risk faktörleri içerisinde diyabet, hiperlipidemi, orta yaş obezitesi ve hipertansiyona yol açan sağlıklı beslenme eksikliği bulunmaktadır (Breijyeh & Karaman, 2020; Tan & Gleeson, 2019). Yaş ise AH'nin en büyük risk faktörüdür. AH, hastalığın ne zaman ortaya çıktığına ve kalıtsal olup olmadığına göre sınıflandırılabilir (Sheppard & Coleman, 2020).

Bir bireyin 65 yaşından sonra AH (geç başlangıçlı AH, GBAH) olma olasılığı yaklaşık %3'tür ve bu olasılık 85 yaşında %30'un üzerine çıkar (Alzheimer's-Association, 2019). AH vakalarının büyük çoğunluğu (>%95) sporadik ve geç başlangıçlıdır. GBAH'ın tanımlanmış genetik risk faktörleri immün yanıt, kolesterol metabolizması ve endozomal taşıma gibi farklı fonksiyonel sınıflarda kategorize edilebilir. İnflamasyon ve immün disfonksiyon, bilindiği üzere AH patogenezinin önemli bir özelliğidir (Tan & Gleeson, 2019).

Lipid ve kolesterol taşıması ve metabolizmasından sorumlu bir lipoproteini kodlayan apolipoprotein E (APOE) geninin üç ana izoformundan ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$) $\epsilon 4$ aleli, bir bağlantı analizi ile tanımlandığı üzere ~%13,7 alel sıklığıyla GBAH'ın en yaygın ve iyi bilinen genetik risk faktörüdür. Bu alel için heterozigotluk AH riskini 3 kat artırırken

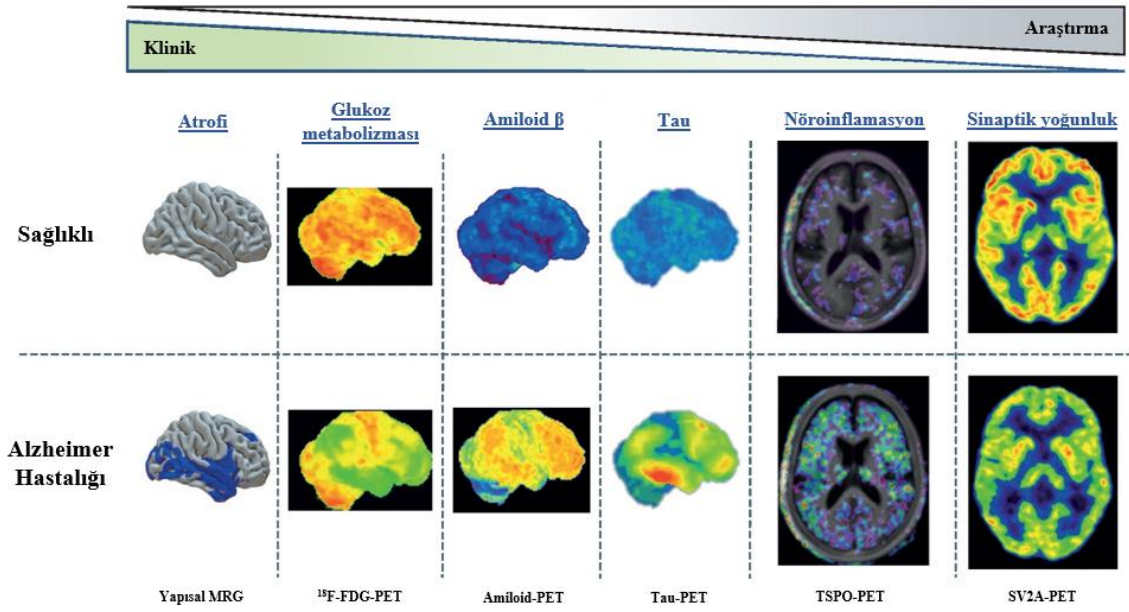
homozigot taşıyıcılar ~12 kat AH riskine sahiptir. APOE ε2 alelinin ise AH riskine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (Sheppard & Coleman, 2020; Tan & Gleeson, 2019).

AH riski ile ilişkili varyantları olduğu bilinen diğer genler arasında *TREM2* (myeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör 2), *CLU* (clusterin), *SORL1* (bir nöronal apolipoprotein E reseptörü olan sortilin-ilişkili reseptör), *BIN1* (Myc-box'a bağlı-etkileşimli protein 1) ve *PICALM* (fosfatidilinositol-bağlayıcı klatrin düzenek proteini) bulunur (Sheppard & Coleman, 2020).

65 yaşın altındaki AH (erken başlangıçlı AH, EBAH) insidansı daha az kesindir. Çünkü, normal yaşlanma sırasında da glukoz hipometabolizması, kolesterol dishomeostazı, mitokondri disfonksiyonu, depresyon ve bilişsel gerileme gibi çeşitli durumların ortaya çıkabiliyor olması EBAH olgularını ayırt etmeyi zorlaştırır (Breijyeh & Karaman, 2020). Ancak tahminler bu yaş grubunun AH vakalarının yaklaşık %3'ünü oluşturduğunu göstermektedir (Alzheimer's-Association, 2019). EBAH semptomları, GBAH'dan çok daha erken gelişir ve tipik olarak 65 yaşından önce, bazı vakalarda ise 30 yaş kadar erken ortaya çıkar. AH'nin ailesel erken başlangıcı genellikle Amiloid öncül proteini (*APP*), Presenilin 1 (*PSEN1*) veya Presenilin 2'de (*PSEN2*) nadir görülen kalıtsal otozomal dominant genetik mutasyonların bir sonucu olarak gelişir (Tan & Gleeson, 2019). *APP*, AH'ye neden olan otozomal dominant mutasyonlara sahip olduğu gösterilen ilk gendir ve şu anda, ailesel vakaların yaklaşık %10'unu oluşturan 50'den fazla bilinen *APP* mutasyonu vardır. Çok nadir durumlarda, *APP* duplikasyonu veya promotör mutasyonları AH'ye neden olabilir. *PSEN1* varyantları ise ailesel EBAH vakalarının yaklaşık %30-50'sini oluşturduğu tahmin edilen ve ailesel EBAH'ın en yaygın bilinen Mendel genetik nedenidir (Sheppard & Coleman, 2020).

2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi

AH'nin neden olduğu nörodejenerasyon; amiloid ve tau toksisitesine sıklıkla eşlik eden şekilde nöropatolojik olarak nöropil iplikleri, aksonal, metabolik ve nörovasküler disfonksiyon, distrofik nöritler, astrogliosis ve mikrogliya aktivasyonunun varlığıyla inflamatuvar değişiklikler, büyüme faktörü trafiğinde bozulma, kan beyin bariyeri (KBB) yıkımı, DNA hasarı, sinaptik plastisite kaybı ve disfonksiyonu, nöron ve sinaps kaybı, hücre ölümü ve sonunda makroskopik beyin atrofi ile sonuçlanabilmektedir (Samanta ve ark., 2022; Serrano-Pozo ve ark., 2011).



Şekil 2-2: Farklı radyoaktif işaretleyiciler kullanılarak, yapısal MRG veya PET ile elde edilen beyin görüntüleri.

Üstte sağlıklı kontrollerin, altta geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının beyin görüntüleri yer almaktadır. Chetelat, Arbizu ve ark. 2020'den uyarlanmıştır.

Şekil 2-2'de klinikte ve araştırmalarda sağlıklı ve AH olan bireyleri karşılaştıran bir şekilde, yapısal MRG (manyetik rezonans görüntüleme) veya PET (pozitron emisyon tomografisi) taramalarının kullanımı ve farklı radyoaktif işaretleyiciler yardımıyla atrofi, glukoz metabolizması, amiloid β, tau, nöroinflamasyon veya sinaptik yoğunluğun elde edilebildiği örnek beyin görüntüleri gösterilmektedir (Chetelat ve ark., 2020). Multifaktöriyel bir hastalık olan AH'nin patogenezi ve ilerlemesinde yer alan önemli patofizyolojik süreçlerin detaylı örneklendirmesi ise Şekil 2-3'te mevcuttur.



Şekil 2-3: Multifaktöriyel AH patogenezi ve ilerlemesinde kritik rol oynayan beyindeki çeşitli patofizyolojik süreçler

Samanta, Ramesh ve Govindaraju 2022'den adapte edilmiştir.

2.1.1.1. Amiloid Öncül Proteini, Amiloid Beta Peptidi'nin Üretimi ve Amiloid Plaklar

İnsanlarda 21. kromozomda bulunan *APP* geni tarafından kodlanan Amiloid öncül proteini (APP), büyük bir hücre dışı bölgesi bulunan, tip I transmembran glikoproteinidir. APP endoplazmik retikulumda sentezlenir ve daha sonra Golgi aygıtı yoluyla trans-Golgi ağına (TGN) taşınır ve burada kararlı durumda daha yüksek konsantrasyonuna kadar depolanır (Tan & Evin, 2012). APP; homolog olan APP benzeri protein 1 ve 2 (APLP1 ve APLP2) proteinlerini de içeren yüksek oranda korunmuş olan APP ailesinin bir üyesidir. Memeli APP ailesinin üyeleri, beyinde bol miktarda eksprese edilir. Bunlar arasında, APLP1'in ifadesi nöronlarla sınırlıdır. Bununla birlikte, APP ve APLP2 beyinde oldukça zengin olmasına rağmen, beyin dışında da yaygın olarak ifade edilirler (Zheng & Koo, 2011).

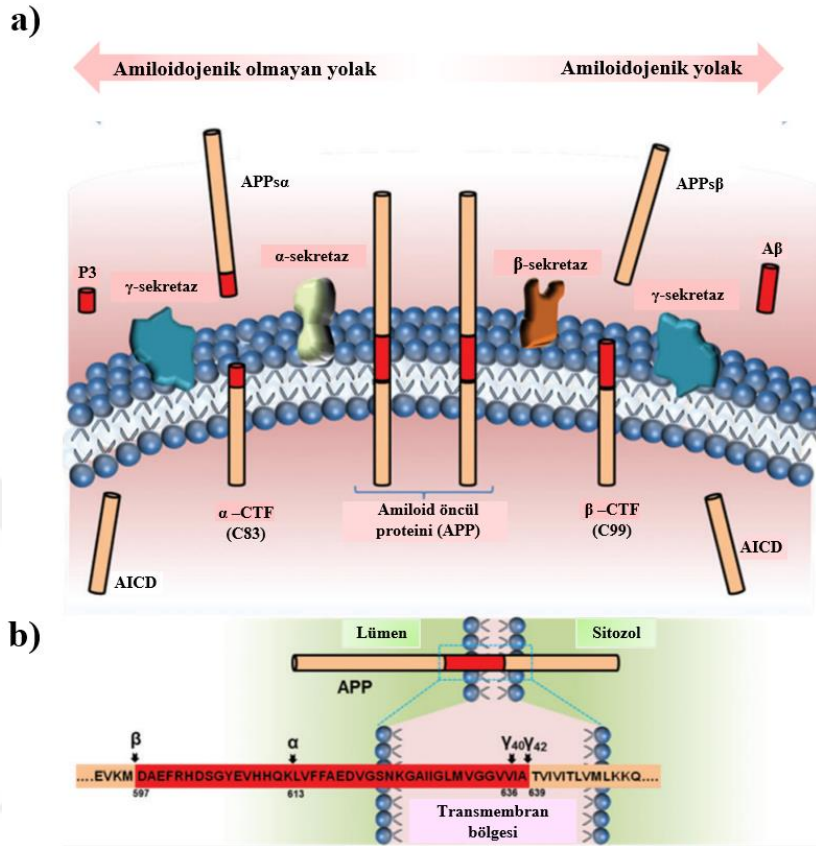
APP'nin alternatif kırılması, sayısı 365 ila 770 (APP365–APP770) arasında değişen kodlanmış amino asit kalıntılarıyla birden fazla APP mRNA izoformunun üretilmesiyle sonuçlanır (Zheng & Koo, 2011). Ek olarak, APP'nin farklı izoformları ayrıca spesifik ekspresyon bölgelerine ve farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Guo ve

ark., 2021). APP'nin üç ana kırılmış izoformundan (APP695, APP751 ve APP770), beyindeki birincil APP kaynağı ve APP'nin ilk klonlanmış izoformu olan APP695, A β ve transkripsiyonel olarak aktif hücre içi C-terminal alanın (AICD) amiloidojenik yolak yoluyla seçici bir şekilde işlenerek üretilmesine neden olan baskın nöronal formdur (Nalivaeva & Turner, 2013). Beyne özgü APP izoformlarının ekspresyonu ve işlevi kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, diğer APP izoformları cilt, miyotüpler, akciğer, böbrek, yağ dokusu, pankreas, karaciğer ve bağırsaklar gibi diğer birçok dokuda eksprese edilmektedir (Guo ve ark., 2021; Zheng & Koo, 2011). Fizyolojik olarak, mutasyona uğramamış APP'nin, nörit gelişimi, hücre sağkalımı, hücre büyümesi ve mobilitesinin düzenlenmesi, iyonların taşınması ve sağlıklı sinaptik yoğunluk ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (van der Kant & Goldstein, 2015).

APP, yapısal ve düzenlenmiş şekilde belirli proteazlar tarafından farklı kesim bölgelerinden biyolojik fonksiyonlara sahip birkaç peptit olarak işlenebilir (Samanta ve ark., 2022). Doğal olarak meydana gelen APP metabolizmasının iki farklı yolağı vardır. APP metabolizmasının %90'ından fazlası normalde (amiloidojenik olmayan yolak) APP'nin tip I transmembran proteini ve bir çinko metalloproteaz olan α -sekretaz tarafından işlenerek hücre-substrat adezyonunda ve nöral korumada bir rolü olan patojenik olmayan büyük çözünür ektodomain APPs α peptidini ve C-terminal fragmanı α -CTF'yi (C83) oluşturmasını ve ardından α -CTF'nin γ -sekretaz tarafından kesilmesiyle, küçük hidrofobik p3 fragmanını ve APP'nin hücre içi alanının (AICD) serbest bırakılmasını içerir (Tiwari ve ark., 2019). α -sekretaz, APP'yi A β peptit bölgesi içinden kestiği için çözünmeyen ve nörotoksik A β peptit oluşumunu önler ve bu yolağın aktivasyonu bu nedenle potansiyel olarak nöroprotektiftir (Nalivaeva & Turner, 2013).

APP metabolizmasının diğer yolağı olan amiloidojenik yolak ise, jenerik olarak β - ve γ -sekretazlar olarak adlandırılan iki membrana-bağlı aspartil proteazın ardışık eylemlerini içerir (Nalivaeva & Turner, 2013). Bu yolak, yalnızca A β 'yı değil, AICD fragmenti dahil olmak üzere tümü AH'ye yol açan patolojik süreçlere katkıda bulunabilecek veya bunları iyileştirebilecek bir dizi başka fizyolojik olarak aktif metabolit üretir. Kısaca ilk ve hız sınırlayıcı adım olarak β -sekretaz, APPs β ve 99 amino asitlik bir fragman olan (A β 'nın N-terminal aspartil tortusu ile başlar) β -CTF'yi (C99) oluşturmak üzere APP'yi A β alanı ve APP luminal alanının arayüzeyinden kırpar. β -CTF

daha sonra A β peptidini ve AICD'yi serbest bırakmak için γ -sekretaz tarafından kesime uğrar (Rajasekhar ve ark., 2015; Tan & Gleeson, 2019) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: APP'nin proteolitik işlenmesi

A) APP'nin amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollardaki proteolitik işlenmesi; B) APP'nin şematik yapısı. α , β ve γ -sekretaz tarafından başlıca kesim bölgeleri, N-terminalinden numaralandırılmış A β ile birlikte gösterilmektedir. Rajasekhar ve ark. 2015'ten uyarlanmıştır.

α -sekretaz, bir Disintegrin ve Metalloproteaz (ADAM) protein ailesinden ADAM9, ADAM10 ve ADAM17'yi içerir ve ADAM10 ile ADAM17, nöronlardaki baskın α -sekretazlar olarak kabul edilmektedir. α -sekretazın APP'ye ilaveten diğer substratları arasında Notch reseptörleri, tümör nekroz faktörü (TNF), epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptör ligandları, kaderinler ve interlökin 6 (IL-6) reseptörü bulunur (Wilkins & Swerdlow, 2017).

APPs α , normal sinaptik sinyalleşme, yeterli sinaptik plastisite ve nöronal sağkalımda önemli bir role sahiptir ve eksitotoksisteye karşı koruyucudur. APPs α ayrıca nöral kök hücre proliferasyonunu düzenler, erken merkezi sinir sistemi (MSS) gelişimi için önemlidir ve öğrenme, hafıza, duygusal davranış ile ilişkilidir (Sery ve ark., 2013; Tiwari ve ark., 2019).

β -sekretaz, aktif bölgesi lümende yer alan membrana bağlı, asidik bir pH ortamında en yüksek aktiviteye sahip bir aspartil proteazdır. β -sekretaz enziminin, >%65 homolog olan Beta-alanı amiloid öncül protein kesim enzimi 1 ve 2 (BACE1 ve BACE2) olmak üzere iki ana formu vardır. APP metabolizmasında yer alıp $A\beta$ üretiminden sorumlu ana form olan BACE1 enzimi, beyinde yüksek oranda eksprese edilir, diğer organlarda ise daha düşük seviyelerde bulunur. Buna karşılık, BACE2 beyinde düşük olup çoğu periferik dokuda daha yüksek seviyelerde bulunur. BACE1, APP'nin ötesinde miyelin, voltaja bağlı sodyum kanalları, glikoprotein ligand 1'i seçen trombosit, tip II α 2,6 sialitransferaz ve interlökin benzeri reseptör tip II kesiminde de görev alır (Wilkins & Swerdlow, 2017). Farelerde BACE1'in nakavt edilmesi (ancak BACE2'nin değil), beyindeki enzimin aşağı akış ürünlerinin ($A\beta$ ve CTF β) seviyelerinde büyük bir azalmaya yol açmıştır. Çalışmalar, BACE1'in beyindeki ana β -sekretaz aktivitesi olduğunu gösterse de her iki formun ekspresyonu yaşla birlikte sporadik AH'lerin beyin korteksinde anlamlı ölçüde artmaktadır. Bu etki, hastalıktan etkilenen bölgelere paralel bir seçicilik gösterir ve hem plak yükü hem de hastalık süresi ile ilişkilidir (Murphy & LeVine, 2010; Sery ve ark., 2013).

APPs β , ölüm reseptörü 6'nın ligandı olarak bir fonksiyona sahiptir, aksonal budama ve nöronal hücre ölümüne aracılık eder. β -sekretazın kesiminden sonra γ -sekretaz tarafından kesime uğrayana dek membranla ilişkili kalan β -CTF'nin aşırı üretimi ise sitotoksik bir etkiye sahiptir ve nöronal dejenerasyona neden olur (Sery ve ark., 2013). Ayrıca γ -sekretaz tarafından hem α -CTF hem de β -CTF'nin kesimi, çözünür halde nükleusa yer değiştirip nükleer sinyalleşmeyi, gen ekspresyonunu ve düzenleme yollarını kolaylaştırabilen AICD'yi sitoplazmada serbest bırakmaktadır (Tiwari ve ark., 2019).

γ -sekretaz, başlıca dört ayrı proteinden oluşan büyük bir komplekstir: Bunlara presenilin 1 ve 2 (PS, PS1 veya PS2), nikastrin, anterior farinks-kusurlu-1 (APH-1) ve presenilin arttırıcı-2 (PEN-2) dahildir. Bu dört altünitenin tümü, γ -sekretazın olgunlaşması ve doğru şekilde işlev görmesi için gereklidir (Murphy & LeVine, 2010). PS1 ve PS2 homologları, γ -sekretazın katalitik alanını oluşturur. Presenilinlerdeki 1000'den fazla nokta mutasyonu, AH'nin ailesel formlarının çoğundan sorumludur (Sery ve ark., 2013). PS1 ve PS2'ye ek olarak, γ -sekretaz kompleksinde bulunan APH-1 bir

dengeleyici/stabilizör olarak işlev görebilir, PEN-2 bir düzenleyici/aktivite arttırıcı olarak ve nikastrin bir substrat reseptörü olarak görev alır (Wilkins & Swerdlow, 2017).

APP'nin bu bölümde anlatılan amiloidojenik olmayan yolak boyunca α -sekretaz ve γ -sekretaz yoluyla proteolizi, sağlıklı beyinden temizlenen çözünür ve toksik olmayan peptit fragmanları üretmektedir. Ancak patolojik olmaya eğilimli koşullar altında, mutasyona uğramış APP, değişken uzunlukta (37-43 amino asit) A β peptitleri üretmek için β -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından sıralı proteolize uğrayarak AH beyinde çözünmeyen A β plaklarının oluşumuna, yanlış katlanmasına, kendi kendine kümelenmesine ve birikmesine yol açar ve amiloid yükü, AH patogenezinde merkezi bir rol oynar (Samanta ve ark., 2022). APP'den türetilen bu ~4 kDa A β peptidi, tarihte ilk olarak AH ve Down Sendromlu hastaların beyin ve serebrovasküler yapısındaki amiloid birikintilerinin ana bileşeni olarak izole edilmiştir (Murphy & LeVine, 2010).

AH patogenezinin yaygın teorisi olan amiloid hipotezi, beyinde üretilen patolojik A β formlarının birikiminin, A β üretimi ve yıkımı arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanan birincil patolojik süreç olduğunu öne sürer. NFT'lerin oluşumu ve devamında nöronal işlev bozukluğu ve nörodejenerasyonun, muhtemelen inflamasyon aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. A β 'nın merkezi bir rolü için güçlü destek, genetikten gelmektedir: tüm ailesel AH mutasyonları, A β oluşumunda veya işlenmesinde yer alır ve toksik β -amiloid formlarının göreceli olarak aşırı üretimi ile sonuçlanır. Tersine, bir APP missense mutasyonu (İzlanda-A673T), β -sekretaz tarafından APP kırılmasında ömür boyu azalma ile sonuçlanır ve bu da klinik olarak AH riskini azaltır. Ek olarak, sporadik hastalıkta, ApoE, diğer birçok risk geninde olduğu gibi amiloid klirensinde yer alır (Lane ve ark., 2018). APOE ϵ 4 alelinin dozajı, beyinde artan A β birikimi, A β oligomerleri ve amiloid plak oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, APOE ϵ 4'ün AH'nin patogenezinin katkısının koruyucu fonksiyon kaybından mı, toksik fonksiyon kazanımından mı yoksa her ikisinden mi kaynaklandığı henüz net değildir (Tan & Gleeson, 2019).

Amiloid plakların oluşumunda ve indüklenen nörotoksisitede doğrudan rolü olan iki ana A β türü vardır: A β ₁₋₄₀ ve A β ₁₋₄₂. Üretilen A β peptitlerinin çoğu (~%90'ı) nöronlardan A β ₁₋₄₀ olarak salgılanır ancak A β ₁₋₄₂'den daha az nörotoksiktir. A β ₁₋₄₂, daha az bulunur, yüksek oranda çözünmeyen (hidrofobik) yapıdadır, ciddi derecede nörotoksiktir ve ilave iki hidrofobik C-terminal amino asidinin (izolösin ve alanin)

sonucu olarak daha güçlü bir agregasyon yatkınlığına sahip olmakla birlikte dimerlere, toksik polimorfik agregasyon türlerine (alloformlar) yani düşük moleküler ağırlıklı çözünür oligomerlere ve plaklar halinde kümelenen çözünmeyen amiloid fibrillere kendiliğinden bağlanarak veya kendi kendine polimerizasyona maruz kalarak (Sery ve ark., 2013) A β düzeneğinin toksik bir yapı fraksiyonu olarak hareket eder (Tiwari ve ark., 2019). AH'de beyin omurilik sıvısı (BOS) A β ₁₋₄₀ seviyeleri değişmez veya marjinal olarak yükselir. Bu nedenle, AH'de tutarlı bir şekilde A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ oranında bir azalma veya A β ₁₋₄₀/A β ₁₋₄₂ oranında bir artış gözlemlenmektedir ve bu oran ailesel AH'de hastalık başlangıç yaşı ile yakından ilişkilidir (Murphy & LeVine, 2010). Normal insan beyinde belirli bir A β konsantrasyonu (pikomolar) her zaman mevcuttur ve literatürde, A β 'nin nöral plastisite, sinaps oluşumu, metal sekestrasyonu ve homeostazdaki rolü vurgulanmaktadır (Rajasekhar ve ark., 2015). Ancak AH'de hastalığın ilerlemesi ve bilişsel işlevlerin azalmasıyla doğrudan ilişkili bir şekilde A β monomerlerinin konsantrasyon seviyeleri sırasıyla beyinde yükselirken BOS'ta düşer (Samanta ve ark., 2022).

Biriken kanıtlar, protofibriller veya tamamen büyümüş fibrillerle karşılaştırıldığında oligomerlerin A β 'nin en toksik formu olduğunu göstermektedir. Toksik A β agregasyon türleri, yanlış katlanmış A β peptitlerinin sağlıklı nöronların içine alınmasını sağlayan nöronal plazma membranıyla etkileşime girer ve zarar verir (Samanta ve ark., 2022). Hücrede bloke iyon kanalları, değişen kalsiyum ve metal homeostazı, artan mitokondriyal oksidatif stres ve aşırı ROS üretimi, azalan enerji metabolizması ve glukoz regülasyonu, inflamasyon ve tau fosforilasyonu gibi çeşitli patolojik olaylar amiloid yüküyle yakından ilişkili olarak gözlemlenir (Tiwari ve ark., 2019). Çözünmeyen A β agregasyon türleri, aksonal ve dendritik atrofiye neden oldukları için olgun nöronlar için oldukça nörotoksiktir. A β oligomerleri, sinaptik yarıklara yayılıp nöronal sinyalleşme kaskadını bozarak ve örneğin sinaptik iletim ve sinaptik plastisitede kilit rol oynayan N-metil-D-aspartat (NMDA) ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMPA) reseptörlerinin endositozlarını regüle ederek ve yüzey ekspresyonlarını düzenleyerek ve/veya inhibe ederek (Snyder ve ark., 2005) sinaptik fonksiyon bozukluğuna, nöronal devrelerde zayıflamaya, hippocampal uzun süreli potansiyasyon (LTP) oluşumunun azalmasına ve beyin bölgelerine özgü bir şekilde nöronal ölüme yol açar (Samanta ve ark., 2022).

Sonuç olarak A β , Ulusal Yaşlanma ve Alzheimer Derneği (NIA-AA) Araştırma Çerçevesi 2018 tarafından kesin biyobelirteçlerden biri olarak belirlenmiştir. Genel olarak, A β yükünün katılımı, AH'nin çok faktörlü doğasını anlamak için geniş çapta çalışılmış ve kabul edilmiştir ve AH patolojisini değiştirmek için umut verici bir terapötik hedef haline gelmiştir (Samanta ve ark., 2022).

2.1.1.2. Nörofibriler Yumaklar

Nörofibriler yumakların (NFT'lerin) yapısal birimi, tüm nöronlarda üretilen ve ayrıca gliada tespit edilen sitoplazmik mikrotübül ile ilişkili bir protein (MAP) olan tau'dur. Fizyolojik olarak tau, mikrotübüllerin oluşumu ile stabilitesine ve aksoplazmik taşımaya katılır (Lista ve ark., 2015), sinyal yollarının modülasyonunda rol oynar (Soria Lopez ve ark., 2019), nörit büyümesi ve nöronal morfolojinin korunması gibi normal işlevleri sürdürmek için de gereklidir (Greene ve ark., 2020). Mikrotübül bağlantısı, tau ekspresyonu ile fosforilasyon derecesi arasındaki hassas etkileşim tarafından kontrol edilir. Fizyolojik koşullarda, fosforile olan ve olmayan tau formları dengededir (Lista ve ark., 2015). Ancak beyinde tau'nun bazı amino asit kalıntılarının hiperfosforile edilmesi, tau'nun normal fizyolojik işlevini azaltır ve AH ve tauopatiler gibi çeşitli nöronal bozukluklara yol açar (Samanta ve ark., 2022). Halihazırda, tau üzerinde konumlanmış, 79'u serin veya treonin amino asitinde bulunan 85 fosforilasyon bölgesi tanımlanmıştır (Lista ve ark., 2015). Hiper-fosforilasyon, tau genlerindeki bir mutasyon veya Fyn kinaz, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK3 β) ve sikline bağımlı kinaz-5 (CDK5) gibi çeşitli kinazların ve fosforilasyon sürecini katalize eden fosfatazların düzensizliğinden kaynaklanmaktadır (Khan ve ark., 2020).

AH'deki tau hipotezi başlangıçta bağımsız bir yol olarak kabul edilirken, son çalışmalar amiloid hipotezi ile örtüşen bağlantılar kurmuştur (Samanta ve ark., 2022). AH koşulları altında amiloid β ; kalpini aktive eder ve CDK5 kinazının bir aktivatörü olan p35'i deregüle eder. Sitosolik kalsiyum aşırı yüklenmesi nedeniyle p35, CDK5'i hiperaktive eden ve tau'nun hiper-fosforilasyonuna yol açan p25'e bölünür (Khan ve ark., 2020). Böylece CDK5'in, nörofibriler yumakların oluşumunda potansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir (Khan ve ark., 2020). Ayrıca, tau'nun farklı bölgelerdeki fosforilasyonu işlevini değiştirebilir. Örneğin, mikrotübül bağlanma alanı içindeki serin 262 fosforilasyonunun, tau'nun mikrotübüllere bağlanma afinitesini en güçlü şekilde azalttığı bildirilmiştir (Greene ve ark., 2020).

Bu anormal fosforilasyonlar nedeniyle, fosforile tau (p-tau), kararsız hale gelen aksonal mikrotübüllerden ayrılarak, önce mikrotübül disfonksiyonu ve dengesizliğine yol açar (Lista ve ark., 2015), tubulin ilişkili proteinlerin kaybına neden olur ve ardından NFT'leri oluşturmak üzere çift sarmal filamentler (PHF) halinde nöronal perikaryonda ve nöropil iplikleri oluşturmak üzere nöronal dendritlerde agregat oluşturur (Lista ve ark., 2015). Zamanla, bu lezyonlar çok sayıda temel hücre içi fonksiyona müdahale eder (Ashraf ve ark., 2014); sinyal kaskadlarını, mitokondriyal işlevi, aksonal taşımayı bozarak presinaptik ve postsinaptik kompartmanları etkileyebilir (Soria Lopez ve ark., 2019). Amiloid yükünden önemli ölçüde etkilenen yanlış katlanmış taunun nörondan nörona transsinaptik olarak taşındığı ve beyinde yayıldığı gösterilmiştir. Ek olarak, apolipoprotein E4 (APOE4) p-tau'nun AH beyninden temizlenmesini azaltarak birikimini arttırmaktadır (Samanta ve ark., 2022). Bu şekilde tau nörotoksiteye, dejenerasyona ve hücre ölümüne sebep olur (Greene ve ark., 2020).

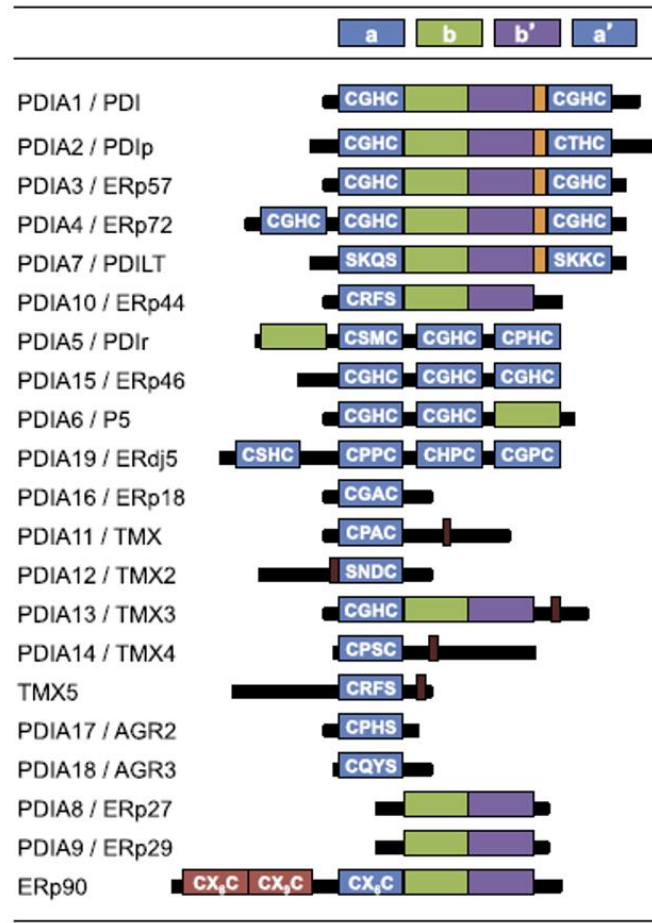
Hiperfosforile tau proteininin gelişimi ile yayılımı, NFT'lerin sıradaki morfolojik aşamalarını yansıtabilir: (1) NFT'nin bir türü olarak, PHF oluşumu olmadan somatodendritik bölgede fosforile edilmiş tau proteinlerinin biriktiği 'yumak-öncesi faz', (2) nükleusun somanın periferik kısmına yer değiştirmesiyle tau proteininin filament agregasyonu ile karakterize edilen 'olgun NFT'ler' ve (3) proteolize karşı kısmi dirençli büyük miktarlarda filamentli tau proteinine bağlı nöron kaybından kaynaklanan 'hücre dışı yumaklar veya hayalet NFT'ler' (Breijyeh & Karaman, 2020). Hiperfosforile tau proteininin yayılımı, Braak aşamaları olarak bilinen NFT'lerin beyinde iyi karakterize edilmiş ilerleyici bölgesel dağılımı ile sonuçlanır (Soria Lopez ve ark., 2019) (**Şekil 2-1**). Nöron ve sinaps kaybı tipik olarak yumak oluşumuna paraleldir ve bu nedenle Aβ patolojisi hastalığın semptomatik fazında erken bir platoya ulaşırken AH'nin klinik özellikleri ve şiddeti ise NFT patolojisi ile daha fazla ilişkilidir (Lane ve ark., 2018). Örneğin NFT sayısı biliş düşüşü ile yakından bağlantılıdır (Soria Lopez ve ark., 2019). AH patolojisinde tau'nun belirgin rolü göz önüne alındığında, NIA-AA Araştırma Çerçevesi 2018, tau'yu (p-tau ve NFT) temel biyobelirteçlerden biri olarak ilan etmiştir (Samanta ve ark., 2022).

2.2. Protein Disülfid İzomeraz Ailesi

Protein Disülfid İzomerazlar (PDI'lar), ökaryotik hücrelerde dizi ve yapısal homolojiye göre sınıflandırılan tioredoksin (TRX) süper ailesinin bilinen 21 üyesinden

oluşan, hücrede yaygın ve bol miktarda bulunan büyük bir oksidoredüktaz enzim ailesidir (Andreu ve ark., 2012; Turano ve ark., 2011) (**Şekil 2-5**). PDI'lar esas olarak endoplazmik retikulum (ER) lümeninde lokalizeyken, sekretuar yoldan geçen yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması sırasında kritik olan tiyol-disülfid dönüşümlerini, disülfid bağlarının (-S-S-bağları) oluşumunu (oksidasyonunu), indirgenmesini (redüksiyonunu) ve yeniden şekillenmesini (izomerizasyonunu) katalize ederek fizyolojik/patofizyolojik roller oynayan ve kalite kontrol sisteminin bir parçası olarak katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonunu önlemeye yardım eden önemli moleküler şaperonlar olarak işlev görebilmektedir (Chichiarelli ve ark., 2022; Galligan & Petersen, 2012). PDI ailesi üyelerinin protein dizilerinin C-terminalinde bir ER tutulum dizisi bulunmasına rağmen bazı PDI'ların, ER'nin yanı sıra, sitozol, mitokondri, nükleus, plazma membranı ve hücre dışı boşluk dahil olmak üzere birçok hücre altı bölgede bulunduğu gösterilmeye başlanmıştır. Geniş hücrel dağılımları, birçok biyolojik sürece ve hücrel homeostazın korunmasına doğrudan veya dolaylı katılımlarını vurgular (Andreu ve ark., 2012).

PDI ailesi üyeleri, aile içinde uzunluk, moleküler ağırlık, ekspresyon, konum, enzimatik aktivite, substrat spesifikliğı bakımından farklılık (Mahmood ve ark., 2021) ve yapısal-fonksiyonel çeşitlilik ile sonuçlanan, Trx-benzeri katalitik a alanlarının (a veya a') ve katalitik olmayan b alanlarının (b veya b') modüler bir düzenlemesi ile karakterize edilir (Andreu ve ark., 2012) (**Şekil 2-5**). Her alan, değışkenlik gösteren α -heliks ve β -tabakalarıyla Trx-benzeri bir kat içerir (Hettinghouse ve ark., 2018). Katalitik aktivite sergileyen a alanları, yeni sentezlenmiş proteinlerin tiyolları ile reaksiyona giren ve PDI'ların redoks potansiyelini ve bir redüktaz, oksidaz veya izomeraz olarak rollerini belirleyen ve "Trx-motifi" veya "Trx-kıvrımı" olarak da bilinen kanonik Cys-X-X-Cys (CXXC) aktif bölge tetrapeptid dizisi ile karakterize edilir (Andreu ve ark., 2012). PDI ailesi arasında en yaygın aktif bölge motifi, PDIA1, PDIA3 ve ERp72'de de bulunan Cys-Gly-His-Cys'dir (CGHC) (Perri ve ark., 2017). Oksitlenmiş bir durumda, PDI'lar, oksidasyonlarını katalize ederek, indirgenmiş bir aktif bölgeye yol açan disülfidleri substrata aktarabilir. Tersine, indirgenmiş bir durumda substratın disülfidi indirgenebilir ve PDI aktif bölgesi tekrar oksidize olur. Katalitik olmayan b alanları, katalitik a alanlarının stabilizatörleri olarak işlev görür, substrat alımı ile bağlanmasından sorumludur ve kofaktörler için etkileşim alanları sağlar (Andreu ve ark., 2012).



Şekil 2-5: Protein Disülfid İzomeraz ailesinin üyeleri ve üyelerin yapıları

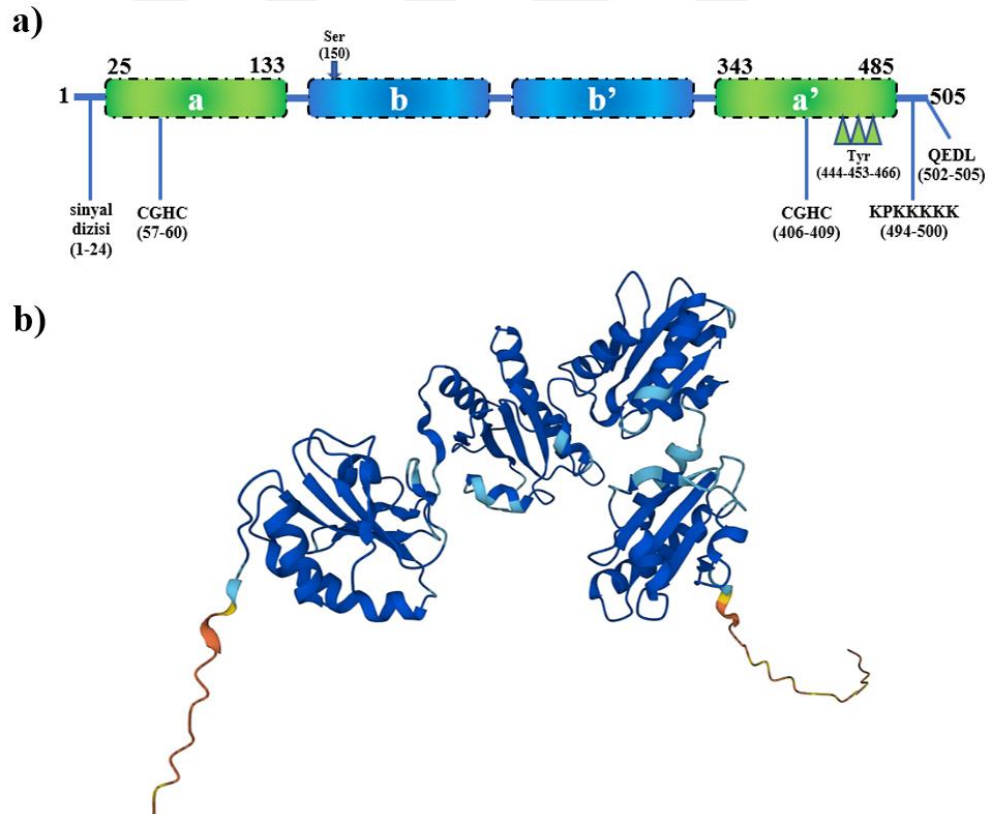
Protein disülfid izomeraz (PDI) ailesinin tüm üyelerinin protein yapısında bulunan alanlar; sırasıyla mavi (katalitik a ve a' alanları), yeşil ve mor (katalitik olmayan b ve b' alanları), turuncu (b' ve a' arasındaki x-bağlayıcı) ve koyu kırmızı (trans-membran bölgesi) olarak gösterilmiştir. Şekil, Andreu ve ark. 2012'den alınmıştır.

2.2.1. PDIA3, PDIA3'ün Yapısı ve Hücredeki Konumlarına Göre İşlevleri

ERp57 (endoplazmik retikulum-yerleşik proteini 57), ERp60, GRP58 (glukozla ilişkili protein 58) ve 1,25D3-MARRS (1,25 D3-membran ilişkili hızlı-yanıt steroid-bağlayıcı protein) olarak da bilinen PDIA3 (Protein Disülfid İzomeraz A3); 15. kromozomda yer alan *PDIA3* geni tarafından kodlanan, PDI ailesinin önde gelen çok işlevli bir üyesidir ve araştırma topluluğu tarafından büyük ilgi görmektedir. İlk 24'ü sinyal peptidini oluşturan 505 amino asite ve yaklaşık 57 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olan PDIA3, ilk olarak, glukoz tükenmesi ile indüklenen hücresel stresin ardından artan ekspresyona sahip, strese-duyarlı bir protein olarak tespit edilmiştir (Lee, 1981). Daha sonra, PDIA3'ün redoks ve protein disülfid izomeraz aktivitesi sergilediği (Bourdi

ve ark., 1995) ve hücreyi ER stresi ve protein yanlış katlanmasının neden olduğu apoptotik hücresel ölüme karşı koruyabileceği gösterilmiştir (Mahmood ve ark., 2021).

PDIA3'ün yapısı a, b, b' ve a' olmak üzere dört Trx benzeri alan içerir ve modüler yapısı PDIA1'inkine benzerdir, ancak PDIA3; C-terminal asidik bölgesinden yoksundur. Amino asit seviyesinde benzerlik katalitik a ve a' alanlarında en yüksektir (yaklaşık %50), katalitik olmayan b ve b' alanlarında ise en düşüktür (%20) (Mahmood ve ark., 2021). PDIA3'ün C-terminali, KDEL ER tutulum dizisine benzeyen ancak kanonik olmayan Gln-Glu-Asp-Leu (QEDL, 502QEDL505) dizisi ve bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS, 494KPKKKKKK500) içerir. N-terminal sinyal dizisi ise ilk ER lokalizasyonunu yönlendirir (Şekil 2-6A). Ek olarak, tüm memelilerde hemen hemen aynı formda bulunan PDIA3'ün, aşağıdaki şekilde de işaretlendiği üzere, sıçan PDIA3 proteininde translasyon sonrası 444., 453. ve 466. tirozinlerin veya 150. serinin fosforile edilebildiği tarif edilmiştir, ancak bu modifikasyonların proteinin özellikleri üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir (Turano ve ark., 2011) (Şekil 2-6A).



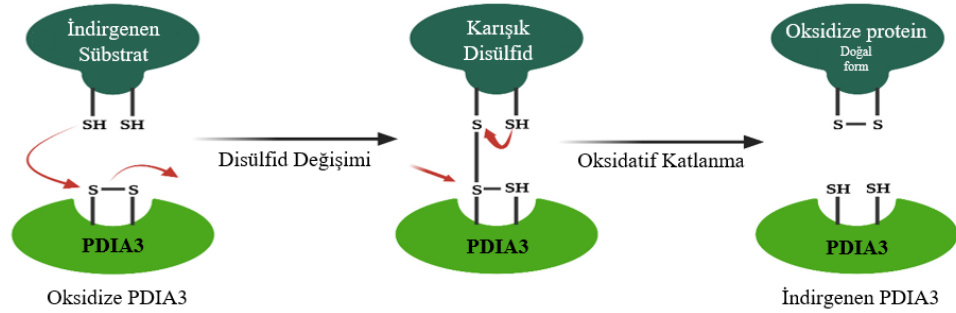
Şekil 2-6: PDIA3'ün moleküler yapısı

A) PDIA3'ün alan yapısının şematik bir temsili. Şekilde önemli fonksiyonel diziler ve deneysel olarak saptanan fosforilasyon bölgeleri gösterilmektedir. Numaralandırma insan proteinini ifade etmektedir. Turano ve ark. 2011'den

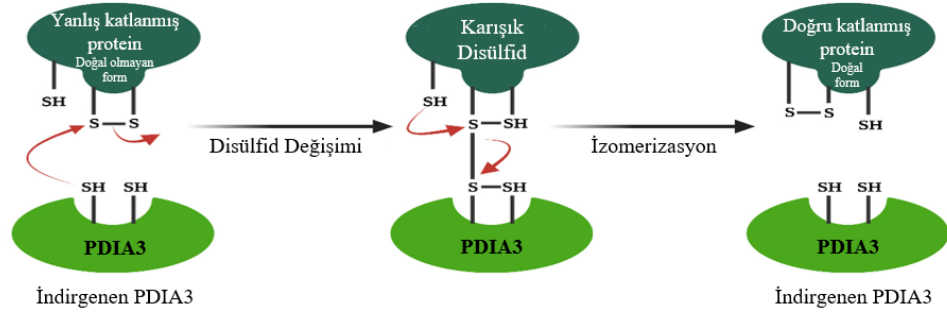
esinlenilerek hazırlanmıştır; B) PDIA3'ün üç-boyutlu konfigürasyonu. Rezidü-başına Güven Skoru'na (pLDDT'ye) göre renklendirme (koyu mavi en yüksek, turuncu en düşük) yapılmıştır. Proteinin tahmini yapısı; AlphaFold Protein Yapısı Veritabanı kullanılarak elde edilmiştir.

Kristalografik çalışmalardan elde edilen veriler ve klasik PDIA1 ile benzerliği, var olan dört alanın PDIA3 proteinine bir tür U-şekilli bir yapı verdiğini, bunun da a ve a' alanlarının birbirine yaklaşmasına ve başka bir protein ile etkileşime girmesine izin verdiğini göstermektedir (Turano ve ark., 2011) (**Şekil 2-6B**). Diğer yandan b alanları, PDIA3'ün tam aktivitesi için gerekli olmakla birlikte, aynı zamanda bir lektin olan ve dolayısıyla glikoproteinlere bağlanan kalretikulin veya membrana bağlı homologu olan kalneksin için bağlanma bölgeleri sağlayarak bağlı glikoproteinleri katalize tabi tutabilmektedir (Turano ve ark., 2011).

Disülfid Bağı Oluşumu



Disülfid Bağı İzomerizasyonu

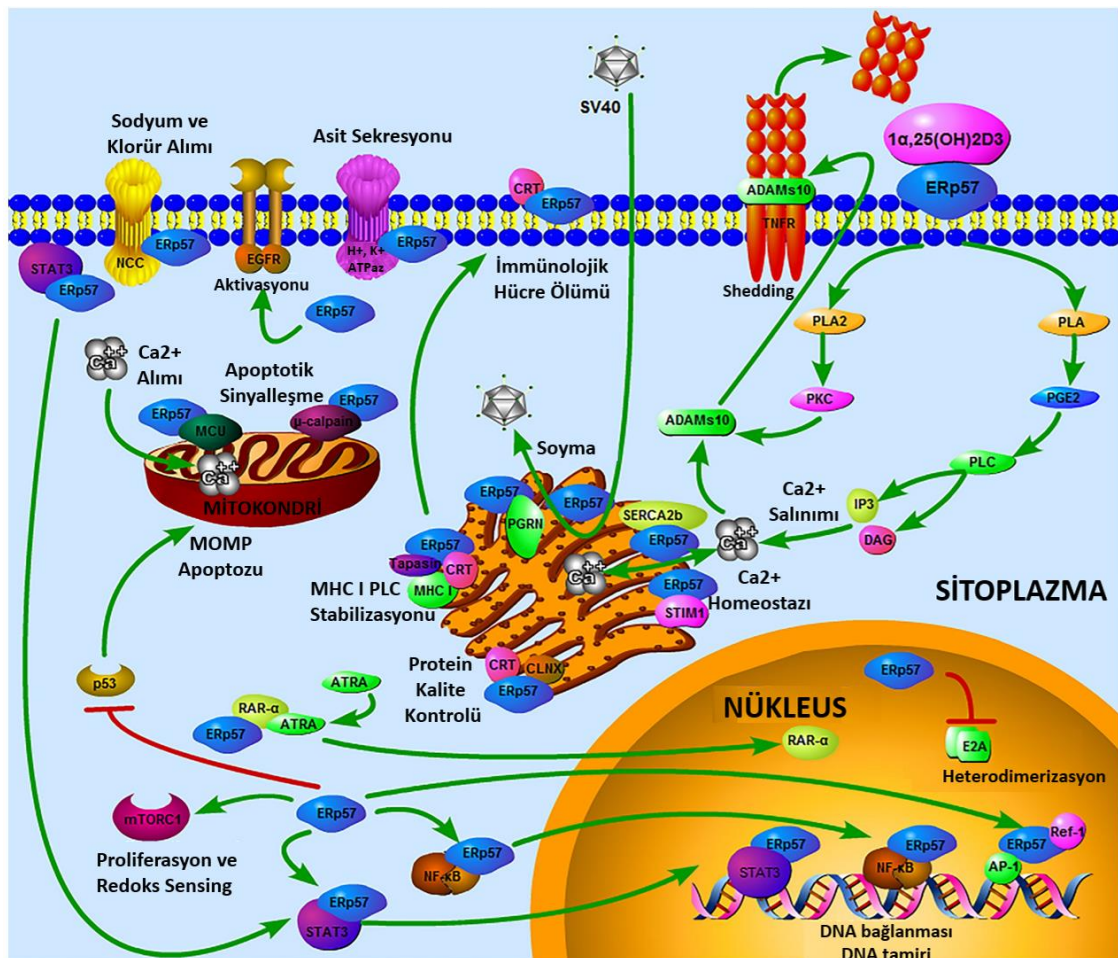


Şekil 2-7: PDIA3 ile indüklenen disülfid bağı oluşumu ve izomerizasyonu ile ilgili redoks reaksiyonları

PDIA3, ER'de katlanmış proteinlerin disülfid bağlarının (-S-S-bağları) oluşumuna (oksidasyonuna), indirgenmesine ve izomerizasyonuna (yeniden düzenlenmesine) katılmaktadır. Mahmood ve ark. 2021'den uyarlanmıştır.

Glikoproteinlere karşı diğer PDI'lara kıyasla daha yüksek özgüllüğe sahip olan PDIA3, ER şaperonları (kalneksin ve kalretikulin) ile işbirliğine dayalı bir etkileşimin aracılık ettiği şekilde, seçici olarak glikoproteinlerin disülfid bağlarının (-S-S- bağları) oluşumunu, indirgenmesini ve izomerizasyonunu katalize eder (Bargsted ve ark., 2016).

Tüm ökaryotik proteinlerin yaklaşık üçte birinde ve salgılanan proteinlerin yaklaşık %80'inde, sistein kalıntıları arasında yüksek düzeyde korunmuş disülfid bağlarının oluşum mekanizması meydana gelmektedir. Bu süreç, ER'de protein katlanmasının hız belirleyici basamağıdır. Disülfid bağı oluşumunda, sisteinlerin tiyol grupları (sülfhidril grupları) oksitlenir ve daha sonra ER'de oksidatif katlanma sırasında doğru konformasyonu elde etmek için yeniden düzenlenir. -S-S-bağı oluşumu ER'de ve mitokondriyal intermembran boşlukta (IMS) gerçekleştirilerek hem sekretuar hem membran proteinlerinin olgunlaşmasına ve tersiyer yapılarının stabilizasyonuna yardımcı olur (Mahmood ve ark., 2021) (**Şekil 2-7**).



Şekil 2-8: PDIA3'ün bağlanma partnerleri ve hücredeki konumuna göre işlevleri.

Hettinghouse ve ark. 2018'den uyarlanmıştır.

PDIA3, çoğu PDI ailesi üyesinin aksine, lokalizasyonunu ER lümenine etkili bir şekilde sınırlandırabilen bir C-terminali ER tutulum motifi içermemektedir ve bu şekilde ER'ye ek olarak çoklu hücresel kompartmanda belirli seviyelerde tespit edilmiştir. PDIA3'ün örneğin hücre yüzeyinde sinyal iletimine, nükleusta ise düzenleyici süreçlere

ve DNA tamirinde yer alan multimerik protein komplekslerine katılımını destekleyen çok sayıda gözlem vardır (Turano ve ark., 2011). PDIA3'ün ER dışındaki sunumu için önerilen açıklamalar arasında tutulum dizisinin proteolizi veya bu dizinin tanınmasını engelleyen komplekslerin oluşumu veya ER tutulum mekanizmasının doygunluğu yer almaktadır (Hettinghouse ve ark., 2018). PDIA3'ün çeşitli hücre altı lokalizasyonları ve bağlanma partnerleri (**Şekil 2-8**), birçok fizyolojik süreci ve hastalığı etkilemektedir. PDIA3 aktivitesinin/ifadesinin düzensizliğine veya anormal işlevselliğine neden olan düzenleyici yollardaki değişiklikler, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, metabolik hastalıklar, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve hava yolu inflamasyonu dahil olmak üzere çeşitli patolojilerle bağlantılı olarak rapor edilmiştir. PDIA3 ekspresyonu, bir dizi koşulda tanı ve/veya prognoz için yararlı bir biyobelirteç olarak incelenmektedir ve olası yeni bir farmakolojik hedef olarak önerilmektedir (Mahmood ve ark., 2021). Sıradaki bölümde, PDIA3'ün hücre altı bölmelerdeki fonksiyonlarına yer verilmektedir.

2.2.1.1. Endoplazmik Retikulum'da PDIA3

ER, hücre sağkalımı ve sinyalleşme için kritik olan birçok fonksiyona sahiptir. Bunlar arasında; protein olgunlaşması sırasında kalite kontrolü, yeni sentezlenmiş ve yanlış katlanmış proteinlerin modifikasyonu, steroid ve fosfolipid sentezi, Ca^{2+} homeostazının korunumu, ER ilişkili protein degradasyonu (ERAD) ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) yoluyla proliferasyon ve apoptozun düzenlenmesi yer alır. PDIA3, bu organel içerisinde gerçekleştirilen işlevlerin çoğuna katılır. Murinde fonksiyon kaybı modellerinin uygulanmasıyla, PDIA3'ün ER'deki işlevinin önemi güçlü bir şekilde gösterilmiştir. *PDIA3* geninin homozigot delesyonu embriyoda ölümle sonuçlanır. Heterozigot *PDIA3* delesyonuna sahip embriyolar yaşayabilse de hücrelerde sergilenen UPR aktivasyonu artışı ve ER stresinin neden olduğu apoptoz ve inflamasyonda artış meydana gelmektedir (Linz ve ark., 2015).

PDIA3 esas olarak, hücre dışına salınması veya hücre membranında lokalize olması amaçlanan neo-sentezlenmiş glikoproteinlerin doğru katlanmasına ve kalite kontrolüne protein disülfid izomeras aktivitesi yoluyla katıldığı ER'de bulunur. Bu aktiviteyi gerçekleştirmek için PDIA3'ün b' ve b alanları, monoglikosillenmiş proteinlerin tanınmasından ve bağlanmasından sorumlu olan lektinlerden kalretikulin (CRT) veya kalneksin (CNX) isimli paralog moleküler şaperon moleküllerinin P-alanı ile etkileşime girer (Oliver ve ark., 1999) (Kozlov ve ark., 2006). PDIA3, CRT/CNX ile

kompleks halindeyken, PDIA3'ün iki aktif izomeraz bölgesinden birindeki proksimal sistein ile bir monoglikosile protein sübstratı arasında yer değişmiş bir disülfidin-ara oluşumunu gerektiren bir süreç olan disülfid-yer değiştirme reaksiyonunu gerçekleştirir. Yer değişimi daha sonra aynı aktif bölgede bulunan distal sisteinin müdahalesi ile tamamlanır (**Şekil 2-7**).

PDIA3'ün ER'de diğer bir işlevi; Majör Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) Sınıf I'in Peptit Yükleme Kompleksinin (PLC) bir bileşeni olarak enfeksiyon ve immün yanıtta dolaylı fakat önemli bir rol oynamasıdır (Lindquist ve ark., 1998). MHC I yoluyla etkili bir antijen işlenmesi, peptit yükleme kompleksinin (PLC) oluşumunu gerektirir. PLC kompleksi; ağır zincir sınıf I proteinleri, $\beta 2$ mikroglobulin, kalretikulin, PDIA3, adaptör protein tapasin (Tsn) ve proteazomdan gelen peptitleri taşıyan antijen işlenmesiyle ilişkili taşıyıcıdan (TAP) oluşur. PLC'de PDIA3'ün a alanındaki Cys57 ile tapasinin Cys95'i disülfid bağı yoluyla etkileşime girer (Dick ve ark., 2002). Tapasin-PDIA3 kompleksi, MHC'nin düzgün oluşumu için gerekli olan ağır zincirlerin disülfid bağlarının azalmasının inhibisyonunda görev alır. Ayrıca, Tapasin-PDIA3 kompleksi, PDIA3'ün katalitik bir rolden ziyade yapısal bir rol gösterdiği PLC'nin oluşumu ve stabilizasyonu için gereklidir. PDIA3'ün baskılanması, PLC'nin stabilitesini etkiler ve hem hücre yüzeyinde MHC ekspresyonunu hem de PLC içindeki peptit yüklemesini azaltır (Garbi ve ark., 2006).

Kalsiyum (Ca^{2+}), hızlı sinyal entegrasyonu ve yanıtının yanı sıra daha uzun bir zaman ölçeğinde gen transkripsiyonundaki değişiklikler yoluyla çok çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen önemli bir ikincil habercidir (Berridge ve ark., 2003) ve Ca^{2+} iyonlarının depolandığı ana yer olan ER'deki Ca^{2+} homeostazı, kalsiyum sinyalleşmesinin ayrılmaz bir parçasıdır. ER membranında PDIA3, Ca^{2+} sensörü stromal etkileşim molekülü 1'in (STIM1) luminal alanına bağlanır ve bunun sonucunda depo kontrollü Ca^{2+} girişinin inhibisyonu yoluyla ER Ca^{2+} akışını düzenler (Prins ve ark., 2011). Ayrıca PDIA3 CRT ile birlikte hareket ederek Ca^{2+} iyonlarını sitozolden ER lümenine aktaran sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz 2b'nin (SERCA2b) intraluminal alanındaki sülfhidril gruplarının redoks durumunu düzenler ve PDIA3'ün aktif alanlarının katalitik aktivitesine ve Ca^{2+} 'a bağlı olan mekanizmayla SERCA2b'nin aktivitesi azaltılır (Li & Camacho, 2004). Dahili kalsiyum deposunun tükenmesi üzerine PDIA3 SERCA2b'den ayrıldığında; SERCA2b indirgenir ve pompanın aktivasyonu artış

gösterir. Bu etkileşimler, PDIA3'ün ER Ca^{2+} akışı ve homeostazındaki düzenleyici rolünü gösterir (Li & Camacho, 2004).

PDIA3 ayrıca viral enfeksiyonla ilişkilendirilmiştir. Simian virüsü 40 (SV40) endositoz yoluyla hücreye girip endoplazmik retikuluma taşındığında burada PDIA3, CRT/CNX bağlanmasından bağımsız olarak, virüsün sitozole ve ardından nükleusa translokasyonuna izin verecek şekilde kapsid proteinlerinin disülfid bağlarını izomerize ederek kapsid soyulmasında rol oynar (Schelhaas ve ark., 2007). Benzer şekilde, disülfid bağlarının PDIA3 aracılı izomerizasyonu, murin polioma virüs-enfeksiyonunun önemli bir adımı olarak önerilmiştir (Walczak & Tsai, 2011).

Fagositoz süreci ve özellikle yeni oluşan fagozomların oluşumu için membran sağlamak üzere hücre yüzeyine ER alımı gerçekleşebilmektedir (Desjardins, 2003). Proteomik bir analizle PDIA3, PDI, CRT ve CNX dahil olmak üzere ER'de birkaç yerleşik protein, fagozomların bileşeni olarak ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle fagositoz, patojenlerin yıkımı yoluyla doğal bağışıklık için önemli olmasının yanı sıra, MHC'lere peptitlerin yüklenmesine doğrudan katılarak edinilmiş bağışıklığa da katkıda bulunabilir (Desjardins, 2003).

ER'de farklı türdeki önemli süreçlere PDIA3'ün müdahalesinin gerektiği görülmektedir ve bu süreçlerin hepsinde PDIA3'ün hem tioredoksin benzeri aktif bölgelerindeki sisteinlerin reaktivitesinden hem de şaperon proteinlerinden beklenen şekilde PDIA3'ün diğer proteinlerle etkileşme eğiliminden faydalanılmaktadır (Turano ve ark., 2011). İlaveten, hücrenin geri kalanındaki işlevlerine kıyasla PDIA3'ün ER'deki işlevleri nispeten iyi anlaşılmış ve geniş çapta rapor edilmiştir.

2.2.1.2. Mitokondri, Nükleus ve Sitozol'de PDIA3

Mitokondri'de PDIA3

PDIA3, endoplazmik retikulumun mitokondri-ilişkili membranlarında (MAM) gözlemlenmiştir (Paillusson ve ark., 2016). Ancak PDIA3'ün mitokondri'deki varlığı ilk olarak kalsiyuma bağlı bir sistein proteaz olan mitokondriyal μ -kalpain ile kompleks oluşturmalarının tespitine dayanır. PDIA3 kalpain'i stabilize ederek kalpain'in diğer mitokondriyal proteazlar tarafından degrade olmasını önlerken PDIA3- μ -kalpain kompleksinin ise programlanmış hücre ölümünde yer alan apoptoz indükleyici faktörü (AIF) doğrudan kırıp aktive ederek mitokondriyal apoptotik sinyalleşmede önemli bir rol oynadığı önerilmektedir (Ozaki ve ark., 2008).

HeLa hücrelerinde, mitokondriyal Ca^{2+} alımının kısmen PDIA3'ün mitokondriyal kalsiyum uniporter (MCU) transkripsiyonu üzerindeki uyarıcı etkisi ile düzenlendiği bildirilmiştir (He ve ark., 2014). PDIA3, protein kalite kontrol sistemindeki şaperon görevi bağlamında ER'de palmitoillenmemiş kalneksin ile etkileşime girerek mitokondriyal Ca^{2+} 'un düzenlenmesinde dolaylı olarak da rol oynayabilmektedir. Çünkü palmitole kalneksin, sarkoendoplazmik retikulum'da (SR) Ca^{2+} taşıyan ATPaz (SERCA) 2b ile etkileşime girebilir ve bu kompleks ER Ca^{2+} içeriği üzerinde etki ederek ER-mitokondri Ca^{2+} dağılımını düzenler (Lynes ve ark., 2013).

Daha yakın tarihli bir çalışma, STAT3 Ser727 fosforilasyonunun inhibisyonu yoluyla mitokondriyal biyoenerjik fonksiyonun baskılanmasında PDIA3'ün yeni bir rolünü ortaya çıkarmıştır. Ölümsüzleştirilmiş insan serebral mikrovasküler hücrelerinde (CMEC'ler) PDIA3 delesyonunun mitokondriyal biyoenerjik fonksiyonu arttırdığı ve bu fonksiyonu desteklediği bilinen STAT3 Ser727 kalıntısının fosforilasyon seviyesinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca PDIA3 delesyonuna sahip bu hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli, reaktif oksijen türleri üretimi ve oksijen-glukoz yoksunluğuna dirençte artış gözlemleniyorken mitokondri kütlesinin değişmemesi, artmış bir mitokondriyal biyoenerjik kapasiteyi önermektedir (Keasey ve ark., 2021).

Nükleus'ta PDIA3

C-terminalindeki QEDL ER tutulum dizisine ek olarak, PDIA3 ayrıca bir KKKK nükleer konum dizisi içerir (Bourdi ve ark., 1995). PDIA3'ün nükleer varlığının ilk kanıtı, 3T3 hücrelerinde ve sıçan spermatidlerindeki immünofloresan saptamadan (Ohtani ve ark., 1993) ve PDIA3'ün esas olarak dahili nükleer matris fraksiyonunda lokalize olduğu tavuk hepatositlerinin nükleuslarının proteomik çalışmasından (Altieri ve ark., 1993) ortaya çıkmıştır ve nükleusta PDIA3'ün varlığı o zamandan beri bağımsız birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)2D3 (kalsitriol) ile sıçan ince bağırsak hücrelerinin (IEC-6 hücre hattı) uyarılmasının, hücre membranında lokalize olan PDIA3'ün nükleer translokasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Rohe ve ark., 2005). HepG2 (hepatoselüler karsinom) kanser hücrelerinde ise, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) tedavisinden sonra PDIA3'ün nükleer bir translokasyona uğradığı görülmüştür (Grindel ve ark., 2011).

Nükleer PDIA3'ün DNA'ya doğrudan bağlanabildiği, tercihen A/T açısından zengin bölgelerle ve genel olarak MAR'lara (nükleer matrisle ilişkili bölgeler) özgü DNA

bölgeleriyle etkileşime girdiği, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve protein komplekslerinin aktivasyonunu ve DNA bağlanmasını etkilediği ve proteinlerin nükleer ithalat ve ihracatına katıldığı gösterilmiştir (Aureli ve ark., 2013; Coppari ve ark., 2002; Grillo ve ark., 2006). DNA bağlanmasında PDIA3, hücrel adezyon, hücre içi trafik ve hücrel stres tepkisi ile ilgili genler için düzenleyici bölgeleri hedefler (Aureli ve ark., 2013; Chichiarelli ve ark., 2007; Grillo ve ark., 2006). PDIA3'ün DNA bağlama özelliğinin, in vitroda kendi redoks durumuna güçlü bir şekilde bağlı olduğu gösterilmekle birlikte; DNA'ya, PDIA3'ün a' alanının bağlandığı ve bağlanmanın, PDIA3'ün oksidize formunu gerektirdiği tespit edilmiştir (Grillo ve ark., 2007). In vivo çapraz bağlanmış HeLa ve Raji hücrelerinden anti-PDIA3 antikoru ile immüno-çökeltilen DNA fragmentleri; bilinen genlerin intronlarında veya 5' ucuna komşu olan bölgelerde bulunan dizilerde zenginleşme olduğunu göstermiştir. Bu bulgunun, PDIA3'ün gen ekspresyonu düzenleyici fonksiyonuyla uyumlu olduğu düşünülmektedir (Chichiarelli ve ark., 2007; Chichiarelli ve ark., 2010).

Kolesterol metabolizması ve vitamin D sentezi, ortak bir metabolik substrat olan 7-dehidrokolesterolü (7-DHC) paylaştığından, aralarında iyi kurulmuş bir ilişki vardır. Ekibimizin 2021 yılına ait bir çalışmada, primer kortikal nöron kültüründe vitamin D yolakları ile 24-dehidrokolesterol redüktaz (DHCR24) arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada DHCR24 mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin VDR-siRNA uygulanan nöronlarda değişim yaratmazken PDIA3-siRNA uygulaması yapılan nöronlarda önemli ölçüde artıp 10^{-8} M vitamin D uygulamasına yanıt olarak azalmış olması, PDIA3 ve vitamin D'nin nöronal hücrelerde kolesterol metabolizmasının modülasyonuna dahil edilmeleri yoluyla DHCR24 ve vitamin D dengesinin karmaşık bir etkileşimine parmak basmaktadır (Yavuz ve ark., 2021).

Kanser hücreleri üzerinde yürütülen çeşitli çalışmalar, PDIA3'ün transkripsiyon faktörü STAT3'ün sinyal iletiminde rol oynadığını göstermiştir (Coppari ve ark., 2002). PDIA3'ün, STAT3-DNA komplekslerinde bulunduğu ve PDIA3 inhibisyonunun, STAT3-DNA bağlanmasını azaltabildiği (Eufemi ve ark., 2004) ve STAT3'ün DNA'daki konsensüs dizilerinin hem STAT3 hem de PDIA3 ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Chichiarelli ve ark., 2010).

DNA için nispeten düşük afinitesi ve katı bir dizi özgüllüğünün olmaması nedeniyle, PDIA3'ün kendisi bir transkripsiyon faktörü olarak iş görmeyeceği düşünülür, ancak transkripsiyonun düzenlenmesine, muhtemelen transkripsiyon faktörlerini uygun

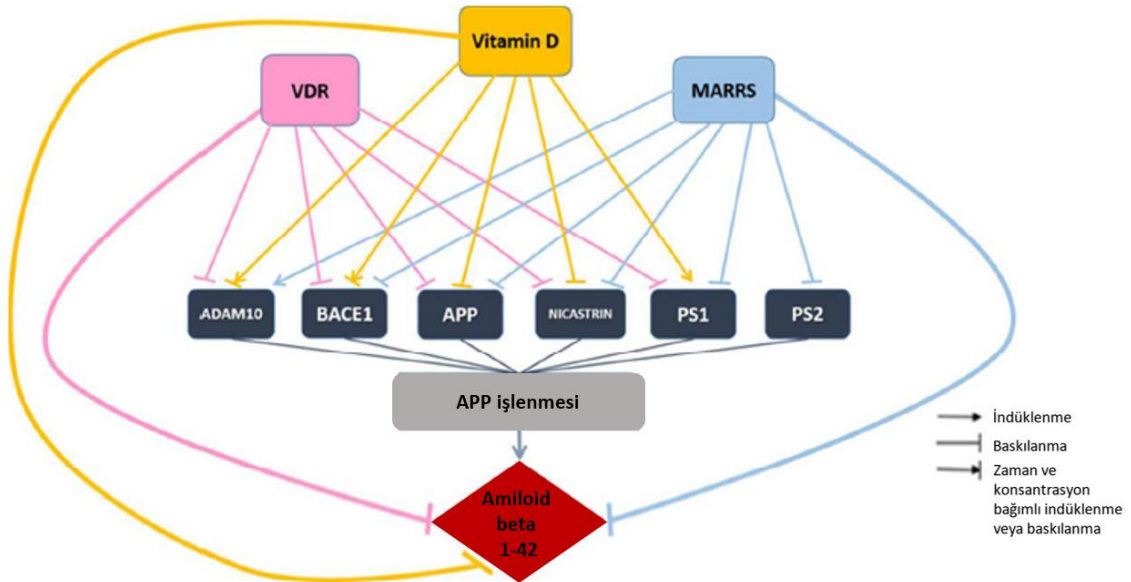
redoks durumlarında muhafaza etmek gibi görevleriyle yardımcı bir protein olarak düşünülebilir (Aureli ve ark., 2013). Ayrıca, NB4 lösemi hücrelerinde farklılaşmanın gerçekleştiği esnada, kalsitriol ve forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) uygulamalarını takiben PDIA3 ve bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa beta (NF- κ B) birlikte hızlıca sitoplazmadan nükleusa yer değiştirmektedir. Bu sebeple araştırmacılar, PDIA3'ün, şaperon ailesinin bir üyesi olarak, hücre farklılaşması ve ölümünü modüle eden ilişkili transkripsiyon faktörlerinin konformasyonunun düzenlenmesi yoluyla ilgili hedef genlerin ekspresyonunun kontrolünde işlev görebileceğini önermektedir (Wu ve ark., 2010).

Önemli olarak PDIA3, nükleer işlevselliğini gösterebilecek bir örnek olarak, DNA bağlanmasına katılan birkaç multiprotein nükleer kompleksinin bir bileşeni olarak izole edilmiştir. Örneğin PDIA3, hatalı DNA tamiri olan hücrelerde modifiye DNA'yı hedefleyen bir nükleer protein kompleksi ile birleşir (Krynetski ve ark., 2003), burada PDIA3, genotoksik stresin bir göstergesi olan histon proteini H2AX'i fosforile edebilir (Podhorecka ve ark., 2010). Bu da çift zincir kırıklarına karşı gelişen erken yanıtta ve potansiyel olarak DNA onarım mekanizmasını hasarlı bölgelere hedeflemeye ve/veya apoptozu aktive etmede PDIA3'ün bir rolü olduğunu gösterir (Krynetskaia ve ark., 2009).

Son olarak, PDIA3, DNA onarım enzimi ve transkripsiyonel düzenleyici APE/Ref-1 için nükleusta in vitro ve in vivo afinite gösterir. Bu iki protein, DNA'yı bağlamak için indirgenmiş formda olması gereken aktivatör protein 1 (AP-1) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin redoks aracılı indirgeyici aktivasyonunda işbirliği yapıyor gibi görünmektedir ve bu etkileşimin oksidatif stres kaynaklı apoptozu karşı korumada da etkisi vardır (Grillo ve ark., 2006). Bunun aksine, homodimerik formunda aktif olan ve disülfid bağları ile stabilize edilen transkripsiyon faktörü E2A'nın disülfid bağlarının PDIA3 tarafından indirgenmesi bu faktörün heterodimerizasyonunu teşvik ederek inaktivasyonuna yol açmaktadır (Markus & Benezra, 1999). Böylece PDIA3'ün, B hücrelerindeki farklılaşma genlerinin DNA'ya bağlanmasını ve transkripsiyonunu önlemesi yoluyla transkripsiyonel aktivatörler üzerinde olumsuz düzenleyici etkilere de sahip olabileceği ileri sürülmüştür (Markus & Benezra, 1999). Bu çalışmalar, strese duyarlı PDIA3'ün, DNA hedefleri ve/veya transkripsiyonel düzenleyiciler ile doğrudan veya dolaylı etkileşim yoluyla hücre sağ kalımı ve farklılaşması ile ilgili genlerin transkripsiyonunu etkileme işlevi görebileceğini düşündürmektedir (Hettinghouse ve ark., 2018). Ekibimizin önceki çalışmalarında da vitamin D'nin çeşitli genlerin

ekspresyonu üzerindeki etkisinin PDIA3 aracılı olduğu gösterilmiştir. PDIA3'ün, transkripsiyonel düzenleme veya hücre sinyal mekanizmaları yoluyla vitamin D'nin hücresel yanıtlarını başlatmakta rolü olduğu bilinmektedir.

Vitamin D'nin $A\beta_{1-42}$ üretimi üzerindeki kontrolünün, APP işlenmesinde yer alan proteinlerin transkripsiyonel düzenlenmesinden kaynaklanabileceğini öne süren çalışmada (Gezen-Ak ve ark., 2017), vitamin D reseptörlerini (VDR veya PDIA3) bozarak vitamin D'nin genomik veya genomik olmayan etkisini önleyen bir durumda, bu bozulmaların ve vitamin D uygulamasının amiloid patolojisinde önemli rol oynayan sekretaz kompleks bileşenlerinin (PS1, PS2, NICASTRIN, ADAM10, BACE1) ve APP substratının gen ekspresyonunu (mRNA ve protein) değiştirdiği ve primer kortikal nöronlarda $A\beta_{1-42}$ üretimi üzerinde etkiye sahip olduğu, ancak düzenlemenin zamana, konsantrasyona ve reseptöre bağımlı olduğu gözlemlenmiştir. PS2 dışındaki tüm proteinlerin vitamin D tarafından düzenlenmesinin VDR'yi gerektirdiği, PS2'nin sadece PDIA3, PS1'in ise sadece VDR tarafından düzenlendiği, APP, NICASTRIN ve BACE1 ekspresyonlarının VDR ve/veya PDIA3 susturulmuş nöronlarda arttığı ve bu genlerin mRNA ekspresyonunun 1,25(OH)2D3 uygulamasıyla düşüş gösterdiği, bildirilen sonuçlar arasındadır. ADAM10 mRNA ve protein ekspresyonu ise VDR-siRNA uygulamasıyla artarken, PDIA3-siRNA ile azalmıştır (Gezen-Ak ve ark., 2017) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: 1,25-dihidroksivitamin D3 ve reseptörleri tarafından, nöronlardaki amiloid işleme yolağında yer alan proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinin gösterimi

VDR, vitamin D reseptörünün, MARRS (diğer adıyla PDIA3) ise membran ilişkili hızlı-yanıt steroid-bağlayıcı proteinin kısaltmasıdır. Üç tipteki ok, indüklenme, baskılanma veya zaman/konsantrasyon-bağımlı indüklenme ve baskılanmayı temsil etmektedir. Gezen-Ak ve ark. 2017'den uyarlanmıştır.

Günümüzde, ekibimizin bulgularını destekleyen ve hem beyin gelişimi hem de nörodejenerasyonda çok sayıda genin düzenlenmesinde vitamin D, VDR ve PDIA3'ün rolünü güçlü bir şekilde gösteren çok sayıda başka çalışma birikmeye başlamıştır (Gezen-Ak & Dursun, 2019).

Sitozol'de PDIA3

PDIA3'ün sitozoldeki varlığı, sitozolde ve ER membranının sitozolik tarafında gerçekleşen PDIA3-kalsitriol bağlanması sonucu PDIA3'ün hücre membranından nükleusa geçişi için gereklidir (Gaucci ve ark., 2016). Ayrıca PDIA3, diğer proteinlerle etkileşimi sayesinde de sitozolde rapor edilmiştir. Plazma membranının sitozolik tarafında PDIA3 ile kalretikulin (CRT) arasında kompleks oluşumu, CRT'nin membrana translokasyonu için gereklidir ve CRT'nin hücre membranı üzerinde tutulması, tümör hücrelerinde gözlenen immünojenik ölüm için gereklidir (Obeid, 2008). PDIA3, STAT3'ün hücre membranından sitoplazma yoluyla nükleer membrana hareketinde yer alan hem membran raftlarının hem de sitozolik statozom komplekslerinin yardımcı bir iskele proteini olarak görev alır (Sehgal, 2003). Benzer şekilde, PDIA3'ün sitoplazma ve nükleus arasındaki translokasyonu sırasında rapamisinin mekanik/memeli hedefi (mTOR) (Ramirez-Rangel ve ark., 2011), nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) (Wu ve ark., 2010), retinoik asit reseptörü-alfa (RAR- α) (Zhu ve ark., 2010) ve tümör baskılayıcı protein p53 (Green & Kroemer, 2009) dahil olmak üzere ek transkripsiyon faktörleri ile birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir.

PDIA3, RAR- α reseptörü ve all-trans retinoik asit (ATRA) ligandı ile sitozolde kolokalizdir ve bu kompleksin oluşumu; çoklu gelişim süreçlerinde yer alan bir transkripsiyonel düzenleyici olan RAR- α 'nın nükleusa taşınması için gereklidir (Zhu ve ark., 2010). Görünüşe göre, PDIA3'ün RAR- α 'nın sistein kalıntılarındaki tiyol oksidoredüktaz aktivitesi; ATRA-RAR- α bağlanmasını kolaylaştıracak şekilde reseptör konformasyonunun değişimi ve ardından kompleksin nükleer importu için kritiktir. Ayrıca, Sertoli hücrelerinde ligand-reseptör kompleksinin nükleusa taşınmasının ardından reseptörün ERAD olarak bilinen degradasyon sürecine gönderilmek üzere ER'ye taşınmasında da PDIA3'ün gerekli olduğu gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2010).

PDIA3'ün redoks özelliklerinin kesin bir anlamı, onun çok işlevli bir protein olan APE/Ref-1 ile etkileşiminin bulunmasından ortaya çıkmıştır; PDIA3, Ref-1'in indirgenmiş halini korumasında yer alırken PDIA3-Ref-1 kompleksi, transkripsiyon faktörlerinin indirgenmesinin gerçekleşmesinin beklendiği sitozol ve nükleus arasında gidip gelir (Grillo ve ark., 2006).

PDIA3'ün düzenleyici süreçlerde yer alan redoksa duyarlı bir protein olarak önemine ve sitozoldeki varlığına dair daha fazla kanıt, PDIA3'ün Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) ile etkileşimini gösteren bir çalışmadan (Ramirez-Rangel ve ark., 2011) elde edilmiştir. mTOR; mTORC1 ve mTORC2 olarak adlandırılan iki multiprotein kompleksinde bulunan bir serin-treonin protein kinazdır. mTORC1 temel olarak bir besin/enerji/redoks sensörü olarak işlev görür ve protein sentezini kontrol eder (Hay & Sonenberg, 2004). PDIA3 tercihen mTORC1 (mTOR kompleksi 1) ile etkileşim gösterir, bu kompleksin oluşumuna katkıda bulunur ve sinyali olumlu şekilde düzenler. Ayrıca PDIA3, mTORC1'in insülin veya besinler tarafından uyarımı dahil olmak üzere aldığı çeşitli sinyallerin tespit edildiği bir mekanizmaya katılır ve PDIA3'ün ifadesine bağlı olan redoksa duyarlı bu mekanizma mTORC1'i etkinleştirmektedir (Ramirez-Rangel ve ark., 2011; Sarbassov & Sabatini, 2005). PDIA3'ün aşırı ekspresyonu, mTORC1 seviyelerini ve aktivitesini arttırıp hücrel proliferasyonu indüklerken, PDIA3 susturulması ise, insüline mTORC1 yanıtında bir azalmaya yol açar (Ramirez-Rangel ve ark., 2011).

Hücre büyümesi ve sağkalımını düzenlemedeki rolüne ilave olarak mTOR, bilinen bir otofaji inhibitörüdür. Fakat mTOR aktivitesi, otofajik sürecin uyarılmasıyla sonuçlanan besin yetersizliğiyle inhibe edilir ve besin yetersizliğinin oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (Scherz-Shouval ve ark., 2007). Bu nedenle araştırmacılar, PDIA3'ün mTOR redoks düzenlemesine müdahalesiyle, otofajide de yer aldığını önermektedir (Ramirez-Rangel ve ark., 2011). Tioredoksin benzeri bölgeleri göz önüne alındığında, PDIA3'ün, oksidatif strese karşı hücreyi koruma mekanizmalarında yer aldığı düşünülmektedir. Sitozoldeki göreceli bolluğu göz önüne alındığında, böyle bir işlev bu kompartmanda gerçekten önemli olabilir (Turano ve ark., 2011).

PDIA3 ayrıca mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin (MOMP) p53 aracılı uyarımını ve bunun sonucunda gerçekleşen apoptozu inhibe etmek için sitoplazmik p53 ile etkileşime girer (Green & Kroemer, 2009).

PDIA3'ün bu sitozolik işlevleri; fizyolojik koşullar altında ve PDIA3'ün redoks duyarlılığı ve protein katlama yetilerine sahip bir şaperon olarak çeşitli hücrel süreçler ve yanıtlar için kritik olduğu hücrel stres koşulları sırasında belirgindir. Sitozolik etkileşimler yoluyla, PDIA3, hücrel stres yanıtı, proliferasyon, farklılaşma, otofaji, apoptoz ve immün yanıt ile ilgili çoklu yolların aktivitesini doğrudan ve dolaylı olarak düzenler (Hettinghouse ve ark., 2018).

2.2.1.3. Hücre Membranı'nda Bulunan ve Hücre Dışına Salınan PDIA3

PDIA3'ün ER'den kaçabiliyor olduğu ilk kez Hirano ve arkadaşları tarafından bu proteinin 3T3 hücrelerinden salgılandığı fark edildiğinde gözlemlenmiştir (Hirano ve ark., 1995). Daha sonra bir dizi çalışma, PDIA3'ün hücre yüzeyinde, hücre membranı proteinleriyle kompleksler halinde veya hücre dışında bulunabileceğine işaret etmiştir. En başlarda, literatürde PDIA3 hatalı bir şekilde fosfolipaz C alfa olarak yer alırken hücre membranında bulunan vazopressin (Aiyar ve ark., 1989) ve anjiyotensin II (Mah ve ark., 1992) reseptörleri ile PDIA3'ün etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yayınlanan bir makalede anjiyotensin II bağlanmasını takiben PDIA3'ün fosforilasyona uğradığı gösterilince PDIA3'ün anjiyotensin reseptörü ile ilişkisinin fonksiyonel öneme sahip olmasının muhtemel olduğu gerçeği öne sürülmüştür (Tokutomi ve ark., 2007).

PDIA3'ün katalitik bölgelerini içermeyen protein/protein etkileşimleri de membranda önemlidir. Plazma membranının sitozolik tarafında PDIA3 ve CRT arasında kompleks oluşumu, CRT'nin ana konumu olan ER'den plazma membranına translokasyonu için gereklidir. CRT'nin hücre yüzeyinde tutulması, tümör hücrelerinde gözlenen immünojenik hücre ölümü (ICD) için gereklidir ve dendritik hücreler için bir "beni ye sinyali" işlevi görebilir. Daha önce "*ER'de PDIA3*" başlığında bahsedildiği gibi, ER'de glikoproteinlerin uygun şekilde katlanmasında açık bir fonksiyonel role sahip olan CRT-PDIA3 kompleksi, bu durumda ise bunun yerine CRT'nin hücre dışına geçişi için esastır (Obeid, 2008; Panaretakis ve ark., 2009). Daha yakın tarihli bir çalışma, Jurkat (akut T-hücreli lösemi) hücrelerinde CRT'nin hücre yüzeyi translokasyonunun düzenlenmesinde integrinlerin ve PDIA3'ün rolünü göstermiştir; özellikle, araştırmacılar CRT translokasyonuna plazma membranı integrinlerinin inhibitör, PDIA3'ün ise promotör olarak dahil olduğunu varsaymıştır (Liu ve ark., 2019).

PDIA3, gamet olgunlaşması sırasında artış göstermektedir. PDIA3'ün; sperm ile yumurtanın verimli füzyonu için gerekli olan membran proteinlerinin tiyol-disülfid değişim reaksiyonları aracılı konformasyonel aktivasyonu ile ilişkili olması sebebiyle sperm başının yüzeyinde yer aldığı tespit edilmiştir (Ellerman ve ark., 2006; Liu ve ark., 2014). Bu proteine karşı antikorların sperm-yumurta füzyonunu bloke ettiği gösterilip, PDIA3'ün sperm yüzeyinin integrinlerini yeniden şekillendirebileceği hipotezi öne sürülmüştür (Ellerman ve ark., 2006). Daha sonra, düşük fertilizasyon oranlarına sahip erkeklerde PDIA3'ün azaldığı bulunmuştur ve PDIA3; erkek infertilitesi için yeni bir fenotip belirteci olarak önerilmiştir (Zhang ve ark., 2007).

Trombosit yüzeyinde de mevcut olan PDIA3'ün trombosit aktivasyonuna aracılık ettiği ve ayrıca hemostaz ve tromboz için gerekli olduğu varsayılmıştır ve PDIA3 inhibisyonunun trombosit aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Holbrook ve ark., 2012; Wu ve ark., 2012). Ayrıca yakın zamanlı bir çalışmada, PDIA3'ün, kültüre edilmiş insan göbek damarı endotel hücrelerinde (HUVEC'ler) hücre dışına salgılanan ve doku hasarı veya inflamasyon gibi belirli koşullar altında aktive edilen insan transglutaminaz 2 (TG2) ile birlikte hücre dışında bulunduğu ve PDIA3'ün TG2'yi oksidatif olarak inaktive edebildiği gösterilmiştir (Yi ve ark., 2018). Böylece redoks homeostazında, normal hemostazın ve vasküler bütünlüğün korunmasında PDIA3'ün katkısından söz edilmektedir (Wu & Essex, 2020).

PDIA3 ayrıca vitamin D3'ün hidroksillenmiş ve biyolojik olarak aktif formu olan $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün (aynı zamanda $1\alpha,25$ -dihidroksikolekalsiferol veya kalsitriol olarak da bilinir) bağlanabildiği, membrana-bağlı bir reseptör ($1,25\text{D}_3$ -MARRS) olarak tanımlanmıştır. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, diğer steroid hormonlara benzer şekilde, nükleer reseptörüne (vitamin D reseptörü; nVDR) bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyebilir, ancak PDIA3 etkileşimi yoluyla hızlı ve genomik-olmayan yanıt yolağını aktive edebilir ve PDIA3'ün nükleusa translokasyonuna da sebebiyet verebilir (Nemere ve ark., 2012). Yakın tarihli bir çalışma, PDIA3'ün a' alanını $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bağlanmasında yer alan olası birincil alan olarak izole etmiştir (Gauci ve ark., 2016).

Membrana bağlı PDIA3'e $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün bağlanması yoluyla başlatılan hızlı yanıt yolağı, transmembran iyon taşınımının düzenlenmesi ve çeşitli sinyal iletim basamaklarının aktivasyonu yoluyla gerçekleştirilir (Boyan ve ark., 2007; Chen ve ark., 2016).

1 α ,25(OH)2D3'ün PDIA3 ile etkileşiminin hücredeki etkilerine örnekler aşağıda verilmiştir;

- 1 α ,25(OH)2D3'ün PDIA3'e bağlanmasıyla aktive olan fosfolipaz A2 (PLA2) sinyali, protein kinaz C'nin (PKC) etkinleşmesini tetikler. PDIA3 aşırı ekspresyonu, hızlı prostaglandin E2 (PGE2) üretiminden kanıtlandığı gibi, 1 α ,25(OH)2D3 ile indüklenen PLA stimülasyonunu destekler (Boyan ve ark., 2007). Buna karşılık, PGE2 aracılı fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu, inositol-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) salınımını artırır, ER'den kalsiyum salınımını ve membranla ilişkili PKC'nin aktivasyonunu ve mitojenle aktive olan protein kinazların/ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazların (MAPK/ERK) fosforilasyonunu tetikler. MAPK/ERK, gen ekspresyonunu modüle eder; öte yandan PDIA3 delesyonu, 1 α ,25(OH)2D3 hızlı yanıt yolağı ile ilişkili gen ekspresyonundaki değişiklikleri ortadan kaldırmaktadır (Gaucchi ve ark., 2016).
- 1 α ,25(OH)2D3'ün hızlı etkisiyle PDIA3'ün; PLA2, PLC, PKC ve MAPK ailesinin ERK1/2'si gibi sinyal proteinlerinin aracılığıyla kas-iskelet hücrelerinde hızlı bir sinyalleşme başlatmak için, PLA2 aktive edici protein (PLAA) ve kaveolin-1 (Cav-1) ile etkileşime girerek kaveolalarda bulunduğu gösterilmiştir (Boyan ve ark., 2012).
- PKC α ve PKC β ; civcivlerden izole edilmiş bağırsak epitel hücrelerinde 1 α ,25-(OH)2D3'ün PDIA3'e bağlanması ve ardından fosfat alımının uyarılmasıyla aktive edilir (Nemere ve ark., 2004; Tunsophon & Nemere, 2010).
- PDIA3: 1 α ,25(OH)2D3 bağlanması, memelilerin bağırsak hücrelerinde steroid hormonu ile uyarılan kalsiyum alımı için de önemlidir (Nemere ve ark., 2010).
- PDIA3'ü içeren bir mekanizma yoluyla 1,25(OH)2D3'ün, osteoblast benzeri MC3T3-E1 hücrelerinde PLA2'ye bağlı PGE2'nin hızlı salınımını, PKC'nin aktivasyonunu ve kemikle ilgili gen transkripsiyonunun ve mineralizasyonun düzenlenmesini uyardığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2010). Bu veriler, PDIA3'ün; osteoblast olgunlaşması sırasında 1,25(OH)2D3 ile uyarılan membran sinyal yolaklarının önemli bir başlatıcısı olduğunu göstermektedir (Chen ve ark., 2010).
- PDIA3; 1 α ,25(OH)2D3'ün kemik morfogenetik protein-2'nin (BMP2) hücre dışı matris mineralizasyonu üzerindeki etkilerine aracılık etmesinde de önemli bir rol oynar (Doroudi ve ark., 2014) ve hücre dışı matris (ECM) veziküllerinin aracılık

ettiği hızlı yanıt yoluyla endokondral kemik oluşumunun düzenlenmesinde yer alır (Asmussen ve ark., 2019).

- Wnt ailesi üyesi 5A'nın (WNT5A) $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tarafından hızlı aktivasyonunun da PDIA3 membran kompleksine bağlı olduğu gösterilmiştir (Doroudi ve ark., 2015).
- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -PDIA3 etkileşiminin, JNK MAPK sinyal yolağının katılımıyla prostat kanseri hücrelerinin istilacılığını azalttığı gösterilmiştir (Larsson ve ark., 2008).
- PDIA3, vitamin D aracılı anti-kanser aktivitesini özellikle meme kanserinde modüle ederek hücrel apoptoz ve farklılaşmada rol oynar. PDIA3 yıkımının, bir meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinin vitamin D ile ilgili ajanlara duyarlılığını seçici olarak arttırdığı bildirilmiştir (Richard ve ark., 2010).
- PDIA3- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kompleksinin, UV (ultraviyole) radyasyonundan kaynaklı DNA hasarına (özellikle timin dimerlerine) karşı foto-korumada rol oynayabileceği ortaya çıkarılmıştır (Sequeira ve ark., 2012).

Ekibimizin, vitamin D'nin genomik olmayan etkilerinin VDR'nin nöronal plazma membranı üzerindeki lokalizasyonunu gerektirebileceği düşüncesiyle odaklandığı çalışmada, PDIA3'e de bağırsak hücrelerinin plazma membranında lokalize olduğu öne sürüldüğü için bakılmıştır. Ancak hücre yüzeyi boyaması PDIA3'ün vitamin D için bir plazma membranı reseptörü olduğunu öne süren çalışmayı desteklememiştir. Canlı nöronal hücrelerin hücre yüzeyinde VDR'nin bol miktarda lokalize olduğunun belirlenmesiyle PDIA3'ün VDR'ye kıyasla düşük immünoreaktivitesinin açıklaması; nöronların vitamin D'nin olası bir genomik olmayan etkisi için VDR'yi kullanma eğiliminde olduğunun tahmin edilmesi şeklindedir. Çalışmada yapılan çift-immünfloresan işaretleme ise VDR ve PDIA3'ün, sitoplazmada, özellikle ER'de kolokalize olduğunu göstermiştir. Çalışmanın devamında, APP ve VDR'nin protein partnerlerini tanımlamak için kullanılan FpClass'ta (protein-protein etkileşimlerini (PPI) tahmin etme aracı), APP için 1133, VDR için 583 partner tahmin edilirken ikisiyle etkileşen 153 ortak protein tespit edilmiştir. Bu proteinlerden beşi (NUMB, katenin (CTNNB1), NOTCH1, E-kadherin (CDH1) ve FHL2) membran veya membranla-İlgili proteinlerdir. Bu 5 protein, PDIA3 ve hedef proteinler (PS1, PS2, Nikastrin, BACE1, ADAM10) ile daha ileri analizler için kullanılmıştır. PPI total skorlarına göre PDIA3'ün;

APP (0,8826), PS1 (0,3499), PS2 (0,3648) ve BACE1 (0,3766) ile etkileşimi görülmektedir (Dursun & Gezen-Ak, 2017).

PDIA3 ayrıca çok çeşitli hücre tiplerinde ek substratlara bağlanarak; bir reseptör olarak bir sinyal transdüksiyon kaskadını doğrudan aktive etmesinin yanı sıra, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) (Guo ve ark., 2002; Sehgal ve ark., 2002), epidermal büyüme faktörü (EGF) (Gaucci ve ark., 2013) ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) (Yang ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016) sinyalleri dahil olmak üzere hücre membranından kaynaklanan diğer sinyallerin aktivitesini ise dolaylı olarak düzenler.

STAT'lerin, membrana bağlı bir reseptöre bağlanma yoluyla aktive edildiğinde çoğalma, farklılaşma, immün yanıt, apoptoz ve onkogeneze ile ilgili genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinden sorumlu sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak hareket ettikleri bilinmektedir (Calo ve ark., 2003; Mui, 1999; Yu ve ark., 2009). Sehgal ve ark. tarafından insan hepatoma hücreleri üzerinde yapılan önemli bir çalışmada, PDIA3'ün hücre yüzeyinde başlayan ve STAT3'ü içeren bir sinyal iletim yolağına katılımı gösterilmiştir. PDIA3, plazma membranının lipid raft fraksiyonunda STAT3 ile ilişkilidir (Sehgal ve ark., 2002), buna ek olarak "*Nükleus'ta ve Sitozol'de PDIA3*" başlıklı bölümde bahsedildiği gibi sitozol ve nükleusta da PDIA3'ün STAT3 ile etkileşimi mevcuttur (Chichiarelli ve ark., 2010). PDIA3'ün sitozolik statozom komplekslerinde STAT'lerin aktivasyonundan ve plazma membranından sitozole ve nükleusa taşınmasından sorumlu STAT ko-faktörleri için sinyal entegrasyonu ve yapılanma bölgeleri oluşturduğu varsayılır (Guo ve ark., 2002; Sehgal ve ark., 2002).

PDIA3, membrana bağlı epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) post-translasyonel modifikasyonu yoluyla EGF'yi etkiler. EGFR aktivasyonu genellikle anti-apoptotik sinyalleme ile ilişkilidir ve EGFR'nin deregülasyonu tümörijenize ile ilişkilidir (Guo ve ark., 2015; Herbst, 2004). PDIA3'ün kanser hücrelerinde delesyonu, EGFR'nin fosforilasyonunun bozulmasına ve reseptörün içselleştirilmesinin ve degradasyonunun artmasına neden olur (Gaucci ve ark., 2013). Bu gözlemler, PDIA3'ün katalitik aktivitesi yoluyla meydana geldiği varsayılan EGFR endositozu ve aktivasyonunda PDIA3'ün bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Gaucci ve ark., 2013).

PDIA3 ve $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ arasındaki etkileşim yoluyla tetiklenen Ca^{2+} iyon akışı ve PKC'nin aktivasyonu, metalloproteinazın tümör nekroz faktör reseptörü 1'in (TNFR1) ektodomain bölgesinin kırılmasının aracılık ettiği ADAM10'un (bir disintegrin ve

metalloproteinaz içeren protein 10) hücre yüzeyine translokasyonunu aktive eder. Sonuç olarak çözünür TNFR1'in salınması, membrandaki reseptör sunumundaki azalma yoluyla inflamatuvar TNF- α sinyalini sınırlar (Yang ve ark., 2015).

Fujii ve arkadaşları, PDIA3'ün gastrik parietal hücrelerin apikal kanaliküler membranında yüksek oranda eksprese edildiğini ve burada kendi şaperon işlevinden bağımsız olarak gastrik asit sekresyonunu düzenleyen H⁺/K⁺-ATPaz'ın aktivitesini arttırdığını gözlemlemiştir. Bunun PDIA3'ün henüz bilinmeyen bir işlevinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Fujii ve ark., 2013).

Ayrıca, PDIA3'ün 293-Ebna hücrelerinin plazma membranında adezyonla ilişkili β -DG (ECM reseptörü distroglikanın altbirimi) ile etkileşim gösterdiği ve ko-lokalize olduğu bildirilmiştir. PDIA3'ün DG'ye post-translasyonel olgunlaşma sırasında yardımcı olabileceği veya DG redoks durumunu modüle edebileceği düşünülmektedir (Sciandra ve ark., 2012).

Dihazi ve meslektaşları, PDIA3'ün profibrotik sitokin uygulaması üzerine böbrek hücreleri tarafından hücre dışına yüksek miktarlarda salgılandığını ve fibronektin ve kollajen gibi ECM proteinleri ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Veriler, salgılanan PDIA3'ün ECM sentezine ve stabilizasyonuna katılabileceğini, böylece hastalık başlangıcının erken bir işareti olan ECM'nin aşırı birikimi ile karakterize, ilerleyici bir renal fibrozise potansiyel olarak yol açabileceğini düşündürmektedir (Dihazi ve ark., 2013).

PDIA3'ün reseptörler ve sinyal transdüksiyon proteinleriyle ilişkisi ve kalsitriol ile etkileşiminde olduğu gibi bir reseptör olarak da statüsü göz önüne alındığında, bu proteinin hücre yüzeyinden hücre içine ve/veya çekirdeğe sinyal iletim süreçlerinde önemli bir rolü olduğu görülmektedir.

2.2.2. PDIA3 ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Endoplazmik retikulum (ER) stres yanıtı, Alzheimer Hastalığı (AH) dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisinde önemli bir süreç olarak yer almaktadır (Hashimoto & Saido, 2018). Patojenik yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ve hücre içi kalsiyum sinyalleme sisteminin bozulması, ER stresinin indüklenmesinin altında yatan ve nöronal hücre ölümüne yol açan temel mekanizmalar olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple nörotoksik ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin temizlenmesini teşvik eden

mekanizmalar büyük önem taşımaktadır. Protein yanlış katlanması, Alzheimer hastalığı (AH), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Parkinson hastalığı (PH) ve Prion ile ilgili bozukluklar dahil olmak üzere en yaygın nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynar. Biriken kanıtlar, bu nörodejeneratif koşulların belirgin ve ortak bir özelliği olarak PDI'ların değiştirilmiş ifadesini ve bu hastalıklardaki çeşitli stres türlerine yanıta PDIA3'ün katılımını göstermektedir (Andreu ve ark., 2012). PDIA3'ün uyarılması, yanlış katlanmış proteinlerin ER içinde birikmesinden sebep, PDIA3'ün CNX/CRT döngüsünün bir parçası olarak glikoproteinlerin katlanmasına ve kalite kontrolüne katkıda bulunmasından dolayı katlanmamış protein yanıtı (UPR) ile ilişkilendirilmektedir (Torres ve ark., 2015). Mevcut kanıtlar, hem fizyolojik hem de hastalık durumları altında PDIA3'ün redoks ve şaperon aktiviteleri yoluyla çok sayıda farklı fonksiyonel rolünü göstermektedir. Bu bölümde PDIA3'ün nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etki ve işlevlerine kapsamlı bir şekilde değinilecektir.

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), beyin ve omurilikteki motor nöronların dejenerasyonu ile karakterizedir (Kent-Braun ve ark., 1998). ALS'de protein yanlış katlanması ve ER stresi, hastalık sürecindeki başlıca patolojik olaylardan biridir (Matus ve ark., 2013). ER stresi, herhangi bir denervasyon tespit edilmeden önce bile motor nöronlarda tespit edilen en erken bozulmalardan biridir (Matus ve ark., 2013). Ailesel ve sporadik ALS vakalarında payı olan veya neden olan faktörler olarak birkaç gen varyantı izole edilmiştir ve en fazla dahil edilen genler arasında *C9ORF72* ve süperoksit dismutaz 1 (*SOD1*) vardır (Dafinca ve ark., 2016).

Artan sayıda çalışma, PDI aile üyelerini ALS patogenezi ile ilişkilendirmiştir. PDIA1, ALS'de motor nöronlarda yanlış katlanmış TDP-43 ve SOD1 proteinleriyle ilişkili olarak tespit edilmiştir ve bu proteinlerin anormal inklüzyonlarda birikmesini önlemede PDIA1'in olası bir rolü olduğu ima edilmektedir (Perri et al., 2017). Ayrıca, ALS hastalarının ekzom dizilimleri kullanılarak, PDI'lar ile ilgili mutasyonlar için yapılan genetik bir taramada; PDIA1 ve PDIA3 kodlayan genlerde PDIA1'in enzimatik aktivitesini değiştiren, PDIA3'ün ise CRT ve CNX'e bağlanmasını etkileyen çeşitli yanlış anlamlı mutasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) tespit edilmiştir. Araştırmacılar tarafından, bu mutasyonların hastalık patolojisine katkıda bulunduğu ve

ALS geliştirmek için risk faktörleri olabileceği düşünülmektedir (Gonzalez-Perez ve ark., 2015).

Semptomatik mutant SOD1 transgenik farelerin (SOD1G93A; bir ALS modeli) nc bir proteomik çalışması, omurilikte hastalığın presemptomatik, semptomatik ve son aşamalarında artış gösteren iki ana protein olarak PDIA1 ve PDIA3'n tanımlanmasına yol açmıştır (Atkin ve ark., 2008). Ardından bu gözlemle tutarlı olarak aynı çalışmada, insan sporadik ALS hastalarının omuriliklerinde ve aynı hastalardan alınan BOS'larda artmış PDIA1 ve PDIA3 seviyeleri bulunmuştur (Atkin ve ark., 2008). ALS hastalarından alınan periferik mononükleer hücrelerde ALS biyobelirteçleri için yakın zamanda yapılan bir proteomik tarama, PDIA1 ve PDIA3' indüklenen ana proteinler olarak tanımlamıştır (Nardo ve ark., 2011). Dikkat çekici bir şekilde, PDIA3 ekspresyonundaki değişiklikler, hastalığın ilerlemesini izlemek için olası bir biyobelirteç olarak en yüksek puana sahiptir; hastalık seyri sırasında PDIA3 düzeyi hastalığın şiddetiyle yüksek oranda ilişkilidir (Nardo ve ark., 2011). Bu da klinik çalışmaların etkinliğini izlemek için PDIA3'n potansiyel kullanımını düşündürmüştür. Ayrıca bu bulgular, PDIA3'n ALS'de bozulan protein katlanmasıyla mücadele etmek için artış gösteriyor olabileceğini ve PDIA3'n sürekli yükselmesinin ve/veya işlev bozukluğunun nöronal apoptozu şiddetlendirebileceğini düşündürmektedir (Hettinghouse ve ark., 2018).

Uzun vadeli analizler sonucu ALS hastalarının BOS ve kanında PDIA1 ve PDIA3'n güçlü artışından ve insan hastalıklarının çeşitli proteomik taramalarında en yüksek isabetler olarak tanımlanmalarından dolayı, vücut sıvılarında farklı PDI aile üyelerinin ifadesinin veya genel bir PDI ağının izlenmesinin de erken hastalık teşhisi için önemli bir araç olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir (Nardo ve ark., 2011).

PDIA3 ve PDIA1'in aşırı ekspresyonunun, motor nöronal NSC-34 hücrelerinde, primer nöronlarda ve embriyonik kök hücrelerin (ESC'ler) farklılaşmasından üretilen insan motor nöronlarında nörit büyümesini ve bağlantısallığını arttırdığı ve PDIA3'n sinapsta koruyucu bir rolü olduğu bulunmuştur (Woehlbier ve ark., 2016). ALS'ye bağlı mutantlar eksprese edildiğinde ise tamamen bir aktivite kaybı görülmüştür (Woehlbier ve ark., 2016). Ayrıca, koşullu nakavt fareler üreterek PDIA3'n sinir sistemindeki olası fizyolojik işlevini araştıran makalede, PDIA3'n nöronlarda hedeflenmesi, farelerde kontrollere kıyasla motor performansta önemli düşüşe, vücut kütlesinde azalmaya ve hayvanların erken ölümüne neden olmuştur. Detaylı bakılacak olursa, bu fareler anormal

sinapslar, anormal iskelet kası lifleri, azalmış kas innervasyonu, değişmiş nöromusküler bağlantı (NMJ) morfolojisi ve işlevsizliği ile anormal elektromiyografi ölçümleri sergilemiştir (Woehlbier ve ark., 2016). PDIA3 eksikliği olan bu farelerde tanımlanan tüm fenotipler, ALS'nin erken evrelerine son derece benzemektedir ve bu araştırma PDIA3'ün olası yeni rollerini ima etmektedir. İlave olarak aynı kapsamlı çalışmada, PDIA3 nakavt farelerde; nörotransmisyonunda ve kalsiyum ile uyarılan ekzositozun düzenlenmesinde rol oynayan sinaptik vezikül 2 (SV2) proteininin ekspresyonunun anlamlı ölçüde azaldığının gösterilmesiyle PDIA3'ün, SV2 gibi sinaptik proteinlerin katlanmasına aracılık ettiği önerilmiştir. Ayrıca bu farelerde yüksek moleküler ağırlıklı SV2 formlarının gözlenmesi ile SV2'nin PDIA3'ün substratı olduğu doğrulanmıştır (Woehlbier ve ark., 2016).

PDIA3, ALS'de mutant SOD1'in neden olduğu hücresel patolojiye karşı koruyucu olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar tarafından, önce bir nöronal hücre hattında (SOD1 ve PDIA3'ü birlikte eksprese eden) ve daha sonra primer kortikal nöronlarda PDIA3'ün rolü analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, hücre kültüründe PDIA3 ekspresyonunun susturulmasının mutant SOD1 inklüzyon oluşumunu, ER stresini ve nörotoksisiteyi arttırdığını, PDIA3'ün aşırı ekspresyonunun ise bu sayılanları inhibe ettiğini ve böylece koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, araştırmacılar sporadik ALS hastalarının omuriliklerinde PDIA3'ü TAR DNA-bağlayıcı protein-43 (TDP-43)-pozitif inklüzyonlar ile kısmen ko-lokalize görerek PDIA3'ü insan sporadik ALS'de protein yanlış katlanma olaylarına bağlamıştır (Parakh ve ark., 2018).

Son olarak, PDIA3'ü aşırı eksprese eden ve deneysel bir ALS modeli olarak mutant SOD1 farelerini kullanan çok yakın tarihli bir araştırma, PDIA3'ün erken kas denervasyonunu koruduğuna dair kanıt sağlamıştır. Yapılan proteomik analizde, PDIA3 aşırı ekspresyonunun nöroprotektif etkilerinin, omurilikte artan aktin hücre iskeleti ve sinaptik protein seviyeleri ile ilişkili olduğu ortaya konmaktadır. Çalışma, PDIA3 proteininin muhtemelen karışık disülfid çapraz bağları yoluyla SOD1 agregasyonuna müdahalesi yoluyla motor nöron bağlantısını sürdürerek hastalığın erken aşamalarında etki ettiğini ileri sürmektedir (Rozas ve ark., 2021).

Prion Hastalığı (PrH)

Hücrel Prion proteini (PrP), ER'de sentezlenen glikosillenmiş ve disülfid bağlı bir proteindir. Bulaşıcı süngerimsi ensefalopatiler (TSE'ler) olarak da bilinen prion

hastalıkları (PrH); PrP'nin yanlış katlanmış formu olan PrP^{Sc}'nin (scrapie ile ilişkili PrP) birikmesi ve bunun sonucunda nöronal fonksiyon bozukluğu ve ölüm ile karakterize fatal nörodejeneratif bozukluklardır (Lindholm ve ark., 2006).

Sporadik veya yeni varyant Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJH) olan post mortem beyin dokularının proteomik çalışmalarında, PrH'nin erken evrelerinde Prion replikasyonuna artan PDIA3 ekspresyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir ve CJH; insanlarda PDI'ların artışıyla ilişkili olarak gösterilen ilk beyin hastalığıdır (Sepulveda ve ark., 2016). Bulaşıcı murin scrapie modellerinde prionun neden olduğu nöronal hasarın derecesinin ve hastalığın şiddetinin PDIA3 seviyeleri ile ters orantılı olduğu ifade edilmiştir (Hetz ve ark., 2005). Bu da yanlış katlanmış ve proteaza dirençli bir prion formunun (PrP^{Sc}) enfeksiyonuna ve nörotoksisitesine hücrel yanıtta PDIA3'ün prion proteininin biyosentezi, katlanması ve olgunlaşmasını kontrol eden hücrel bir faktör olarak koruyucu bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sepulveda ve ark., 2016) ve PDIA3 yeni bir terapötik hedefi temsil edebilir (Hetz ve ark., 2005).

PrP^{Sc}'nin nöronal hücrelerde, ER stresini indükleyerek ve ER kaspaz-12'yi aktive ederek etki ettiğine dair kanıtlar vardır (Turano ve ark., 2011). Thapa ve ark. PDIA3'ü aşırı eksprese eden hücrelerde PDIA3'ün; PrP agregatlarında bir düşüş ile birlikte ER stresinin neden olduğu apoptozu ve nöronal kaybı anlamlı derecede azaltarak hücreleri koruduğunu ve lentiviral PDIA3 ekspresyonunun prion ile enfekte olmuş farelerin hayatta kalma süresini uzattığını göstermiştir (Thapa ve ark., 2018).

PDIA3'ün, şaperon özelliklerinden beklendiği gibi yanlış katlanmış prion proteinleri ile fiziksel olarak etkileşime girebildiği bildirilmiştir (Torres ve ark., 2015). Ayrıca, sinir sisteminde PDIA3 için koşullu bir nakavt fare oluşturulduğunda, beyindeki mono- ve glikosile-edilmemiş PrP formlarının kararlı durum seviyelerinde bir azalma tespit edilmiştir ve buna karşılık, PDIA3 transgenik fareler; artan endojen PrP seviyeleri göstermiştir. Bu şekilde Torres ve ark.'nın 2015 seneli makalesinde fonksiyon kaybı ve kazanımı çalışmalarıyla PDIA3; PrP seviyelerinin yeni bir modülatörü olarak tanımlanmıştır (Torres ve ark., 2015).

Parkinson Hastalığı (PH) ve Periferik Nöropati (PN)

Parkinson hastalığı (PH), substantia nigra'da dopaminerjik nöronlarının ilerleyici kaybı ile karakterizedir. PDIA3 ve PDIA1'in PH'nin hücrel modelleriyle yapılan iki gen ekspresyon profili çalışmasında artış gösterdiği bulunmuştur ve ER stres yanıtındaki

önemli değişiklikler olarak tanımlanmışlardır (Holtz & O'Malley, 2003; Ryu ve ark., 2002). Daha sonra yapılan bir çalışmada, PDIA1'in artan ekspresyonu, alfa-sinüklein (α -syn) transgenik farelerde de gözlenmiştir (Colla ve ark., 2012) ve hücre modellerinde PDIA1'in α -syn agregasyonunu önlediği rapor edilmiştir (Perri ve ark., 2017).

PH'yi taklit eden, dopaminerjik nöronları seçici olarak öldüren ve ER stresini indükleyen bir nörotoksin olan 6-hidroksidopamin (6-OHDA) uygulamasının murin mezensefalik dopaminerjik hücrelerde (MN9D) PDIA3 oksidasyonunu ve PDIA3-DNA konjugat oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. PDIA3'ün toksin aracılı strese erken adaptif yanıtta rol oynadığı öne sürülmüştür (Kim-Han & O'Malley, 2007). Bununla birlikte aynı makalede, PDIA3'ün oksidasyonunun, PH'nin *in vitro* modellerinde yüksek moleküler ağırlıklı PDIA3 içeren agregatların birikmesine neden olduğu ve bu durumun PH'de bulunan hücresel hasardan en azından kısmen sorumlu olabilecek agrezomların oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Kim-Han & O'Malley, 2007). Benzer şekilde başka bir makalede, hiperoksik koşullar altındaki endotel hücrelerde PDIA3'ün baskılanmasının aslında apoptotik olayları bastırdığı söylenmektedir (Xu ve ark., 2009)

İlginç bir şekilde PDIA3; ALS ve Prion gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilirken koruyucu bir ajan olarak davranıyorken, Parkinson hastalığı durumunda olduğu gibi hastalığa katkıda bulunan zararlı bir molekül gibi davrandığı da gözlemlenmektedir (Turano ve ark., 2011). PDIA3'ün strese duyarlı bir protein veya DNA hasarını tanıma süreçlerinde yer alan bir protein olarak **Bölüm 2.2.1.'de** bahsi geçen davranışları hakkında da daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Periferik nöropati (PN), duysal, motor ve otonom sinirlerin işlev bozukluğu olarak tanımlanan yaygın bir nörolojik sorundur. Çalışmalar, PH hastalarında periferik nöropatinin (PN) yaygın olduğunu bildirmektedir (Toth ve ark., 2010). Nöral-spesifik PDIA3'ün transgenik farelerde aşırı ekspresyonu, siyatik sinire mekanik hasardan sonra periferik sinir rejenerasyonunda belirgin bir etki ortaya çıkarmıştır. PDIA3-transgenik fareler; muhtemelen dejenere olmuş miyelin kılıflarının miktarındaki bir azalma ve hızlandırılmış rejenerasyon nedeniyle, yaralanmadan sonra anlamlı derecede lokomotor iyileşmesi göstermiştir. Bu sonuçlar ilk kez ER proteostaz mekanizmasının aksanal rejenerasyondaki işlevsel rolünü işaret etmiştir (Castillo ve ark., 2015).

Frontotemporal Demans (FTD)

Sisteinden zengin bir glikoprotein olan progranülin'in (PGRN) mutasyonlar sonucu azaltılmış üretimi veya aktivitesi (Baker ve ark., 2006), demansın en sık görülen ikinci türü olan frontotemporal demansta (FTD) ailesel vakaların yaklaşık %20'sinden sorumludur (Almeida ve ark., 2011). Almeida ve meslektaşları, PDIA3'ü PGRN ile doğrudan etkileşime giren bir protein olarak tanımlamıştır. PDIA3, murin mikrogliasında PGRN'nin salgılanmasına aracılık etmektedir ve PDIA3'ün akut susturulmasının PGRN'nin salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. GRN varyantları ve PGRN'nin düşük serum seviyeleriyle ilişkilendirilen, nörolojik tutulumlu bir lizozomal depo hastalığı olan Gaucher hastalığında (GH) da ailesel FTD'deki gibi PGRN'nin PDIA3 aracılığı ile hedeflenmesiyle koruyucu bir terapötik modülasyona gidilebileceği tahmin edilmektedir (Jian ve ark., 2016) (Almeida ve ark., 2011).

İskemi

PDIA3'ün sinir sistemi hastalıklarında koruyucu bir işlevi, bir Tat-PDIA3 füzyon proteini kullanılarak önerilmiştir. Burada Tat alanı, PDIA3 proteinini herhangi bir hücrel toksisite olmadan hippocampal hücrelere iletebilmek için kullanılmıştır ve Tat-PDIA3, bu hücrelerde stabil bir şekilde eksprese edilebilmiştir. Bu çalışma, Tat-PDIA3'ün oksidatif hasarı azaltarak ve UPR ile ilgili apoptotik yolağı bloke ederek iskemiye karşı nöroprotektif bir ajan olarak hareket ettiğini göstermiştir (Yoo ve ark., 2019).

Travmatik Beyin Hasarı (TBI)

Wang ve ark. tarafından travmatik beyin hasarı (TBI) üzerine yapılan bir çalışma, PDIA3 eksikliğinin, farelerin beyin örneklerinde inflamasyonu hafiflettiğini, TBI ile birlikte PDIA3 delesyonunun Oksijen-Glukoz Yoksunluğu ve Re-oksjenasyon (OGDR) uygulaması yapılan astrositlerde inflamasyonu, oksidatif stresi ve apoptozu azalttığını göstermiştir (Wang ve ark., 2019).

Huntington Hastalığı (HH)

Mutant huntingtin toksisitesini azaltan bileşikler için küçük bir molekül taraması, tümü PDIA1 ve PDIA3'ü hedef alan ve inhibe eden beş molekül tanımlamıştır (Hoffstrom ve ark., 2010). Bu beklenmedik bulgular, aynı çalışmada Huntington hastalığı (HH) ve **Bölüm 2.2.2.1.**'de anlatılacağı gibi Alzheimer Hastalığı (AH) modellerinde PDIA1 ve PDIA3 düzeylerinin doğrudan manipülasyonu yoluyla doğrulanmıştır.

PDIA3 veya PDIA1'in inhibisyonunun, *in vitro*da mutant Huntingtin proteini aracılı toksisiteyi ve bu protein tarafından indüklenen nöronal dejenerasyonu bastırdığı gösterilmiştir (Hoffstrom ve ark., 2010). Ayrıca, PDI'ların BAK'a (b hücreli lenfoma-2 (bcl-2) homolog antagonist öldürücüye) bağlı bir şekilde mitokondriyal-dış membran geçirgenliğini (MOMP) indüklediği/uyardığı ve kanonik apoptoz yolağını tetiklediği ortaya konmuştur. Bu fenomen, ER ve mitokondri arasındaki membran temas bölgelerinde PDI birikimi ile ilişkilendirilmiştir (Hoffstrom ve ark., 2010). Çalışmada, izole edilmiş mitokondriye saflaştırılmış PDI'nın eklendiği ve sitokrom c'nin mitokondriyal salınımının izlendiği bir *in vitro* 'MOMP tahlili' kullanılmıştır. Fizyolojik koşullar altında PDI'nın MOMP'u indükleyen bir eşik konsantrasyonu olduğu ve küçük molekülü PDIA1/PDIA3 inhibitörlerinin bu katalitik aktiviteyi bastırdığı ve hücreyi apoptozdan kurtarabildiği bulunmuştur. Aynı çalışmada, PC12 hücrelerinde PDIA1 veya PDIA3'ün aşırı ekspresyonunun, MOMP tahlilini hücrel bir bağlamda taklit edip apoptozu indüklediği ve yine PDI inhibitörleri ile hücrelerin kurtarılabildiği gösterilmiştir (Hoffstrom ve ark., 2010). PDI'ların ER stresini hafifletme ve hücre sağkalımını desteklemedeki bilinen rolüyle çelişen bu yeni pro-apoptotik işlevi, protein yanlış katlanması ve hücre ölümü arasında yeni bir bağlantıyı (ikili işlev göstermelerini) temsil edebilir (Andreu ve ark., 2012).

2.2.2.1. PDIA3 ve Alzheimer Hastalığı

Vitamin D-nörodejenerasyon ilişkisi ilk olarak 1992 yılında Sutherland ve ark. tarafından AH hastalarının hippokampal CA1 ve CA2 piramidal hücrelerinde azalmış VDR mRNA seviyelerinin mevcut olduğunun öne sürülmesiyle önerilmiştir (Sutherland ve ark., 1992). Daha sonra, Vitamin D3'ün (1 α ,25(OH)2D3) beyin fizyolojisi (Cui ve ark., 2017), merkezi ve periferik nörolojik hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklardaki (Gezen-Ak ve ark., 2014; Mpandzou ve ark., 2016) rolleri incelenmeye başlamıştır. Ayrıca VDR geni ve AH arasındaki ilişki ilk kez grubumuzdaki insan SNP (tek nükleotid polimorfizmi) çalışmaları tarafından ortaya çıkarılmıştır (Gezen-Ak ve ark., 2007). **“Hücre Membranında Bulunan ve Hücre Dışına Salınan PDIA3”** bölümünde Vitamin D3'ün hücre membranında VDR'ye ek olarak PDIA3'ü de reseptörü olarak gördüğünden ve etkileşimlerinin hücreye olan etkilerinden bahsedilmiştir. Landel ve arkadaşları, Wistar sıçanlarının çeşitli dokularında VDR ve PDIA3'ün farklı ekspresyon seviyelerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. VDR beyin dokusunda daha az bulunurken PDIA3

yüksek oranda eksprese edilmektedir. Ayrıca, VDR çoğunlukla astrositlerde ifade edilirken PDIA3 beyindeki her hücre tipinde (saflaştırılmış nöron, astrosit, mikrogliya, oligodendrosit ve beyin endotel hücre kültürlerinde gösterilmiştir) bulunmaktadır. Araştırmacılar, farklı serebral hücre tiplerinde PDIA3'ün muhtemelen vitamin D3 eylemlerinin tek düzenleyicisi olduğunu öne sürdüler (Landel ve ark., 2018). Vitamin D'nin bu şekilde, bir steroid hormonu olarak iyi belgelenmiş aktivitelerine ek olarak, beyinde majör otokrin veya parakrin, hızlı, genomik-olmayan eylemleri tetikleyebildiği anlaşılmıştır (Landel ve ark., 2018).

Bir dizi çalışma, amiloid öncül proteininin (APP) beta- ve gama-sekretaz tarafından işlenmesinin sadece hücre yüzeyinde ve endozomda değil, aynı zamanda ER ve Golgi kompleksinde de meydana geldiğini ileri sürmüştür. Selivanova ve ark.'ın çalışmasında (2007), tam uzunluktaki APP'nin PDIA3 dahil olmak üzere çeşitli protein kalite kontrol ER şaperonları ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Araştırmacıların *in vitro* çalışmaları, yeni sentezlenen APP'nin, salgı yolağının ilk aşamaları sırasında amiloidojenik işlenmeye tabi tutulduğunu göstermektedir (Selivanova ve ark., 2007). Bu sonuçlardan yola çıkarak vitamin D'nin veya vitamin D eksikliğinin A β 'ya etkisi olup olmayacağı sorusunu araştırmalarına yönelten Dursun ve ark.; 16. embriyonik gündeki (E16) primer sıçan kortikal nöronlarında VDR ve PDIA3/1,25MARRS genleri ayrı ayrı veya aynı anda susturulduğunda bu üç grupta da nöronların hücre içi amiloid beta 1-42 (A β 1-42) üretiminin arttığını gözlemlemiştir. Bununla birlikte, 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulaması, A β 1-42'nin hücre içi üretimi ve salgılanmasını azaltmıştır. Araştırmacılar, ER'de veya erken sekretuar yolakta APP işlenmesi üzerindeki kontrolün kaybında PDIA3'ün bir rolü olduğunu öne sürmüştür, ancak bu sürecin vitamin D3 içerip içermediği açık değildir (Gezen-Ak ve ark., 2017). Bu arada, AH ile ilgili mekanizmalar üzerinde vitamin D ve terapötik olarak kullanılan analoglarını araştıran Grimm ve arkadaşları, D2 ve D3 analoglarının A β üretimini azalttığını ve nöroblastoma hücrelerinde ve vitamin D eksikliği olan fare beyinlerinde A β yıkımını arttırdığını bulmuştur (Grimm ve ark., 2017). Ayrıca, grubumuzun eski bir çalışmasında, VDR'ye ek olarak vitamin D katabolizması için gerekli olan ve A β tarafından vitamin D'nin aktif formunun üretilmesinden sorumlu olduğu bulunan 24OHaz'ın (Dursun ve ark., 2013a), hippocampusta kortikal nöronlara kıyasla daha yüksek gen ekspresyonunun görülmüş olmasıyla, hippocampal nöronların daha yüksek vitamin D gereksinimine ve vitamin D eksikliğinin kognitif bozukluk, nörodejenerasyon ve AH'deki potansiyel sonuçlarına

işaret edebileceği bildirilmiştir (Gezen-Ak ve ark., 2013). Gezen-Ak ve Dursun'un 2019'da yayınladığı bir derlemede, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ basit bir vitamin olarak değil, bir "nörosteroid" olarak tanımlanmıştır ve $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün nörodejenerasyon mekanizmalarına katılımının karmaşık olduğunun ve henüz aydınlatılmadığının altını çizmişlerdir, bu nedenle daha derinlemesine çalışmalara ihtiyaç vardır (Gezen-Ak & Dursun, 2019).

Ekibimizin daha önceki bir çalışmasında, AH'nin patolojik belirteci A β 'nin doğrudan etkisiyle VDR protein ekspresyonunun önemli ölçüde baskılanmasının LVSCC-A1C ekspresyonunu teşvik ederek ve NGF salınımını azaltarak nörodejenerasyonu indüklediği gösterilmiştir (Gezen-Ak ve ark., 2011). Ayrıca A β veya VDR siRNA tarafından indüklenen vitamin D-VDR yolağının bozulmasının, kortikal nöronlar üzerinde çok benzer etkilere sahip olduğu ve bu susturmanın A β toksisitesini taklit edebileceği tahmininde bulunulmuştur (Gezen-Ak ve ark., 2013). İlâveten, ekibimiz dahil pek çok araştırmacı tarafından amiloid kaynaklı sitotoksisteyi önlemek, inflamasyonu ve plak oluşumunu baskılamak ve A β 'nin fagositozuyla klirensini uyarmak için vitamin D takviyesi önerilmiştir (Dursun ve ark., 2013b). Öte yandan, vitamin D eksikliğinin A β birikimini nasıl uyardığı/arttırdığı bilinmemektedir. Bu soruyu cevaplamak için her iki vitamin D reseptöründen (VDR ve PDIA3) yoksun hayvanları kullanan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

İlk olarak AH lezyonlarında 1996 senesinde tanımlanan iNOS'un, A β indüklü bir komponent olarak immün yanıtta payı vardır. AH'deki inflamatuvar sürecin, yüksek seviyelerde nitrik oksit (NO) ve indüklenbilir nitrik oksit sentazın (iNOS) neden olduğu oksidatif ve nitrozatif hasarı içerdiği öne sürülmüştür. Ekibimiz tarafından kortikal nöronlar üzerinde yapılan bir çalışmada, farklı koşullar altında iNOS ekspresyonu araştırılmıştır. A β iNOS ekspresyonunu indüklerken Vitamin D'nin, A β kaynaklı sitotoksisteyi ve iNOS artışını önlediği görülmüştür. Bu çalışmanın önemli bulguları, vitamin D'nin kortikal nöronlarda iNOS'u PDIA3 yoluyla değil, VDR ile düzenlediği, A β varlığından bağımsız olarak VDR yokluğunun iNOS ekspresyonunu indüklediği ve vitamin D uygulamasıyla azaldığı gösterilen LVSCC-A1D'nin PDIA3'ün düşüşünde (transkripsiyon sonrası PDIA3 geninin susturulma durumunda) mRNA seviyelerinin indüklendiği gözlemdir. Parantez açmak gerekirse, literatürde L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı LVSCC-A1D, VDR'den bağımsız olduğu gösterilen ve vitamin D

varlığında PDIA3 yoluyla düzenlendiği öne sürülen, iyi bilinen bir vitamin D hedefidir. Ekibimizin önceki çalışmasında A β patolojisinin VDR baskılanmasını içerdiği gösterilirken, burada bahsedilen çalışma A β 'nin iNOS'u indüklediğini ve bu etkinin vitamin D-VDR yolağının bozulması vasıtasıyla olabileceğini göstermektedir (Dursun ve ark., 2013b) ve makale vitamin D takviyesini AH'nin tedavi ve önlenmesinde bir aday olarak önermektedir.

Ekibimizin bu makalesindeki başka bir önemli nokta, 48 saat boyunca VDR veya PDIA3 susturulmuş primer kortikal nöronlarda – PDIA3 susturmasında daha az olsa da – iki grupta da kontrole kıyasla anlamlı bir LDH salınımı (sitotoksiste) artışı gözlemlenmesidir. PDIA3 susturması iNOS ekspresyonunu etkilemese de sitotoksiste deneyleri, PDIA3 susturma işleminin, muhtemelen kortikal nöronlardaki diğer mekanizmalar aracılığıyla hücre hasarına veya ölümüne neden olabileceğini göstermektedir. VDR susturmasında görülen sitotoksiste kalsiyum homeostazının bozulmasından kaynaklanmaktadır ve bu susturma iNOS ekspresyonunu indüklemiştir (Dursun ve ark., 2013b). Ek olarak, ekibimizin 2017 yılındaki çalışmasında PDIA3 ve VDR'nin hem birlikte hem de ayrı ayrı olacak şekilde kısa süreli susturmalarındaki LDH seviyeleri (çift siRNA: 36 ± 24 , PDIA3 siRNA: $31,8 \pm 12$, VDR siRNA: $33,3 \pm 9$) bu çalışma ile son derece uyumlu çıkmıştır. LDH salınımıyla benzer şekilde apoptotik nöron sayısı da siRNA gruplarında anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır (Gezen-Ak ve ark., 2017).

PDIA3'ün katlanmamış ve/veya kümeleşmeye yatkın proteinlerle ilişki kurma eğilimi, normal deneklerin beyin omurilik sıvısında PDIA3'ün kalretikulin (CRT) ile birlikte fizyolojik koşullarda N-glikosillenmiş A β peptitleri ile bir kompleks oluşturduğunun bulunmasıyla doğrulanmıştır (Erickson ve ark., 2005) ve bu şekilde PDIA3, A β peptitlerinin kendi kendine birleşip kümelenmesini önleyerek ve A β peptitlerini çözünür halde tutmaya yarayan bir taşıyıcı protein özelliğine sahip olarak koruyucu bir role sahip olabilir (Turano ve ark., 2011). AH hastalarının plaklarında ise A β 'nin sadece çıplak bir peptit olarak mevcut olduğu bulunmuştur. Çözünmeyen A β agregatlarının oluşumunun, bu bahsedilen PDIA3-CRT-A β kompleksinin oluşturulamamasıyla birlikte APP'nin ER'de hatalı veya başarısız post-translasyonel işlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Erickson ve ark., 2005). Bu durum aynı zamanda yaşlanmanın tipik bir belirtisidir. Bu bağlamda, yaşla birlikte PDIA3

düzeylerinde ve yaşlı dokusundaki N-glikosillenmiş proteinlerde bir azalma olduğu bulunmuştur. Azalmış PDIA3 seviyeleri ve hücrenin N-glikosillenmiş proteinleri üretme kabiliyetinin azalması nedeniyle, A β glikosillenmemişse, A β 'nin çözelti içerisinde tutulma kabiliyeti daha da bozulabilir (Erickson ve ark., 2005).

PDIA3 ile yapısal benzerlik gösteren PDIA1'in nitrik oksit (NO) ile indüklenen S-nitrosilasyonu, PDIA1'in enzimatik aktivitesini inhibe ederek poli-übikitlenmiş proteinlerin birikmesine yol açmaktadır ve AH dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda katlanmamış protein yanıtını aktive edip, ER stres indüksiyonu sonrası nöronal hücrelerin apoptozuna sebebiyet verebilir. Honjo ve meslektaşları (2010), AH hastalarının beyinlerinde, PDIA1'in tau ile birlikte lokalize olduğu nörofibriler yumakları tanımlamıştır ve bu çalışma, AH'de anti-PDIA1 antikoruna immünopozitif inklüzyonların ilk raporudur (Honjo ve ark., 2010). Ayrıca, AH beyinlerindeki nörofibriler yumak taşıyan nöronlarda PDIA1 seviyelerinin, aynı yaştaki kontrollere kıyasla belirgin şekilde (9.5 kata kadar) artış gösterdiği bulunmuştur (Lee ve ark., 2010). Birlikte bu veriler, PDIA1 seviyelerinin artırılmasının, anormal protein agregasyonu ile ilişkili nörodejeneratif koşullara koruyucu bir yanıtı temsil edebileceğini ve protein homeostazının yeniden kurulmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Andreu ve ark., 2012).

“PDIA3 ve Huntington hastalığı” bölümünde bahsedilen Hoffstrom ve arkadaşlarının aynı makalesinde (Hoffstrom ve ark., 2010) yer alan deneyler, çalışma kapsamını genişletmek için APP'yi eksprese eden sıçan beyin kesitlerinde tekrarlanmıştır. Mutant Huntingtin sonuçlarına benzer şekilde, PDIA1 ve PDIA3'ün küçük moleküller tarafından veya shRNA susturulması ile inhibe edilmesi halinde MOMP uyarımının bastırılması sebebiyle; piramidal nöronlarda A β toksisitesinin doza bağlı olarak kurtarıldığı gözlemlenmiştir (Hoffstrom ve ark., 2010).

Yapısal olarak PDIA3'ün endojen ligandı-kalsitriol'e benzeyen ve iyi bilinen bitki türevli bir steroidal saponin olan Diosgenin'in (Tohda ve ark., 2012); PDIA3'ün eksojen bir aktivatörü olarak görev yaptığı ve bu şekilde aksonal yeniden büyümeyi farmakolojik olarak uyardığı, nesne tanıma hafıza bozukluğunu iyileştirdiği ve 5xFAD (beş ailesel AH mutasyonunu birlikte eksprese eden transgenik bir fare modeli) farelerinin serebral korteksindeki ve hippocampusundaki amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar dahil olmak üzere AH nöropatolojisini azalttığı rapor edilmiştir (Tohda ve ark., 2012). İlave

olarak, PDIA3 susturulmasından sonra diosgenin-indüklü aksonal büyümenin primer kortikal nöronlarda anlamlı ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir (Tohda ve ark., 2012).

Benzer şekilde, diosgenin türevi, kaprospinol'ün (diosgenin 3-kaproat); A β 1-42 infüzyonuyla oluşturulmuş AH modeli sıçanlarda hippocampal amiloid birikintilerini, astrogliyozu, nörodejenerasyonu ve tau proteininin fosforilasyonunu azalttığı ve hafıza fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği gösterilmiştir. Bu bileşiğin kan-beyin bariyerinden geçebildiğinin gösterilmesiyle araştırmacılar kaprospinol'ü AH tedavisi için umut verici bir ilaç adayı olarak konumlandırmıştır (Lecanu ve ark., 2010).

A β salgılanması, AH'ye özgü kronik bir inflamasyona yol açabilen mikrogliya aktivasyonu ile de ilişkilidir. Ölümsüzleştirilmiş bir insan mikrogliyal hücre soyu olan HMO6 hücrelerinin ve 5xFAD fare beyinlerinden alınan mikrogliyal hücrelerin A β 1-42 ile uyarılmasından sonra PDIA3 ekspresyon seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (Yoo ve ark., 2015). Bu gözlemler, PDIA3'ün AH sırasında mikrogliya aktivasyonunda çok önemli ve nöronal hücrelere göre farklı bir rol oynayabileceğini vurgulamaktadır. Mikrogliyal hücrelerde ve nöronlarda PDIA3 profilinin tamamen farklı olduğu tahmin edilmektedir.

Bölüm 2.2.1.2.'deki “Sitozolda PDIA3” kısmında detaylıca bahsedildiği gibi, PDIA3'ün mTOR kompleksi 1'in (mTORC1) montajı için gerekli olduğu, PDIA3'ün mTORC1 ile etkileşime girerek mTORC1'in redoks algılama mekanizmasının ve işlevselliğinin bir parçası olabileceği ve PDIA3 susturulmasının mTORC1'in fosforilasyon aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Ramirez-Rangel ve ark., 2011). Bu kompleks, besine duyarlı bir sinyal yolağının önemli bir bileşenidir ve aktivitesi, enerji metabolizmasının düzenlenmesine ek olarak beyin fonksiyonları, sinaptik plastisite ve biliş ile de ilgilidir. Nöronal mTOR sinyallemede kalıcı bir değişikliğin meydana gelmesi, yaşa bağımlı bilişsel gerileme ve AH'nin patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Sarbasov & Sabatini, 2005). Önemli olarak çalışmalar, A β 'nin mTOR sinyalini artırabildiğini, bir mTORC1 inhibitörü olan rapamisin'in ise hücre içi A β seviyelerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Talboom ve ark., 2015). AH patolojisinin gelişimi ve ilerlemesi ile hücrede yaşanan stres (Justice, 2018) mTORC1 üzerindeki PDIA3 redoks sensörü aktivitesini de değiştirebilir ve işlev bozukluğuna katkıda bulunabilir. Bu sebeple AH'nin ilerlemesinde PDIA3 seviyesindeki değişimlerin, PDIA3'ün iş birliğinde bulunduğu mTOR'un aktivitesini de değişikliklere uğratabileceği düşünülmektedir.

Son olarak, AH'de (Muramori ve ark., 1998) ve glokomda (Wilding ve ark., 2015) reaktif gliosis sırasında artış gösteren glial fibril asidik proteine (GFAP) karşı otoantiklorların, PDIA3 ile hücre yüzeyi etkileşimi yoluyla oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği savunulmaktadır (Wilding ve ark., 2015).

2.3. Alzheimer Hastalığı'nda ER Stresi, Katlanmamış Protein Yanıtı ve Şaperonların Önemi

Çoğu sekretuar ve transmembran proteinin biyogenezindeki sınırlayıcı adım olan protein katlanması, hücrede endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşmektedir. ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin birikiminin tetiklediği kronik ER stresi ise, başta Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı (HH) ve Creutzfeldt-Jakob Hastalığı (CJH) olmak üzere bir dizi nörodejeneratif hastalıkla bağlantılıdır (Andreu ve ark., 2012). Bu hastalıklar, sekretuar yolda gözlenen birçok kusurla birlikte hastalık-ilişkili proteinlerin; ER ile ilişkili degradasyon (ERAD) mekanizmasının bileşenleri, ER/Golgi trafiği, ER katlama ağı, ER kalsiyum ve redoks homeostazı ve protein degradasyon yolları (proteazom ve otofaji) ile fiziksel etkileşimini içermektedir (Andreu ve ark., 2012).

ER stresi, stresin hafifletilmesi ve proteostazın (proteinlerin biyogenezinin, katlanmasının, trafiğinin ve bozunmasının kontrolü) geri kazanılması amacıyla katlanmamış protein yanıtının (UPR) aktivasyonu ile sonuçlanır ve UPR çok sayıda genin ifadesinde değişikliğe ek olarak proteinlerin kalite kontrolünü sürdürmek için genel translasyonel baskılanma ve yanlış katlanmış proteinlerin ERAD ve otofaji ile degradasyonu yoluyla ER içindeki protein yükünün azaltılmasına ve şaperonların indüksiyonuyla protein katlanma kapasitesinin artmasına neden olur. Öte yandan UPR, kronik veya uzun süreli/geri dönüşü olmayan ER stresi durumlarında hücre homeostaziyi yeniden sağlamak için yeterli gelmediğinde, apoptotik belirteçlerin ekspresyonu yoluyla apoptotik sinyalleşmeyi aktive ederek hücre ölümünü de tetikleyebilmektedir (Rahman ve ark., 2018).

ER'de yüksek konsantrasyonda bulunan ve kalite kontrolün tüm aşamalarında yer alan önemli moleküler şaperonlar ve foldaz enzimleri/katlama katalizörleri üç gruba ayrılmaktadır. Isı şok protein ailesi üyelerinden Hsp70 ve Hsp90'ın dahil olduğu (immünoglobulin bağlayıcı protein-BiP olarak da bilinen GRP78'i ve GRP94'ü kapsayan) 'GRP (glukozla düzenlenen protein) sistemi', kalneksin ve kalretikulin'in dahil

olduğu ‘ER lektin-benzeri şaperon sistemi’ ve PDI (protein disülfid izomeraz) ailesinden PDIA1, PDIA3 ve PDIA4/ERp72’yi içeren ‘tiyol-disülfid oksidoredüktazlar’ bu üç grubu temsil etmektedir (Brown & Naidoo, 2012). Her şaperon grubu substrat özgüllüklerinde farklılık gösterir ve bu şaperonların ek bir fizyolojik özelliği; Ca^{2+} bağlayıcı proteinler olmaları ve ER’nin toplam Ca^{2+} depolama kapasitesine katkıda bulunmalarıdır. Bu nedenle, Ca^{2+} konsantrasyonundaki herhangi bir değişikliğin, bu proteinlerin katlanma kompleksleri oluşturma kapasitelerini azaltan şaperon fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Narayanasamy & Aradhyam, 2018).

UPR’ye ER transmembran proteini olan üç ER stres sensörü aracılık etmektedir: protein kinaz R (PKR)-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), inositol-gerektiren kinaz 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6). PERK, IRE1 ve ATF6, ER’nin protein katlama kapasitesindeki dalgalanmaları takip ederek ve stres sinyallerini sitozol ve nükleusa ileterek transkripsiyon faktörlerinin ve sinyal olaylarının spesifik ekspresyonlarının kontrolünün sağlanmasında görevlidir (Andreu ve ark., 2012). Normal koşullarda BiP/GRP78 ile ilişkileri nedeniyle PERK, IRE1 ve ATF6 pasif durumdadır. Stres koşulları altında ise, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi BiP/GRP78’in bu sensörlerden ayrılmasını teşvik ederek aktivasyonlarına ve sinyal yollarının başlatılmasına yol açar. Örneğin aktif hale gelen ATF6’nın nükleusa geçerek GRP78, GRP94, PDI ve C/EBP-homolog protein (CHOP) ile x-box bağlanma proteini 1 (XBP1) transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere protein katlanmasını kodlayan birtakım önemli genin transkripsiyonel aktivasyonunu başlattığı ve UPR sırasında her zaman sağkalım yanlısı yolak için sinyal vermesi sebebiyle ATF6’nın aktivitesinin diğer sensörler arasında benzersiz olduğu bilinmektedir (Narayanasamy & Aradhyam, 2018).

Alzheimer hastalığında (AH) görülen toksik A β proteininin birikimi; yüksek ROS seviyelerine, mitokondriyal redoks aktivitesinin hatalı çalışmasına ve ER stresi oluşumuna sebebiyet vermektedir (Singh ve ark., 2022). AH’de ER stresi ilk olarak amiloid plakların üretim kinetiğini düzenleyerek ve ikinci olarak bilişsel işlevleri değiştirerek ikili etki gösterebilmektedir (Halliday & Mallucci, 2015). Diğer taraftan sporadik AH’de değişen APP işlenmesinin nedenleri arasında ER stresiyle birlikte bozulmuş hücresel Ca^{2+} homeostazının yer aldığı düşünülmektedir (Rahman ve ark., 2018). Aktif protein sentezi, sinaptik plastisitenin ve hafızanın konsolidasyonunun/güçlenmesinin ayırt edici bir özelliğidir. AH hastalarından alınan

post-mortem beyin örnekleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, beynin hippocampal bölgesinde, yukarıda bahsi geçen PERK ve IRE1 gibi UPR kinazlarının ve GRP78'in artmış ekspresyonunun varlığı ortaya çıkarılmıştır. PERK sinyali ve protein translasyonunun kontrolü, AH modellerinde gözlemlenen bilişsel bozulma ile bağlantılı çıkmıştır (Rahman ve ark., 2018). Bu sonuçla uyumlu olarak, PERK knock-out'unun hippocampustaki A β yükünü önemli ölçüde azalttığı ve UPR inhibisyonunun umut verici bir terapötik hedef olma potansiyeli vurgulanmıştır (Halliday & Mallucci, 2015). İlave olarak, sinaptik protein sentezindeki azalmaya bağlı olarak bilişsel işlevlerin bozulması, PERK yolağında yer alan eIF2 α 'nın (ökaryotik başlatma faktörü 2 α) artan fosforilasyonu sırasında gösterilmiştir (Rahman ve ark., 2018) ve AH'de eIF2 α -P seviyeleri, yüksek BACE1 seviyeleri ile korele çıkmıştır (Halliday & Mallucci, 2015). Ayrıca, iyi bilinen bir tau kinaz olan bol miktarda glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β); AH hastalarının nöronal hücrelerinde GSK-3 β 'nin ER stresine bağlı kalsiyum sızıntısının bir sonucu olarak tetiklenebileceğini belirten p-PERK (fosforile PERK)-pozitif nöronların işaretlenmesiyle sergilenmiştir (Singh ve ark., 2022). Yapılan başka çalışmalarda, A β eksprese eden *Drosophila* nöronlarında ve agregat oluşturma eğilimli mutant tau varyantlarını ifade eden *C. Elegans* modellerinde; aktivitesi IRE1 sensörü tarafından düzenlenen ve UPR ile ilgili bir dizi geni kontrol eden XBP1'in ekspresyonunun nörotoksisitede azalmaya yol açarak koruyucu bir rol üstlendiği belirlenmiştir (Rahman ve ark., 2018). Ancak bu sonuçlara ters olarak, XBP1'in CDK5 (siklin bağımlı kinaz 5) dahil olmak üzere bir takım AH ilişkili proteini ve APP işlenmesinde A β 'ya dahil olan γ -sekretaz kompleksinde artışa sebep olduğu da bildirilmiştir (Halliday & Mallucci, 2015). Benzer şekilde, A β peptidinin, mitokondri ilişkili ER membranlarını (MAM'leri) hedefleyerek SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksisiteyi ve mitokondriyal bozukluğu ağırlaştırabilen IRE1 α -XBP1 yolağının aktivasyonunu indüklediği ve IRE1 α -XBP1 yolağının inhibisyonunun, SH-SY5Y hücrelerinde A β kaynaklı hasara karşı koruma sağladığı ifade edilmiştir (Chu ve ark., 2021). Birkaç çalışma, Presenilin genindeki bir mutasyon tarafından ER stresinin bozulmuş aktivasyonunun UPR'nin azalmasına yol açtığını ve AH'nin patogeneğinde rol oynadığını öne sürmüştür (Nomura ve ark., 2016). UPR'nin, AH'nin erken evrelerindeki aktivasyonu otofajinin uyarımı yoluyla koruyucu olabilirken sürekli UPR aktivasyonunun ise nöronlar için zararlı olabileceği öne sürülmektedir (Rahman ve ark., 2018).

etmenin ve PDIA1'in retikülön proteinleri tarafından ER'den yeniden dağılımının yanı sıra yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ile de ilişkilidir. Yaşla birlikte hem hücresel hem de ER proteostazının ve antioksidan savunmasının azalması, reaktif oksidatif ve azot türlerinin birikmesine neden olarak tüm hücrelerde oksidatif ve nitroztatif stresi arttırabilir. Özellikle nöronlar bu koşullara karşı savunmasızdır ve bu da onları yaşa bağlı dejeneratif koşullara duyarlı hale getirir (Perri ve ark., 2017). AH ile aşırı nitrik oksit (NO) üretiminin yakın ilişkili olduğu bulunmuştur ve S-nitrosile PDIA1, kontrollerin aksine AH ve PH hastalarının beyinlerinde belirgin görülmüştür (Nomura ve ark., 2016).

İlk olarak glukoz tükenmesinin sebep olduğu strese maruz kalan K12 hücrelerinde aşırı eksprese edilen bir protein olarak tanımlanan ve daha sonra bu aşırı ekspresyon yanıtının birçok hücre tipinde ve farklı stres indükleyici ajanlarla doğrulandığı PDIA3'ün; şaperon ve redoks aktivitelerinin, protein yanlış katlanması ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasar gibi hücresel stresin bazı zararlı etkilerine karşı koyması beklenir ve bir dizi çalışma bu davranışı doğrulamakla birlikte stresin türüne ve incelenen hücreye bağlı olarak tepkide ve sağlanan korumada büyük farklılıklar ortaya koymuştur (Turano ve ark., 2011). Ayrıca, PDIA3'ün veya diğer homolog PDI'ların knock-out edilmesiyle apoptozun önemli ölçüde arttığı da gözlemlenmiştir (Turano ve ark., 2011).

2.4. SH-SY5Y Hücre Hattı ve SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

İnsan nöron davranışını modelleyebilen birkaç ölümsüzleştirilmiş hücre hattı mevcuttur. Bunlar arasında, insan nöroblastoma (NB) hücre hatları yüksek oranda erişilebilirdir (Goldie ve ark., 2014).

İnsan nöroblastoma SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) hücreleri orijinal olarak; SH-SY, SH-SY5 ve son olarak SH-SY5Y hücre hattına üç kez klonlanmış olan SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) hücrelerinden türetilmiş bir altsoydu. Ana hücre hattı, sempatik/adrenerjik gangliyal nöroblastomlu 4 yaşındaki bir hastanın hem nöroblast-benzeri (N-tipi) hem de epitel-benzeri (S-tipi) hücreler içeren kemik iliği biyopsisinden 1970 yılında elde edilmiştir (Biedler ve ark., 1973).

Ortaya çıkmasından bu yana yaygın olarak kullanılan SH-SY5Y hücre hattı, PH, AH, ALS, iskemi gibi nörodejeneratif süreçlerle ilişkili çeşitli patolojik durumların incelenmesi, hücre canlılığı ve nörofizyoloji deneyleri ile biyokimyasal ve toksikolojik çalışmalar dahil olmak üzere çok sayıda sinirbilim uygulaması için uygun bir in vitro model sistem olarak hizmet vermektedir (Kalinovskii ve ark., 2022; Strother ve ark.,

2021). Nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y, bir nöronal fenotip ifade etmesi, düşük maliyetli ve erişilebilir olmasıyla birlikte bir insan hücre hattı olmasından dolayı çalışılacak hastalıkla ilgili proteinlerin yalnızca insan formunu eksprese ederek primer kemirgen nöron kültürü kullanımıyla ortaya çıkabilecek türler-arası etki sorununu ve etik kaygıları da bastırdığı için nörodejenerasyon araştırmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Cheung ve ark., 2009). Ayrıca bu hücreler, farklılaşmayı indükleyici ajanlar ile yapılan uygulamalar yoluyla morfolojik ve biyokimyasal olarak olgun primer nöron-benzeri özellikler kazanabilmektedir (Kovalevich & Langford, 2013).

Farklılaşmış ve Farklılaşmamış SH-SY5Y Hücrelerinin Karşılaştırması

Farklılaşmış ve farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri arasında önemli farklar mevcuttur. Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri hızla çoğalır, kutuplaşmaz, çoğunlukla küme halinde bulunur, yuvarlak hücre gövdeli birkaç morfolojik alt tip ve sadece birkaç kısa nörit (Yusuf ve ark., 2013) ortaya çıkarır ve nestin gibi olgunlaşmamış nöron belirteçlerini eksprese etmekle birlikte olgun nöronal belirteçlerden yoksundur (Lopes ve ark., 2010; Pahlman ve ark., 1995; Pahlman ve ark., 1984). Farklılaşırken ise bu hücreler etrafa nöritlerini uzatmaya başlar, kutuplaşabilir ve büyümeleri yavaşlar (Kovalevich & Langford, 2013). Homojen dağılımlı G0 aşaması popülasyonu gösteren ve tamamen farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin, olgun nöronların çeşitli belirteçlerini eksprese edebildiği ancak glial fibriler asidik protein (GFAP) gibi glial belirteçlerin ekspresyonuna sahip olmadığı saptanmıştır (Encinas ve ark., 2000). Ayrıca beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) ortamdan uzaklaştırıldığında bu hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir (Encinas ve ark., 2000). Bu da, farklılaşmış SH-SY5Y'nin aynı olgun nöronlarda olduğu gibi, sağkalımının trofik faktörlere bağlı olduğunu göstermektedir (Shiple ve ark., 2016). Bu nedenle, belirli bir deney için farklılaşmamış veya farklılaşmış hücrelerin kullanılmasına karar verirken, tüm bu özellikler dikkate alınmalıdır. Örneğin, farklılaşmamış durumdaki SH-SY5Y hücreleri, AH'de spesifik olarak etkilenen nöronların birkaç temel özelliğinden yoksundur (Krishtal ve ark., 2019).

SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

SH-SY5Y hücrelerinin nöroblast benzeri hallerinden olgun insan nöronlarına farklılaştırılmasında yaygın olarak kullanılan farklılaşma ajanları arasında forbol esterler (örneğin TPA; 12-0-tetradekanoil-forbol-13 asetat), retinoik asit (RA) (Pahlman ve ark., 1995), BDNF ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi nörotrofinler ve nöregulin gibi büyüme

faktörleri (Encinas ve ark., 2000), dibutril siklik adenosin mono fosfat (dbcAMP) veya hücre bölünmesini durduran ve apoptozu indükleyen staurosporin (Prince & Orelan, 1997) yer alır. Daha az sıklıkla kullanılan diğer farklılaşma faktörleri arasında ise 1,25-dihidroksikolekalsiferol (VitD3), kolesterol ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) bulunur (Kovalevich & Langford, 2013; Krishtal ve ark., 2019; Sarkanen ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar, SH-SY5Y hücrelerinde bu gibi ajanların kullanımıyla adrenerjik, kolinerjik ve dopaminerjik nöronlar gibi spesifik nöron alt tiplerinin seçilebildiğini göstermektedir (Xie ve ark., 2010). Bu da, SH-SY5Y hücrelerinin kullanımını çok sayıda nörobiyolojik deney için faydalı kılmaktadır (Shiple ve ark., 2016). SH-SY5Y hücreleri, dopaminerjik karakterleri nedeniyle genellikle PH için bir model olarak kabul edilse de, RA ve BDNF uygulamaları yoluyla AH çalışmaları için uygun olan baskın kolinerjik fenotipe farklılaştırılabilmektedir (Edsjo ve ark., 2003).

Bir A vitamini türevi ve sinyal molekülü olan Retinoik asit (RA) gibi ajanların hücre kültürü ortamına eklenmesiyle SH-SY5Y hücreleri uyarılarak terminal olarak farklılaştırılmış, nöron benzeri hücrelere olgunlaştırılabilir, bu da farklılaşmanın neden olduğu moleküler, metabolik, morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin daha net belirlenmesi için önemlidir (Filograna ve ark., 2015). Retinoik asit ile uyarılan farklılaşma; açık ara en iyi kategorize edilmiş ve en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir ve proliferasyonun inhibisyonu, nöritik süreçlerin oluşumu ve yayılımı, artan asetil-kolinesteraz (AChE), tirozin hidroksilaz (TH) ve nörona özgü enolaz (NSE) aktivitesi, nöronal nükleer antijen (NeuN), mikrotübül ile ilişkili protein-2 (MAP2), sinaptofisin, sinaps ilişkili protein-97 (SAP-97), β -III tubulin ve dopamin taşıyıcısı (DAT) gibi nöronal belirteçlerin ekspresyonu (Lopes ve ark., 2010), nörotransmitterlerin ve nörotransmitter reseptörlerinin indüksiyonu, iyon kanalı profilinin değişmesiyle plazma membranının artan elektriksel uyarılabilirliği, sinaptofisin pozitif fonksiyonel sinapsların oluşumu ve sinaptik veziküllerin gelişmiş üretimi ile ilişkilidir (Kalinovskii ve ark., 2022; Kovalevich & Langford, 2013; Sarkanen ve ark., 2007) ve bunlar nöronal olgunlaşma ile tutarlı özelliklerdir (Jamsa ve ark., 2004; Korecka ve ark., 2013; Simoes ve ark., 2021).

Tamamen farklılaşmış hücreler için mitozun ortadan kaldırılması gerekir ve bu nedenle tek başına retinoik asit bu hücreleri tam olarak farklılaştırmada yetersizdir. Buna karşı koymak için BDNF gibi ekzojen trofik faktörler sıklıkla kullanılır (Teppola ve ark.,

2016). Ayrıca, gelişmekte olan beyinde, nöronların finaldeki bağlantıları ve dendritik budaklanmanın artışı ve karmaşıklığı, nörotrofin protein ailesinden alınan sinyallerin etkisiyle belirlenir (McAllister ve ark., 1995). Bu aileden olan BDNF, kortikal katman 4 ve 5'teki piramidal nöronlar üzerinde derin bir etkiye sahiptir (Goldie ve ark., 2014). Buna ek olarak BDNF, mRNA'ları sinapsa hedefleme kapasitesi gösterir ve lokal olarak translasyonlarını teşvik eder (Miyata ve ark., 2005). Schratt ve meslektaşlarının çalışmasında BDNF'nin CamKII, NMDA reseptörleri NR1 ve NR3, PSD93 ve LIMK-1 gibi anahtar sinaptik bileşenlerin lokal translasyonunu uyarmak için gerekli olduğu gösterilmiştir (Schratt ve ark., 2004). Bu bulgulara ek olarak SH-SY5Y hücrelerinin RA ile farklılaştırılma protokolüne BDNF eklenmesinin nörit yoğunluğunda önemli bir artışa sebep olduğu, sinaptogeneze yol açtığı ve hücre sağkalımını düzenlediği ortaya konmuştur (de Medeiros ve ark., 2019). Dolayısıyla, BDNF'nin *in vitro* nöronal olgunlaşma için kullanılması (Encinas ve ark., 2000); nöron fenotipine ve daha da önemlisi nöronların *in vivo* gen ekspresyon profillerine daha yakından uyan hücreler üretilebileceğini düşündürmektedir (Goldie ve ark., 2014) ve birçok araştırma, RA ve BDNF'nin eşzamanlı uygulamalarının 5-6 günlük protokolünü kullanarak nöronal farklılaşma, hastalık modelleme ve ilaç taraması üzerine moleküler çalışmalar gerçekleştirmektedir (Goldie ve ark., 2014).

Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri ve Amiloid Beta (A β)

A β peptitlerinin nörona özgü etkilerinin incelenmesi için uygun hücresel modellerin kullanılması önemlidir. Retinoik asit ve BDNF ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinin A β 'ya duyarlılıklarının, farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerine kıyasla arttığı gösterilmiştir (Krishtal ve ark., 2017). Bu sebeple, farklılaştırılmış insan kökenli SH-SY5Y hücrelerinin; AD hastalarında amiloid peptitlerinin neden olduğu patolojik değişikliklerin ve bu süreçlerden sorumlu moleküler mekanizmaların tanımlanmasına ve ölçülmesine izin veren ve hem endojen hem de sentetik A β peptitlerinin toksisitesine karşı antagonist bileşiklerin taranması için de kullanılabilen bir model olarak sayılabileceği belirtilmiştir (Krishtal ve ark., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında, insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri nörona farklılaştırıldıktan sonra, amiloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) peptid uygulaması ile Alzheimer hastalığı (AH) benzeri bir *in vitro* patolojik model oluşturularak, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde $A\beta$ peptidinin işleme yolağında önemli bir rolü olabileceği ileri sürülen Protein Disülfid İzomeras A3'ün (PDIA3) hücre içi ve hücre dışındaki protein ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Bu amaçla $A\beta_{1-42}$ peptid uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinden protein izolasyonu sonrası hücre içi PDIA3 protein seviyesi, hücrelerin üst sıvısından ise hücre dışı PDIA3 protein seviyesi Western blot deneyleri ile tayin edilmiştir. Ardından çift immünfloresan işaretleme yöntemi kullanılarak, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin nöral fenotipleri ve endojen $A\beta_{1-42}$ ile endojen PDIA3'ün hücredeki lokalizasyonları gösterilmiştir. Yapılan $A\beta_{1-42}$ peptid uygulamasının muhtemel toksik etkisi ise sitotoksikite testi ile saptanmıştır. Bahsi geçen bütün yöntemler İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarları'nda (BNHAL) gerçekleştirilmiştir.

3.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü Deneyleri

Tez çalışmasında kullanılan insan nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücrelerinin (ATCC® CRL-2266) kültür deneyleri; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda optimize edilmiş protokole göre gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerine başlamadan önce SH-SY5Y kültür medyumunu hazırlandı. **Tablo 3-1**'de yer alan medyum içeriğindeki antibiyotik-antimikotik, kültür medyumunun içerisine sadece hücreler sıvı azot tankından çıkarılıp ilk kez kültür edilecekleri zaman eklendi ve yenileme medyumlarına dahil edilmedi.

Tablo 3-1: SH-SY5Y Hücre Kültür Medyumu İçeriği

<u>Bileşenler</u>	<u>Miktarları</u>
Minimum Esansiyel Medyum (MEM) (Gibco, 31095-029)	%44
F12 (Gibco, 21765-029)	%44
Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco, 10270106)	%10
Sodyum Piruvat çözeltisi (SigmaAldrich, P5280-25G) (100mM) (steril)	%1
MEM Esansiyel Olmayan Amino Asitler (100X) (ThermoFisher, 11140-050)	%1
Antibiyotik-antimikotik (100X) (Gibco, 15240062)	%0.05

- Hazırlanan taze kültür medyumu 0,22 µm’lik steril filtreden (JetBiofil, FCA-206-025) geçirildi ve 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde ısıtıldı.

3.1.2. Hücre Açılması ve Çoğaltılması

- Hazırlanıp ısıtılan taze medyumdan 100mm’lik steril kültür petrisine (Corning 3506. Corning Inc. New York, USA) ve ayrı bir 15 ml’lik tüpe 9 ml kondu ve her ikisi de inkübatöre kaldırıldı.
- Su banyosu 37°C’ye ayarlandı ve sıvı azot tankından çıkarılan SH-SY5Y hücreleri %70’lik etanol ile dezenfekte edildikten sonra su banyosuna konarak ~2 dakika çözdürüldü.
- 15 ml’lik tüp içerisinde önceden ısıtılmış olan 9 ml kültür medyumuna hücreler eklenerek çözündürüldü.
- Tüp 125 g’de 6 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında üst sıvı atıldı ve taze medyumdan 1 ml eklenerek hücreler resüspanse edildi.
- İnkübatörden çıkarılan ve içinde medyum olan 100 mm’lik steril kültür petrisine hücre ekimi gerçekleştirildi ve petri inkübatöre kaldırıldı.
- 2-3 günde bir hücre medyumu taze medyum ile değiştirildi.
- Hücre yoğunluğu %80-90’a ulaştığında, pasajlama (**Bölüm 3.1.4.**) yapıldı.

3.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanmasından Önce Poli-L-Ornitin (PLO) Kaplı Hücre Kültürü Petri'lerinin Hazırlanması

Çift immünfloresan işaretlemeye kullanılacak hücreler için, pasajlama gününden önce 35 mm'lik tekli steril hücre petrilere lamel yerleştirilip üzerleri poli-L-ornitin (PLO) ile kaplanmıştır. Protein izolasyonu için gereken hücrelere ise kaplama gerekmemektedir.

- PLO (SigmaAldrich, P-4957), steril MilliQ dH₂O içerisinde 1:50 oranında hazırlandı ve 0,22 µm'lik steril şırınga filtresinden (JetBioFil, FCA-206-025) geçirildi.
- 35 mm'lik steril hücre petrilere önceden otoklavlanmış 4'er steril hücre kültürü lameli kondu. Hazırlanan PLO solüsyonu lamellerin üzerine yavaşça bırakıldı ve petrilere 2 saat boyunca inkübe edildi.
- 2 saatin sonunda steril MilliQ dH₂O ile petrilere 3 kere hızlıca yıkandı.
- Petrilere antibiyotik-antimikotik içermeyen taze medyumdan 1 ml eklendi ve hücre ekimi yapılana kadar inkübatöre kaldırıldı.

3.1.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması

Bir petride SH-SY5Y hücreleri %80-90 yoğunluğa eriştiğinde bu hücrelerin pasajlanması gerekmektedir.

- 35 mm'lik 6 kuyulu steril kültür petrilere her kuyusuna ve PLO ile kaplı her 35 mm'lik tekli steril petriye, ısıtılmış taze medyumdan 1 ml kondu ve inkübatöre kaldırıldı.
- Hücreleri pasajlanacak olan 100 mm'lik kültür petrisinden eski hücre kültür medyumunu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- %0,25'lik (v/v) tripsin-EDTA'dan (Gibco, 25200-056) petriye 1 ml konarak hücreler bir kez petrinin ileri geri ve sağ sola hafifçe hareket ettirilmesiyle yıkandı ve beklemeden çekildi.
- Ardından hücrelerin petri tabanı ile bağlantılarının ayrılması için petriye 5 ml %0,25'lik (v/v) tripsin-EDTA konularak inkübatörde 2-5 dakika inkübe edildi.
- Hücrelerin durumu mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerin petrinin yüzeyinden ayrılıp medyum içerisinde yüzdükleri gözlemlendikten sonra, tripsini nötralize etmek için (tripsin-EDTA ile eşit hacimde olacak şekilde) 5 ml taze hücre kültür medyumunu eklendi ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril tüpe aktarıldı.

- Tüp 125 g’de 6 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjü takiben üst sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Hücre peletinin üzerine önceden ısıtılmış taze medyumdan 5 ml eklenerek resüspanse edildi. Hemasitometre ile hücre sayımı (**Bölüm 3.1.5.**) yapıldı.
- Kaplama yapılmamış lamelsiz 35 mm’lik 6 kuyulu petrilere ve PLO ile kaplanmış olan lamelli 35 mm’lik tekli petrilere; her kuyuda son hacim 1,5 ml olacak şekilde SH-SY5Y kültür medyumuna içerisinde %10 yoğunlukta hücre ekimi yapıldı ve inkübatöre kaldırıldı.
- Geri kalan hücreler %5 DMSO içerisinde donduruldu.
- SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırma protokolüne (**Bölüm 3.1.6.**) geçene kadar 2-3 günde bir kuyulardaki medyum taze medyum ile değiştirildi.

3.1.5. Hemasitometre ile Hücre Sayımı

- İçerisinde SH-SY5Y hücrelerinin süspanse edildiği kültür medyumundan 10 µl alınarak 0,2 ml’lik tüpe kondu.
- Üzerine 1:1 oranda Tripan mavisi boyası (GibcoBRL, 15250061. Invitrogen Inc., New York, USA) eklendi ve tüp içerisinde karıştırıldı.
- Hemasitometrenin her iki bölmesine hazırlanan karışımdan 10’ar µl alınıp yüklendi.
- Invert mikroskopta (Leica DM IL, Leica Microsystems Ltf., Heerbrugg, GE) hücre sayımı yapıldı ve sayım iki farklı araştırmacı tarafından tekrarlandı.
- Toplam hücre sayısı aşağıda yer alan formül ile hesaplandı (**Şekil 3-1**):

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{(A + B)}{2} * \frac{10^4}{ml} * C * 2$$

Şekil 3-1: Toplam Hücre Sayısı Formülü

A) Hemasitometrenin 1. bölmesindeki hücre sayısı; B) Hemasitometrenin 2. bölmesindeki hücre sayısı;
C) Hücrelerin çözündürüldüğü SH-SY5Y kültür medyumunun hacmi

3.1.6. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

- SH-SY5Y Nörona Farklılaştırma medyumuna, **Tablo 3-2**’de belirtilen medyum içeriğindeki Retinoik Asit ve BDNF eklenmeden hazırlandı ve filtreden geçirildi.
- Medyum 37°C’de ısıtıldı.
- Filtreden geçirilip ısıtıldıktan sonra medyumun içerisine **Tablo 3-2**’de belirtilen konsantrasyonda Retinoik Asit ve BDNF eklendi.

- PLO ile kaplı 35 mm'lik tekli petrilere ve kaplama yapılmamış 35 mm'lik 6 kuyulu petrilere %40-50'ye ulaşan SH-SY5Y hücrelerinin eski kültür medyumları uzaklaştırıldı.
- Nörona farklılaştırma medyumları hücrelere uygulandı.
- Hücreler hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı.
- 3 günde bir medyum değişimi yapıldı.
- Hücrelerin nörit gelişimleri mikroskop altında incelenerek takibi sağlandı.

3.1.6.1. Farklılaştırma Medyumunun Hazırlanması

SH-SY5Y Nörona Farklılaştırma Medyumunu aşağıdaki tabloda gösterilen konsantrasyonlar korunacak şekilde farklı hacimlerde hazırlanabilmektedir. Medyum, farklılaştırmanın yapılacağı gün taze hazırlandı. Retinoik asit ve Progesteron ışığa duyarlı olduğu için işlemler karanlıkta gerçekleştirildi. Farklılaştırmanın 4. gününden itibaren Konalbumin ve %1 FBS içermeyen Nörona Farklılaştırma Medyumunu kullanıldı.

Tablo 3-2: SH-SY5Y Nörona Farklılaştırma Medyumunun İçeriği

<u>SH-SY5Y Nörona Farklılaştırma Medyumunun Bileşenleri</u>	<u>Konulacak Miktar</u>
Nörobazal Medyum (NBM) (Gibco, 211030-49)	%95,5
B27 (50X) (Gibco, 17504-044)	%2
%9 NaCl Çözeltisi (S-3014) (steril)	%0,7
L-glutamin Çözeltisi (200mM) (100X) (Gibco, 25030-024)	%1
Putreskin dihidroklorür (100mM) (Sigma-Aldrich, P7505-25G)	100 nM
İnsülin (40µg/ml) (Gibco, 12585014)	10 ng/ml
Progesteron (40mM) (Sigma-Aldrich, P6149-1MG)	20 nM
Konalbumin (SigmaAldrich, C7786-100MG)	%0,25
FBS (Gibco, 10270106)	%1
Retinoik Asit (10mM) (Sigma-Aldrich, 122625-100MG)	10 nM

3.2. Aβ₁₋₄₂ Peptidi'nin Hazırlanması

Liyofilize olarak temin edilen 1 mg'lık Aβ₁₋₄₂ peptidi (Millipore AG912-1MG) üzerine 1 ml steril PBS (pH 7.4) eklenerek dikkatlice çözündürüldü ve stok 220μM olarak hazırlandı. 24 saat boyunca 37°C'de 1000 rpm'de ısıtıcı karıştırıcıda inkübe edilerek fibril oluşturuldu. 24 saatin sonunda stok solüsyonu, uygulamaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerine Aβ₁₋₄₂ Peptidi'nin Uygulanması ve Hücre Kültürü Grupları

Farklılaşmanın 7. gününde 6 kuyulu 35 mm'lik petri kuyularından üst sıvılar uzaklaştırılıp hücrelere taze hazırlanmış farklılaştırma medyumuna uygulandı. Ardından Aβ₁₋₄₂ peptit uygulamasıyla, Alzheimer Hastalığı benzeri bir model oluşturuldu.

Şekil 3-2'de farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü grupları ve bu gruplar üzerinden ilerleyen temsili deney akış şeması yer almaktadır.

Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücre Kültürü Grupları

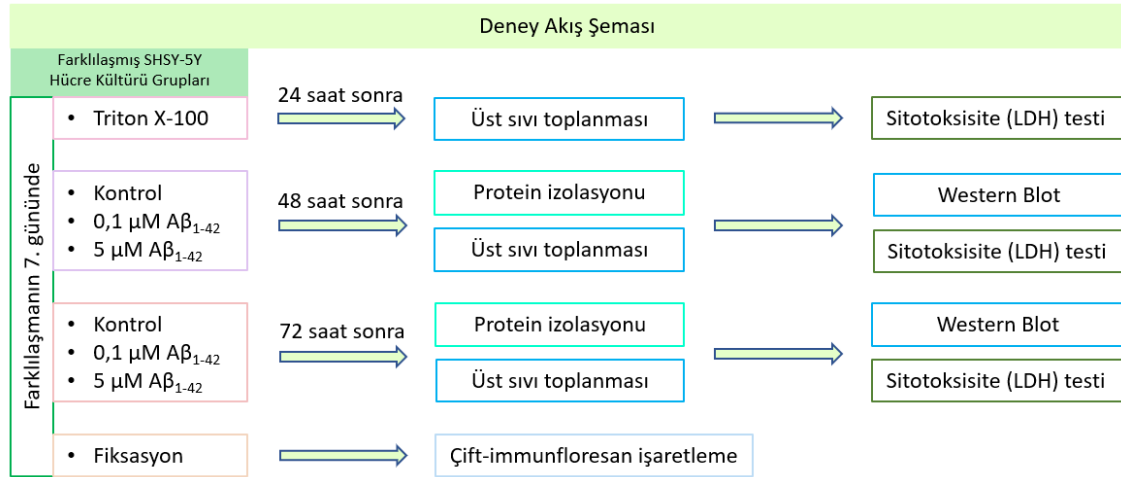
- **Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmayan grup. 48 ve 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve petrideki hücrelerden protein izolasyonu yapıldı.
- **0,1 μM Aβ₁₋₄₂ Grubu:** Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 0,1μM Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılan grup. 48 ve 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve petrideki hücrelerden protein izolasyonu yapıldı.
- **5 μM Aβ₁₋₄₂ Grubu:** Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 5 μM Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılan grup. 48 ve 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve petrideki hücrelerden protein izolasyonu yapıldı.

Bu gruplar dışında LDH ölçümünün değerlendirilmesi ve farklılaştırma protokolünün takibi için aşağıdaki deney grupları da kullanılmıştır:

- **LDH ölçümünün pozitif kontrol grubunu oluşturmak üzere Triton X-100 uygulanan hücreler:** Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinden salınabilecek en yüksek seviyedeki LDH miktarını belirlemek amacıyla kültür medyumuna %2 Triton X-100 verilen ve 24 saat sonra üst sıvısı toplanan yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu. Bu grup sadece LDH salınım testi için gerekli olan kontrol grubunu oluşturmak üzere kullanılmıştır.

- **Farklılaştırma protokolünün doğrulanması için fikse edilen hücreler:** PLO kaplı lamelli 35 mm'lik petrilere farklılaştırmanın 7. gününde olup herhangi bir uygulama yapılmayan hücreler çift-immunfloresan işaretlemeye kullanılmak üzere fikse edildi.

Gruplar iki tekrarlı çalışıldı. Ayrıca, elde edilen sonuçların doğrulanması için tüm deneylerin tekrarı gerçekleştirildi.



Şekil 3-2: Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücre Kültürü Grupları ve Deney Akış Şeması

3.3.1. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinin Fiksasyonu

35 mm'lik petrilere PLO ile kaplanmış lameller üzerinde farklılaştırılan hücreler, farklılaştırmanın 7. gününde immunfloresan deneylerinde kullanılmak üzere %3,7'lik paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi.

%3,7'lik paraformaldehit (PFA) hazırlanışı:

PFA (Sigma-Aldrich, 158127), son hacimdeki konsantrasyonu %3,7 olacak şekilde tartılıp dH₂O içerisinde çözündürüldü. Tamamen berrak bir hal alıncaya dek 65°C'ye ayarlı su banyosunda ısıtıldı. Hidroklorik Asit (HCl) ve Sodyum Hidroksit (NaOH) ile pH 7,4 olarak ayarlandı. PBS ile son hacme tamamlandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

- Lamel üzerinde farklılaştırılmış olan hücrelerin üst sıvısı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Petrilere %3,7'lik PFA (pH 7,4) uygulandı.
- 15 dakika, oda koşullarında inkübe edildi.
- PFA pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

- 3 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
- 3. yıkamanın sonunda hücreler IF işaretlemelerine dek PBS içerisinde +4°C’de saklandı.

3.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinin Çift İmmü Floresan İşaretleme Yöntemiyle Nöral Karakterlerinin Gösterilmesi

PFA ile fikse edildikten sonra 3 kere 10 dakika PBS ile yıkayıp +4°C’ye kaldırılan petripler çift immü floresan işaretleme için kullanıldı. 7 gün boyunca farklılaştırma medyumunda inkübe edilen insan SH-SY5Y hücrelerinin nöral karakterlerinin doğrulanması için mikrotübül ilişkili protein 2 (MAP2) ve dopaminerjik nöron belirteci olan Tirozin Hidroksilaz (TH) ile çift immü floresan işaretleme yapıldı. Ortak protokol, **Bölüm 3.5.1.**’de yer almaktadır ve kullanılan antikorların listesi **Tablo 3-3**’tedir.

3.5. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde, Endojen A β 1-42 ve Endojen PDIA3’ün Lokalizasyonlarının Çift İmmü Floresan İşaretleme Yöntemiyle Gösterilmesi

Farklılaştırmanın 7. Gününde fikse edilip uygulama yapılmamış hücrelerdeki endojen Amiloid beta 1-42 (A β 1-42) ve endojen Protein Disülfid İzomeras A3’ün (PDIA3) çift immü floresan işaretlemeyle hücredeki lokalizasyonları görüntülenmiştir. Protokol aşağıda belirtilmiştir.

3.5.1. Çift İmmü Floresan İşaretleme Protokolü

Hücrelerin nöral fenotiplerinin ve endojen PDIA3 ile endojen A β 1-42’nin lokalizasyonlarının gösterilmesinde aşağıdaki protokolden yararlanılmıştır.

1. Gün

- Fikse edilen hücrelerden oluşan kültür lamellerinin her biri 24 kuyulu plakanın bir kuyusuna aktarıldı.
- Lamellere bloklama solüsyonu uygulandı.

***Bloklama solüsyonu:** %0,02 TPBS [%0,02 triton x-100 (Sigma, X-100) içeren PBS] içinde hazırlanan %30 keçi serumu içerir.*

- 1 saat oda koşullarında çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Bloklama solüsyonu çekildikten sonra 3 kez PBS ile hızlıca yıkandı, primer antikor solüsyonu uygulandı.

Primer antikor uygulama solüsyonu:

%0,02 TPBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu ve primer antikor içerir.

- Gece boyu +4°C’de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

2. Gün

- Primer antikor solüsyonu toplandı, 3 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
- Bu aşamadan itibaren bütün işlemler karanlıkta gerçekleştirildi. Sekonder antikor solüsyonu uygulandı, 1 saat oda koşullarında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

Sekonder antikor uygulama solüsyonu:

%0,02 TPBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu ve sekonder antikor içerir.

- Sekonder antikor solüsyonu toplandı, 3 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
- 2. Bloklama solüsyonu uygulandı, 30 dakika oda koşullarında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

2. Bloklama solüsyonu:

%0,02 TPBS [%0,02 triton x-100 (Sigma, X-100) içeren PBS] içinde hazırlanan %10 keçi serumu içerir.

- 2. Bloklama solüsyonu çekildikten sonra 3 kez PBS ile hızlıca yıkandı.
- Primer antikor solüsyonu uygulandı ve 2 saat oda koşullarında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

2. Primer antikor uygulama solüsyonu:

%0,02 TPBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu ve primer antikor içerir.

- Primer antikor solüsyonu toplandı, 3 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
- Sekonder antikor solüsyonu uygulandı, 1 saat oda koşullarında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

2. Sekonder antikor uygulama solüsyonu:

%0,02 TPBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu ve sekonder antikor içerir.

- Sekonder antikor solüsyonu toplandı, 2 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
- 2. yıkamadan hemen sonra her kuyuya 1:15000 oranında PBS ile sulandırılmış 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI) (SantaCruz, sc-3598) uygulandı, 15 saniye bekletilip çekildi.
- 1 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
- Lameller, kapatma medyumunu (ThermoFisher, P36970) damlatılmış lamların üzerine ters şekilde kapatıldı.
- Görüntüleme için BioTek Lionheart FX sistemi kullanıldı.

Tablo 3-3: IF deneylerinde kullanılan antikorların listesi

<u>Antikor Tipi</u>	<u>Antikor</u>	<u>Konak Organizma</u>	<u>Seyreltme Oranı</u>
Primer Antikor	Anti-beta Amiloid 1-42 (Abcam, ab10148)	Tavşan	1:100
	Anti-Tirozin Hidroksilaz (Invitrogen, 701949)	Tavşan	1:75
	Anti-PDIA3 (Novus, NBP2-59689)	Fare	1:150
	Anti-MAP2 (Invitrogen, 131500)	Fare	1:500
Sekonder Antikor	Anti-fare IgG Alexa Fluor 568 (Abcam, ab175473)	Keçi	1:200
	Anti-tavşan IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A-11034)	Keçi	1:200

3.6. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinden Protein İzolasyonu

48 ve 72 saatlik A β ₁₋₄₂ uygulamalarını takiben bütün gruplardan total protein izolasyonu yapıldı.

- İzolasyon öncesinde, içeriği aşağıdaki tabloda belirtilen Lizis Tamponu hazırlandı (**Tablo 3-4**).

Tablo 3-4: Protein İzolasyonunda Kullanılan Lizis Tamponu Bileşenleri ve Miktarları

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim*</u>
Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi (MPER) (Thermo Scientific, 78501)	150 μ l
Fosfataz İnhibitörü (Roche, 4906845001)	15 μ l
Halt Proteaz İnhibitör Kokteyli (Thermo Scientific, 78430)	1,5 μ l

*Tabloda yer alan hacimler iki 35 mm'lik kuyu için hesaplanan miktarı göstermektedir.

- Kuyulardan üst sıvılar çekilip 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Western Blot ve LDH testlerine kadar tüpler -80°C'de saklandı.
- Aynı grupta yer alan her ikili kuyuya totalde 150 μ l Lizis Tamponu dağıtıldı. Hücreler hücre kazıyıcısıyla kazındıktan sonra pipet yardımıyla 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Diğer kuyulardaki gruplar için de aynı işlem tekrar edildi.

- Bütün tüpler pipetaj ve vorteksten geçirildikten sonra 14000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Üst sıvılar steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- İzole edilen proteinler Western Blot deneyine kadar -80°C'de saklandı.

3.7. Western Blot Protokolü

Amiloid beta 1-42 peptit uygulaması sonrası 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirildikten sonra PDIA3 proteinin hücre içi ve hücre dışı ekspresyon seviyelerinin gruplar arası karşılaştırmalı analizlerini yapabilmek için önce tüm grupların hücre üst sıvısı toplandı ve hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı, ardından Western Blot deneyleri gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılmış olan antikorlar ve seyreltme oranları aşağıdaki gibidir (**Tablo 3-5**).

Tablo 3-5: Western Blot'ta Kullanılan Antikorlar ve Seyreltme Oranları

<u>Antikor tipi</u>	<u>Antikor</u>	<u>Konak Organizma</u>	<u>Seyreltme Oranı</u>
<u>Primer Antikor</u>	Anti-ERp57/PDIA3 (Novus, NBP2-36765)	Fare	1/1500
	Anti-beta Aktin (ACTB) (Abcam, ab8226)	Fare	1/3000
<u>Sekonder Antikor</u>	Anti-fare IgG H&L (HRP) (Abcam, ab97040)	Keçi	1/3000

- Western Blot yöntemine başlanmasından önce, izole edilen proteinlerin konsantrasyonları NanoDrop One (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.
- Belirlenen protein konsantrasyonları doğrultusunda her bir gruba ait protein örneğinden alınacak hacim, eşit konsantrasyona sabitlenerek hesaplandı ve 1,5 ml'lik vida kapaklı tüplere aktarıldı. Hücre üst sıvılarının her biri ise 1,5 ml'lik vida kapaklı tüplere eşit hacimde konuldu.
- İçerisine %10 beta-merkaptotanol (Applchem, A1108,0500) eklenerek hazırlanan 4X Bolt LDS (Lityum Dodesil Sülfat) Yükleme Tamponu (Invitrogen, B0007) final konsantrasyonu 1X olacak şekilde, vida kapaklı tüplerdeki örneklerin üzerine eklendi.

- Elektroforez tankına Bolt %4-12 Bis-Tris Plus jel (Invitrogen, NW04120BOX) yerleştirildi.
- Yürütme Tamponu; 20X Bolt MES SDS'in (Sodyum Dodesil Sülfat) (Invitrogen, B0002) final konsantrasyonu 1X olacak şekilde dH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlandı ve elektroforez tankı Yürütme Tamponu ile dolduruldu.
- MagicMark XP Western Protein Standard (ThermoFisher, LC5602) ve PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher, 26619) 1:1 oranında karıştırılarak protein standardı hazırlandı.
- Protein örnekleri 95°C olan suda 5 dakika kaynatılıp kısaca santrifüj edildikten sonra jele yüklendi. Jelin ilk kuyusuna ise hazırlanan protein standardı yüklendi.
- Örnekler dikey jel elektroforez sisteminde (Invitrogen PowerEase500) (200V, 500 mA, 25 dakika) yürütüldükten sonra, Biorad Trans-Blot Turbo cihazında PVDF membrana (ThermoFisher, PB3210) yarı kuru transfer gerçekleştirildi.
- Bloklama için %1'lik Bovin Serum Albumin (BSA), ana stok olan %7,5'luk BSA'nın (Gibco, 15260-037) PBS (Invitrogen, 00-3002) içinde çözünmesiyle hazırlandı ve PVDF membrana aktarılan proteinler %1'lik BSA ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilerek bloklandı.
- Membran 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.
- %0,5 BSA içeren PBS içerisinde 1/750 oranında anti-PDIA3 (Novus, NBP2-59689) primer antikor uygulandı. +4°C'de gece boyu inkübe edildikten sonra primer antikor toplandı ve 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.
- %0,5 BSA içeren PBS içerisinde 1/3000 oranında HRP'ye bağlı anti-fare IgG (Abcam, ab97040) sekonder antikor uygulandı ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.
- Luminol ve hidrojen peroksit çözeltileri içeren kemilüminesan substrat (Thermo Scientific, 34580) ile membran muamele edildi.
- DNR MicroChemi 4.2 MP cihazında görüntüleme yapıldı ve ImageJ yazılımıyla grupların bant yoğunluklarının ölçümleri alındı.

3.7.1. Membran Soyma ve Referans Protein İşaretlemesi

PDIA3 işaretlenen membranda primer ve sekonder antikor kompleksini ayırmak üzere soyma protokolü uygulandıktan sonra referans protein olarak beta aktin (ACTB) işaretlemesi yapıldı.

Tablo 3-6: Soyma Tamponunun İÇeriği*

<u>Bileşenler</u>	<u>Miktarları</u>
Glisin (Sigma, G2879-100G)	25 mM
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma, L-4509)	%1

*pH 2.0

- Membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda soyma tamponu (pH 2.0) **(Tablo 3-6)** ile inkübe edildi ve 3 kez PBS ile yıkandı.
- %5 yağsız süt tozu (BioShop, SKI400) içeren PBS ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama yapıldı. 3 kez PBS ile yıkandı.
- %5 yağsız süt tozu içeren PBS içerisinde 1/3000 dilüsyon oranında çözdürülen aktin beta (ACTB) hedefleyen primer antikor (Abcam, ab8226) uygulandı.
- +4°C’de gece boyu inkübe edildikten sonra primer antikor toplandı ve 3 kez PBS ile yıkandı.
- %5 yağsız süt tozu içeren PBS içerisinde HRP’ye bağlı fare IgG hedefleyen sekonder antikor (Abcam, ab97040) uygulandı ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra 3 kez PBS ile yıkandı.
- **Bölüm 3.7.**’de belirtildiği gibi görüntüleme çözeltisi muamelesini takiben görüntü alındı.

3.8. Sitotoksisite Testi

Plazma membran bütünlüğü bozulan ve sitoplazmik laktat dehidrogenaz (LDH) enzimini dışarı sızdıran hasarlı/ölü hücrelerin LDH aktivitesi ölçülebilmektedir. Yapılan uygulamaların muhtemel toksik etkilerini belirlemek adına, sitotoksisite testi olarak her grubun hücre kültür medyumundaki LDH miktarı ölçüldü.

Sitotoksisite testlerinde kullanılmak üzere yüksek ve düşük salınımlı kontrol grupları, çalışmada yer alan deney gruplarıyla birlikte hazırlandı (**Bölüm 3.3.**).

- Düşük salınımlı kontrol: Normal koşullar altındaki hücrelerin spontane LDH salınımını belirlemek için; uygulama yapılmamış olan, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürünün üst sıvısı toplandı.
- Yüksek salınımlı kontrol: Hücrelerden salınabilecek en yüksek LDH miktarını belirlemek için; farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültür medyumuna Triton X-100 (son konsantrasyon %2 olacak şekilde) eklendi ve bu hücreler Triton X-100 ile 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda kültür medyumı toplandı.

LDH ölçüm gruplarından ve uygulama sürelerinin bitiminde yapılacak olan total protein izolasyonları öncesinde deney gruplarından hücre kültür üst sıvıları toplandı ve ölçüm vaktine dek -80°C’de muhafaza edildi. Ölçüm günü, her grubun LDH salınımının tayini için Sitotoksiste Tespit Kiti (LDH) (Roche, 11644793001) kullanıldı. 96 kuyuluk bir plakadaki kuyulara -80°C’den çıkartılan ve oda sıcaklığına getirilen üst sıvılardan 100’er µl kondu ve her grup 3 tekrarlı yüklendi. Kuyulara yüklenen üst sıvıların üzerine LDH ölçüm kitinde belirtilen şekilde hazırlanan; katalizör ve boya çözeltisi içeren karışımdan 100’er µl eklendi. Ayrıca cihaza negatif kontrol olarak deneyde kullanılmış olan farklılaştırma medyumunun kendisini de yükleyerek, kültür medyumundan kaynaklı bir optik yoğunluk (OD) değişimi varsa elimine edilmiş oldu.

Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildikten sonra Multiskan EX (Thermo Scientific) mikropilaka fotometre cihazında 492 nm’lik filtre ile örneklerin absorbanslarının ölçümü alındı. Önce her örnek için elde edilen 3 absorbans değerinin ortalaması alındı ve bu değerlerden farklılaştırma medyumunun (negatif kontrolün) 3 ölçümünün ortalaması çıkarıldı. Ardından grupların LDH salınım yüzdeleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak **Şekil 3-3**’teki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Sitotoksiste (\%)} = \frac{(A_{492}[\text{Beklenen değer}] - A_{492}[\text{Düşük Kontrol LDH}])}{(A_{492}[\text{Yüksek Kontrol LDH}] - A_{492}[\text{Düşük Kontrol LDH}])} \times 100$$

Şekil 3-3: Sitotoksiste Yüzdesi Formülü

[Beklenen Değer]: Sitotoksitesi hesaplanacak olan grubun absorbans değeri, [Düşük Kontrol LDH]: Düşük salınlı kontrol grubunun absorbans değeri, [Yüksek Kontrol LDH]: Yüksek salınlı kontrol grubunun absorbans değeri

3.9. İstatistiksel Analizler

Hedef protein olan PDIA3’ün gruplar arası 48 veya 72 saat aralığındaki göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere, aynı membran üzerinde elde edilen PDIA3 ve ACTB işaretli WB görüntülerindeki bant yoğunluklarının ham verileri; bilimsel görüntüleri işlemek ve analiz etmek için kullanılan Image J (1.53v sürümü) yazılımı ile tayin edildikten sonra PDIA3 WB işaretlemesinin ölçümleri, ACTB WB işaretlemesinin ölçümlerine oranlanarak işlenmiş veriler elde edildi. Bu verilerin istatistiksel analizleri yapıldı.

Aynı saat aralığında farklı gruplar arasındaki göreceli PDIA3 ekspresyon seviyelerinin ve sitotoksiste deneyleri gerçekleştirilen tüm grupların verileri; GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) yazılımında veri

dağılımının normalite testini geçip geçmemesine ve elde edilen standart sapmalar (SD'ler) arasındaki farkın anlamlı olup olmamasına göre, önce tek yönlü ANOVA ardından Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile veya önce Kruskal-Wallis testi ardından Dunn çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve elde edilen veriler grafik haline getirildi. $p < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edildi.

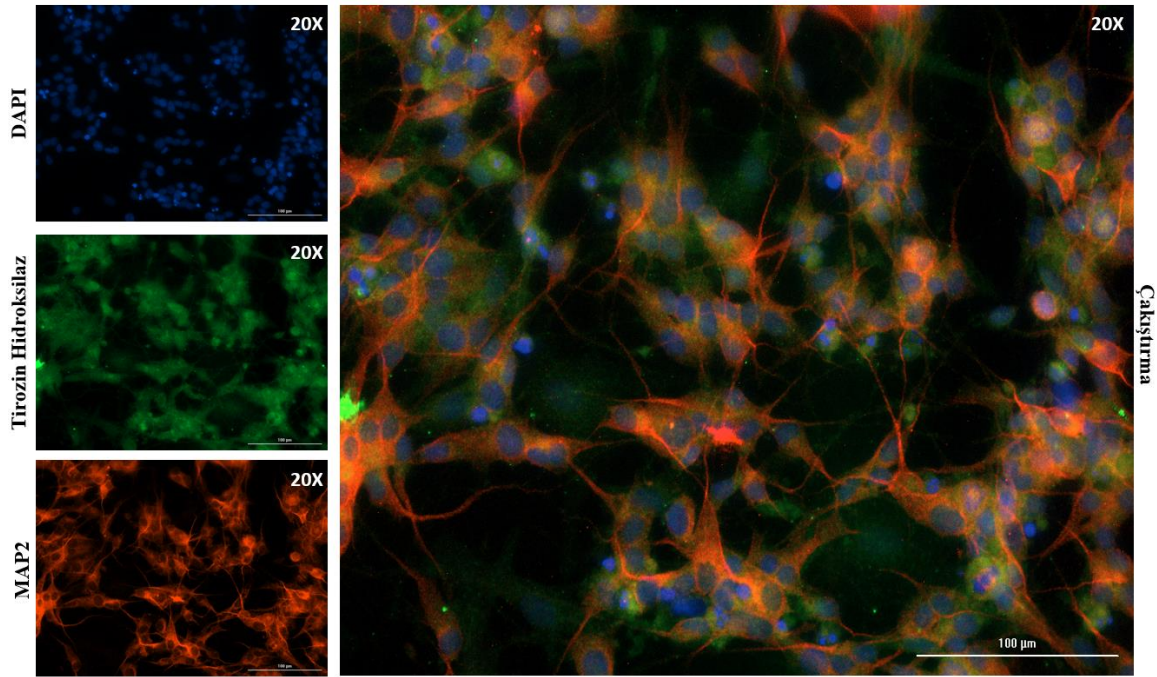


4. BULGULAR

4.1. Çift İmmüno Floresan İşaretleme Sonuçları

4.1.1. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinin Nöral Karakterlerinin Gösterimi

Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin nöral karakterlerini doğrulamak ve RA/BDNF uygulamaları ile yapılan farklılaştırmanın başarısını kontrol etmek için hücreler Mikrotübül İlişkili Protein 2 (MAP2) ve bir dopaminerjik nöron belirteci olan Tirozin Hidroksilaz ile immüno floresan işaretlendikten sonra floresan mikroskobunda incelendi. Alınan görüntülerde hücrelerde MAP2 ve Tirozin Hidroksilaz ekspresyonlarının olduğu ve hücrelerin olgun uzantılar gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4-1).



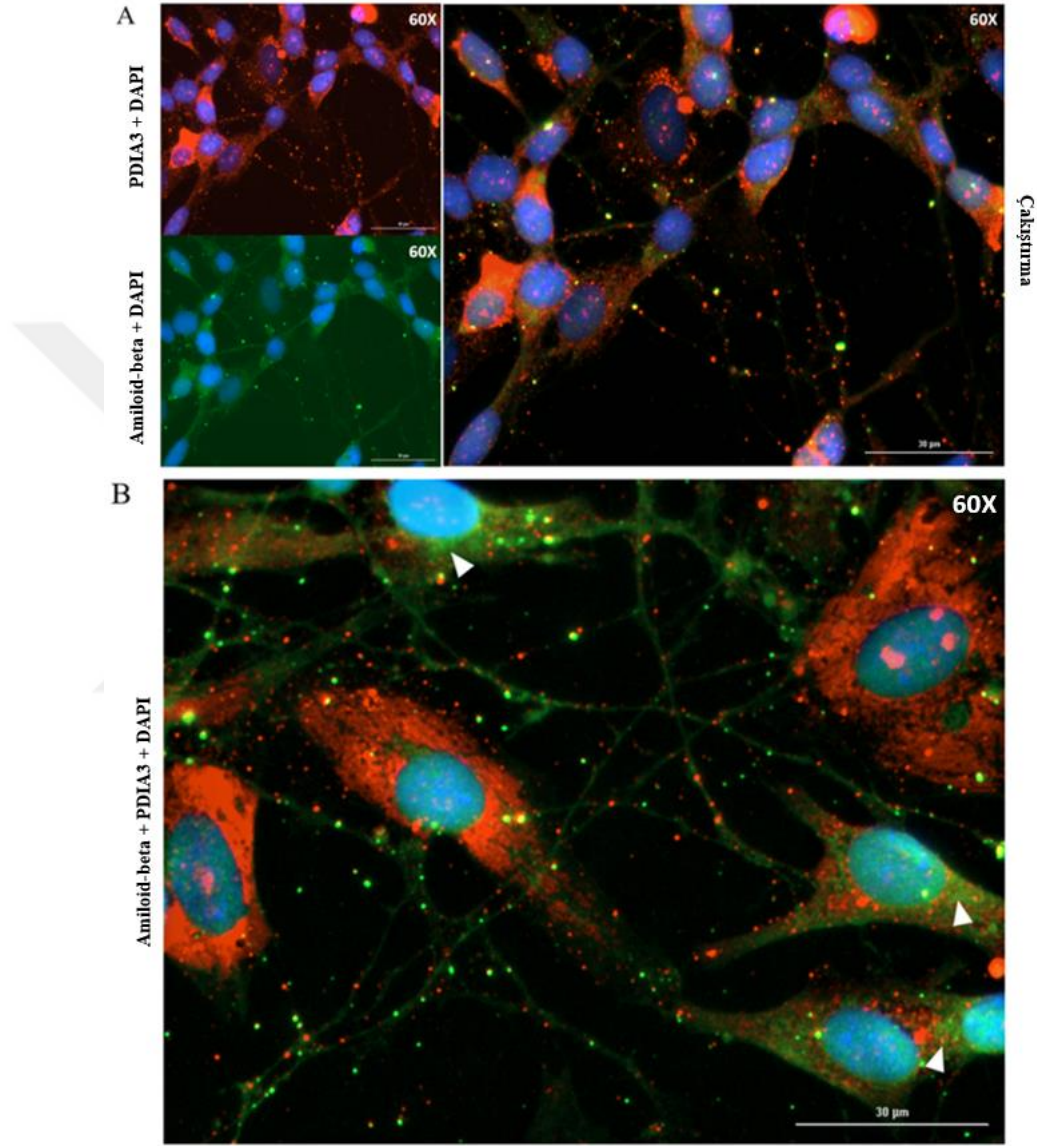
Şekil 4-1: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin nöral karakterlerinin immüno floresan işaretleme ile gösterilmesi

Farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinin Mikrotübül İlişkili Protein 2 (MAP2) (kırmızı) ve Tirozin Hidroksilaz (yeşil) ile çift-immüno floresan işaretleme ve bir nükleus boyası olan DAPI (mavi) ile boyaması yapılmıştır. Görüntüleme için Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu kullanılmıştır. Büyütme: 20X.

4.1.2. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Endojen A β ₁₋₄₂ ve Endojen PDIA3'ün Lokalizasyonlarının Gösterimi

Başarıyla farklılaştırılmış olan SH-SY5Y hücrelerinde herhangi bir amiloid beta peptit uygulaması olmadan fizyolojik koşullarda A β ₁₋₄₂ ile PDIA3'ün lokalizasyonlarını gösterebilmek adına endojen A β ₁₋₄₂ ve endojen PDIA3'ün çift-immüno floresan

işaretlenmesi sonrasında floresan mikroskopunda görüntüler alındı. Aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere hücrede sarı ile gösterilen kompartmanlarda (özellikle ER’de belirgin gözükmekte olan) PDIA3-A β ₁₋₄₂ kolokalizasyonuna rastlandı. Görüntüler literatür bilgisiyle uyumlu bulundu (Şekil 4-2).

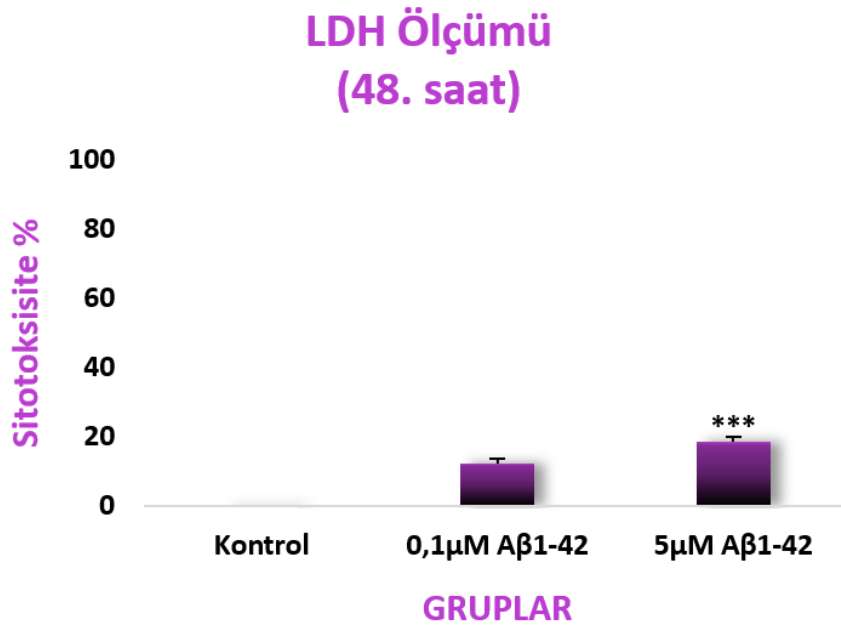


Şekil 4-2: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde endojen A β ₁₋₄₂ ve endojen PDIA3’ün lokalizasyonlarının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi

Farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinin PDIA3 (kırmızı) ve Amiloid-beta 1-42 (yeşil) ile çift-immünfloresan işaretleme ve bir nükleus boyası olan DAPI (mavi) ile boyaması yapılmıştır. A) Amiloid-beta+DAPI, PDIA3+DAPI ve bu görüntülerin çakıştırması yer almaktadır; B) Alınan başka bir çakıştırma görüntüsünde beyaz ok başlarıyla endojen PDIA3’ün endojen A β ₁₋₄₂ ile (sarı) kolokalizasyonuna dikkat çekilmektedir. Görüntüleme için Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu kullanılmıştır. Büyütme: 60X.

4.2. Sitotoksosite Ölçüm Sonuçları

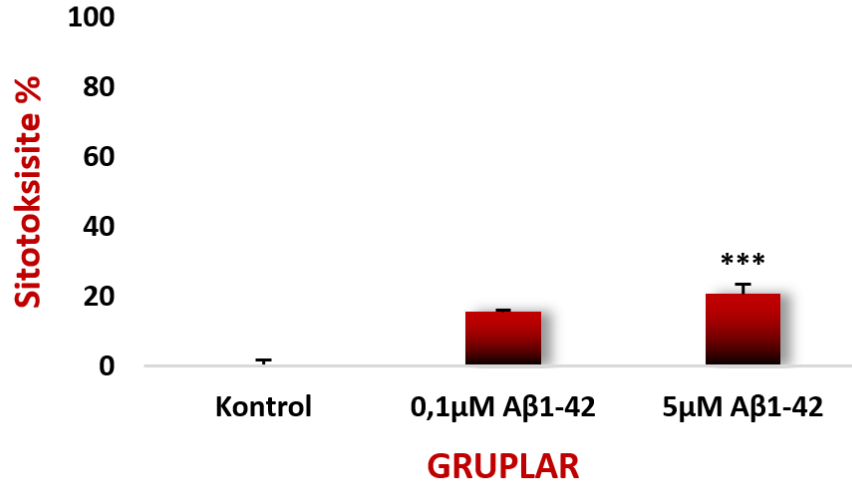
Farklılaştırılmış İnsan SH-SY5Y hücrelerine 48 ve 72 saat süreyle yapılan 0,1 μM ve 5 μM amiloid-beta 1-42 ($\text{A}\beta_{1-42}$) uygulamaları sonucu oluşan sitotoksik etki, kültür ortamına salınan LDH seviyesi ölçülerek saptanmıştır. **Şekil 3-3**'teki Sitotoksosite Yüzdesi Formülü kullanılarak hesaplanan sonuçlardan elde edilen gruplara ait ortalama LDH salınım yüzdeleri ile GraphPad InStat DTCG 3.06 yazılımı aracılığıyla belirlenen gruplar arasındaki farkların istatistiksel karşılaştırmaları **Şekil 4-1** ve **Şekil 4-2**'de gösterilmektedir. 48. saatteki LDH salınımı kontrol grubunda %0, 0,1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grupta %12,2 ve 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grupta %18,5 olarak hesaplanmıştır. 72. saatteki LDH salınımı ise kontrol grubunda %0, 0,1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grupta %15,5 ve 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grupta %20,7 olarak hesaplanmıştır. Hem 48. saatte hem de 72. saatte 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Buna göre, her iki zaman aralığında da kontrol grubundaki hücrelere kıyasla 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan hücrelerdeki stres seviyesi artmıştır.



Şekil 4-3: 48 saat boyunca $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların ortama salınan LDH seviyesi yüzdeleri

Kontrol grubunun LDH seviyesi %0 olarak kabul edilmiştir. 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grubun 48. saat sonundaki LDH seviyesi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,001$). 0,1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ uygulanan grup ile kontrol arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

LDH Ölçümü (72. saat)



Şekil 4-4: 72 saat boyunca Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların ortama salınan LDH seviyesi yüzdeleri

Kontrol grubunun LDH seviyesi %0 olarak kabul edilmiştir. 5 µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grubun 72. saat sonundaki LDH seviyesi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,001$). 0,1 µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grup ile kontrol arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

4.3. Western Blot Sonuçları

4.3.1. Hücre İçindeki Protein Disülfid İzomeraz A3'ün (PDIA3) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

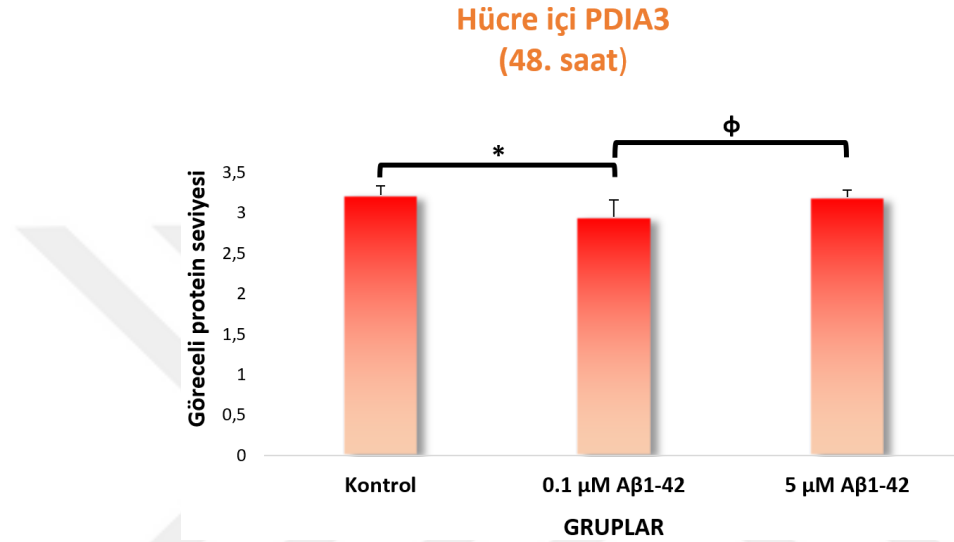


Şekil 4-5: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü gruplarında hücre içi PDIA3 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü

Sağdaki üç bant 48 saat, soldaki üç bant ise 72 saat sonrasındaki hücre içi PDIA3 işaretlemesinin görüntüsüdür. Referans protein olarak ACTB (beta aktin) kullanılmıştır.

Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 48 saat süreyle yapılan amiloid beta 1-42 peptit uygulaması sonrası grupların hücre içi PDIA3 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-6'te gösterilmiştir. Western Blot görüntülemesinin

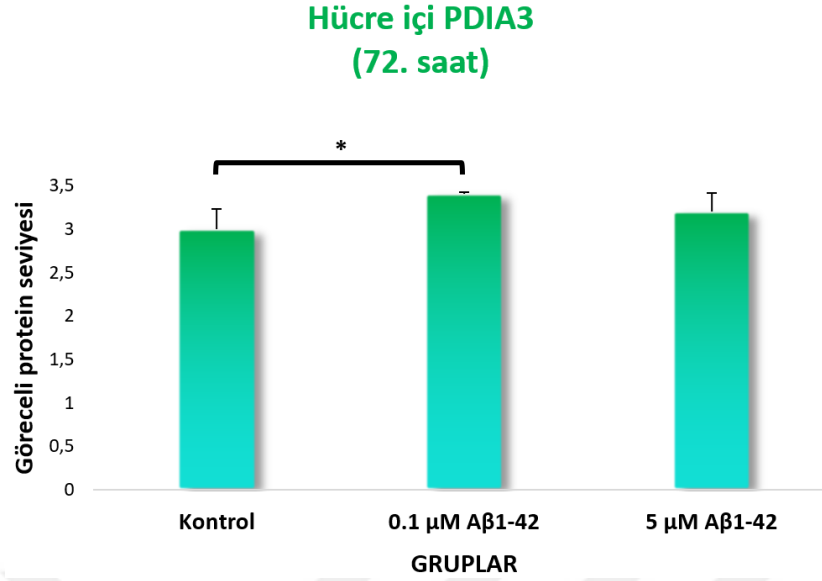
(Şekil 4-5) analiziyle elde edilen sonuçta 0,1µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grubun PDIA3 ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı (p<0,05) ve 5µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grubun PDIA3 ekspresyon seviyesinin 0,1 µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (p<0,05). 5µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grubun kontrol grubuna kıyasla PDIA3 ekspresyon seviyesinde düşüş görülmüş olsa da sonuç anlamlı değildir (p>0,05).



Şekil 4-6: 48 saat boyunca Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültüründeki tüm grupların hücre içi PDIA3'ün protein ekspresyon seviyesi

(Φp<0,05, *p<0,05)

Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 72 saat boyunca amiloid beta 1-42 peptit uygulaması yapıldıktan sonra grupların hücre içi PDIA3 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-6'da gösterilmiştir. 0,1µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grubun PDIA3 ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (p<0,05).

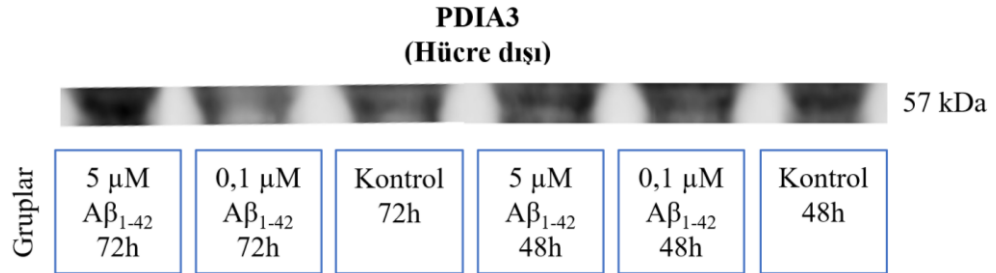


Şekil 4-7: 72 saat boyunca Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılan farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültüründeki tüm grupların hücre içi PDIA3'ün protein ekspresyon seviyesi

(*p<0,05)

4.3.2. Hücre Dışındaki Protein Disülfid İzomeraz A3'ün (PDIA3) Protein Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

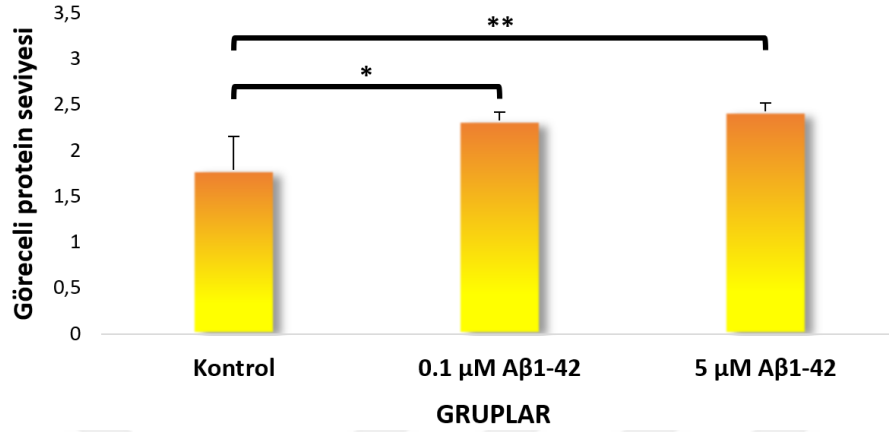
Hücre dışındaki PDIA3'ün tayini için yapılan Western Blot sonrası elde edilen bantların görüntüsü aşağıda verilmektedir (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Hücre dışındaki PDIA3 seviyelerini gösteren Western Blot görüntüsü

48 saat boyunca Aβ₁₋₄₂ peptit uygulaması yapıldıktan sonra tüm grupların hücre içindeki PDIA3 seviyesinin tayini için yapılmış olan protein izolasyonu deneyi öncesinde hücre kültürü gruplarının her kuyusundan üst sıvılar toplanmıştır. Toplanan üst sıvılardan elde edilen Western blot sonuçlarına göre; 48 saatlik 0,1µM ve 5µM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grupların hücre dışındaki PDIA3 ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (sırasıyla p<0,05 ve p<0,01). Grupların karşılaştırmalı grafiği Şekil 4-9'de verilmiştir.

Hücre dışı PDIA3 (48. saat)

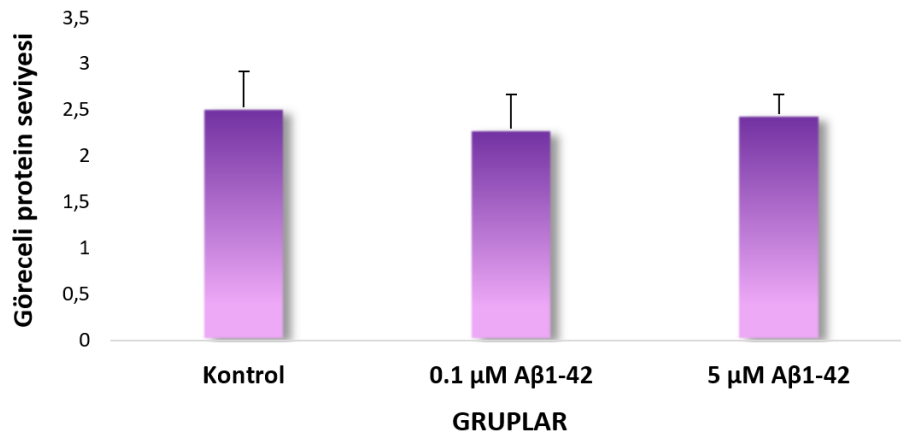


Şekil 4-9: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü gruplarının 48 saatlik Aβ₁₋₄₂ uygulaması sonrası hücre dışı PDIA3 protein ekspresyon seviyeleri

(*p<0,05, **p<0,01)

72 saatlik Aβ₁₋₄₂ uygulaması yapılan grupların kültür petrilerinden çekilen üst sıvılardan elde edilen sonuçlar neticesinde; hücre dışındaki PDIA3 ekspresyon seviyesi açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte 0,1 ve 5μM Aβ₁₋₄₂ uygulanan grupların kontrol grubuna kıyasla PDIA3 ekspresyon seviyelerinde belirli bir düşüş görülmektedir (Şekil 4-10).

Hücre dışı PDIA3 (72. saat)



Şekil 4-10: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürü gruplarının 72 saat boyunca Aβ₁₋₄₂ uygulaması sonrasında hücre dışı PDIA3 ekspresyon seviyeleri

5. TARTIŞMA

Karmaşık bir nörodejeneratif bozukluk olan Alzheimer hastalığı (AH), dünya çapında demansın en yaygın nedenidir. Hastalık ilk olarak 116 yıl önce tanımlanmış olmasına rağmen, AH'nin etiyolojisi hala belirsizdir. Hastanın beynindeki amiloid plaklar AH'nin başlıca ayırt edici özelliğidir ve amiloid plakların ana bileşeni olan ve β - ile γ -sekretazın sıralı kesimi ile amiloid öncül proteininden (APP) üretilen amiloid beta ($A\beta$) peptitlerinin AH patogenezindeki merkezi rolüne dair kanıtlar çok güçlü olmakla birlikte amiloid kaskadı hipotezi, halen çoğu AH çalışmasının temelini oluşturmaktadır (Krishtal ve ark., 2017).

$A\beta$ peptitlerinin nörona özgü etkilerinin araştırılmasında doğru hücrel modellerin kullanımı önemlidir. İnsan SH-SY5Y hücre hattı, AH dahil olmak üzere farklı nörodejeneratif hastalıklar için bir model olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. SH-SY5Y hücrelerinin fenotipi, farklı nöral farklılaşma programları başlatılarak manipüle edilebilir, ancak yayınların çoğunda (%81,5) farklılaşmamış hücreler kullanılmıştır. Dopaminerjik karakterlerinden dolayı genellikle Parkinson hastalığı için bir model olarak kabul edilen SH-SY5Y hücreleri, retinoik asit (RA) ve beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) uygulamaları yoluyla baskın kolinerjik fenotipe farklılaştırılabilme kabiliyetleri sebebiyle AH çalışmaları için de uygun bir model haline gelmiştir. Bu çalışmada, $A\beta_{1-42}$ peptitlerinin PDIA3 üzerindeki etkilerini incelemek için nöronal tarama için önerilen basit bir model olan RA ve BDNF ile farklılaştırılmış insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerini kullandık. Makaleler, farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılmayanlara kıyasla $A\beta$ 'ya duyarlılıklarının arttığını ve primer nöron kültürleri ve AH'li hastalarla ilişkili patolojik değişikliklerin tanımlanmasına ve ölçülmesine izin veren bir model olarak sayılabileceğini göstermektedir (Krishtal ve ark., 2017). İlaveten, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin daha fazla araştırılması, insan kaynaklı hücrelerde amiloid peptidlerinin neden olduğu patolojik süreçlerden sorumlu moleküler mekanizmaların anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Çalışmamızda, $A\beta_{1-42}$ peptitlerinin hücreler üzerindeki etkisi, laktat dehidrogenaz (LDH) testi aracılığıyla belirlendi. 48 ve 72 saat boyunca 0,1 μ M $A\beta_{1-42}$ uygulamasına maruz bırakılan gruplarda kontrole kıyasla sitotoksosite bulunmazken, 5 μ M $A\beta_{1-42}$ uygulamasının önceki çalışmalarla uyumlu bir şekilde; nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine anlamlı derecede toksik geldiği saptanmıştır (Şekil 4-3 ve 4-4). Krishtal ve arkadaşlarının 2019'da yaptığı bir çalışmada

ise, RA/BDNF ile farklılaşan hücrelerde ilginç bir şekilde 10 µM konsantrasyondaki Aβ₁₋₄₂ peptidi, 20 µM seviyesinden daha toksik çıkmıştır. Bu olağandışı konsantrasyon bağımlılığının nedeni açık değildir; bununla birlikte araştırmacılar; 20 µM peptit daha hızlı fibrilleşeceğinden, hücrelerin Aβ kaynaklı nörotoksosite için çok önemli olan toksik ara türlere maruz kalma süresinin daha kısa olacağı varsayımında bulunmaktadır (Krishtal ve ark., 2019).

Aβ herkeste üretildiğine göre neden birikintiler sadece yaşlılarda görülmektedir? Aβ, nörodejenerasyona neden olabilir ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla bilişsel işlevleri bozabilir. PDIA3, hücrel stres yanıtında yer alan ve sağlıklı bireylerin beyin omurilik sıvısında (BOS) kalretikulin ile birlikte, N-glikolize halde bulunan immünoreaktif Aβ peptitleri ile bir kompleks olarak mevcut olduğu bilinen bir protein disülfid izomerazdır (Erickson ve ark., 2005), bu da PDIA3'ün Aβ'nın agregasyonunu önleyen bir taşıyıcı protein olabileceğini düşündürür. Bu karmaşık oluşum, ER'nin translayon sonrası protein işleme sistemi tarafından katalize edilmektedir. Önceki çalışmalarda PDIA3'ün, çeşitli sekretuvar ve membran proteinleri ile stabil kompleksler oluşturduğu bulunmuştur. Bu kompleksler ER'de oluşmaktadır ve kalneksin ile kalretikulin gibi diğer şaperonlar ile işbirliği içerisinde meydana gelmektedir. Ayrıca bu bileşenlerin saflaştırılıp tekrar karıştırılmasıyla kompleksler yeniden oluşturulamamaktadır. Dolayısıyla ER'de bu proteinlerin post-translasyonel işleme yolağındaki bir veya birden fazla metabolik aşamadaki aktivite düşüşünün, AH'de görülen defektlere yol açabilmesine ilave olarak amiloid beta ile kompleks oluşturmadaki başarısızlığın, bu duruma özgü plak birikimlerine yol açabildiği düşünülmektedir.

AH'de hücre dışı alanda birikmesine rağmen, sitoplazma, ER, mitokondri, endozomlar ve nükleus gibi hücre içi bileşenlerde de bulunduğu bildirilen Aβ'nın in vitroda normal koşullar altındaki hücre kültürü ortamında ve kognitif olarak normal bireylerin BOS'larında bulunmuş olması nedeniyle potansiyel fizyolojik rollere de sahip olduğu düşünülmektedir. Erickson'ın 2005'te sağlıklı bireylerin BOS'larındaki Aβ ile PDIA3'ün etkileşimi üzerine yayınladığı makaleden iki sene sonra başka bir ekip PDIA3'ün Aβ proteininin erken sekretuvar yolağında tam uzunluktaki APP ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Selivanova ve ark., 2007). Ne var ki başka çalışmalar, Aβ'nın BOS'ta N-glikolize halde bulunmuş olmasının aksine plaklarda sadece çıplak bir peptit

olarak mevcut olduğunu bildirmiştir. Birlikte bu sonuçlar, hem plakların hem de AH'nin; ER'nin post-translasyonel protein işleme yolağı bileşenlerinin yaşla birlikte önemli ölçüde azalmasına bağlı olduğunu veya sekonder geldiğini göstermektedir (Holtzman, 2013). Hafıza için gerekli olan sinaptik membran proteinleri de ER'de işlendiğinden, bu bulgular biliş kaybının nöronun işleyen sinapsları üretme ve sürdürme kapasitesindeki düşüşten kaynaklandığını düşündürmektedir. Ekibimiz tarafından 2017 yılında yayınlanan ve bu tezin hipotezine fikir veren makalede, PDIA3 susturulmuş primer nöron kültüründe hücre içi A β 1-42 üretiminin arttığı görülmüştür (Gezen-Ak ve ark., 2017). Bu veri bize, nöronlarda PDIA3'ün A β işleme yolağında önemli bir rolü olabileceğini ve PDIA3'ün ekspresyonu veya fonksiyonunda meydana gelecek herhangi bir değişikliğin APP'nin işlenmesindeki bozulmalara, A β üretiminin artmasına ve degradasyonunun azalmasına yol açabileceğini düşündürmüştür.

Şaperon miktarındaki/seviyesindeki düşüşlerin, AH'deki merkezi kusurlardan biri olduğu bilinmektedir. Yaşlanmanın fizyolojik eksikliklerinin altında şaperon düşüşlerinin diğer organ sistemlerinde de benzer görülmesinin yattığının ileri sürüldüğü ve 21. günden ölüme dek sıçanların hepatik (karaciğer) ER şaperon içeriklerinin immünoiblota ile belirlendiği Erickson, Dunning ve Holtzman'ın bu çalışmasında PDIA3, ERp55, ERp72, BiP ve kalneksin seviyelerinin yaşla birlikte %30-50 oranında azaldığı bildirilmiştir (Erickson ve ark., 2006).

Alzheimer hastalığında anahtar rol oynayan amiloid agregatları gibi alfa-sinüklein kümeleri de Parkinson hastalığının (PH) etiyolojisine katkıda bulunur. PDIA3 ile aynı aileden olan protein disülfit izomeraz A1'in (PDIA1) alfa-sinüklein agregasyonunu bloke edebildiği ve bir şaperon olarak işlev göremeyen S-nitrosile edilmiş PDIA1 formunun, yüksek seviyelerde kümelenmiş alfa-sinüklein ile ilişkili olduğu ve PH'den etkilenen beyinlerde bulunduğu çalışmalar tarafından tespit edilmiştir. Koruyucu rolünün şaperon işleviyle bağlantılı olduğundan sıkça bahsedilse de nörodejeneratif hastalıklarda nöroproteksiyon mekanizmasının belirsizliğini koruyan PDIA1'in Thioflavin-T floresanı ve transmisyon elektron mikroskobu kullanarak yapılan 2020 tarihli bir çalışmada ilk kez; yeni oluşan alfa-sinüklein fibrillerini parçalayabildiği ve PDIA1'in disagregaz aktivitesinin, 1:50 PDIA1:alfa-sinüklein molar oranında etkili olduğu, S-nitrosilasyon ile ise bloke edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, olgun fibrillerin PDIA1'den etkilenmediği ve ek olarak araştırılan ve bu teze katkısı olan bir bilgi olduğunu düşündüğümüz PDIA3'ün

alfa-sinüklein ile etkileşime girip toplanmasını önleyebildiği ancak tersine çeviremediği saptanmıştır (Serrano ve ark., 2020). PDIA1'in amiloidojenik hastalıklardaki koruyucu rolünü daha iyi anlamak adına PDIA1 aşırı ekspresyonuna sahip *Pichia pastoris* GS115 suşunda; amiloid beta 1-42 proteinine ek olarak organlarda amiloid birikimiyle ortaya çıkan nadir bir hastalık olan Amiloidoz ile ilişkili olan SAA1 (Serum Amiloid A1) proteini ve ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalık olan Parkinson Hastalığı ile ilişkili alfa-sinüklein (α -syn) proteinlerinin her biri ile PDIA1 arasındaki bağlanmayı araştıran ve geçen sene yayınlanan makalede, PDIA1'in bu üç amiloidojenik protein substratına da bağlandığı ve her biri ile farklı özgünlükte ve afinitede mevcut olan çoklu bağlanma modlarına sahip olduğu öne sürülmüştür. Çalışmada yapılan daha fazla analiz, PDIA1'in yanlış katlanmış proteinlerin ER ile ilişkili kompartmanlarda degrade edilmesi ihtiyacını ortadan kaldırabilme ihtimalini ortaya çıkarmıştır (Yan ve ark., 2021). Leheve ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, agregasyon başlangıcında mevcut olduğunda A β fibrillerinin oluşumunu etkili bir şekilde engellediği önceden gösterilmiş olan PDIA1'in devam eden A β fibrilizasyonunu bozma potansiyeli ve yıkıcı etkisi araştırılmıştır. PDIA1'in 1:10 molar oranda A β kümelenmesini engellemiş olmasına ek olarak kümelenmenin başlamasından 2,4 veya 10 saat sonra eklendiğinde A β fibrilleşmesini de bozabildiği, ayrıca agregasyon başlangıcından 2 saat sonra eklendiğinde nöronal hücreleri hücre dışı A β agregatlarından koruyabildiği (MTS hücre canlılığı testi ile) gösterilmiştir. Bu bulgular, AH için protein disülfid izomeras ailesinden PDIA1'in yeni bir tedavi olarak potansiyel kullanımını desteklemektedir (Leheve ve ark., 2019).

İnsan beynindeki senil plaklarda baskın A β peptitlerinin A β ₁₋₄₂ ve A β ₁₋₄₀ olmasına rağmen, A β ₂₅₋₃₅ gibi başka peptitler de mevcut olabilir. Daha kısa olan A β ₂₅₋₃₅ peptidi, yaşlı hastaların beyinde çözünür A β ₁₋₄₀ peptitlerinin proteolitik bölünmesinden üretilir. A β ₂₅₋₃₅, A β 'nın biyolojik olarak aktif bölgesini temsil eder çünkü bu, kümelenmiş yüksek miktardaki β -tabaka yapıları konformasyonel bir değişim sergileyen, fibriller oluşturma eğiliminde olduğu varsayılan ve tam uzunluktaki peptidin toksisitesini koruyan en kısa fragmandır. A β kaynaklı patogeneze çalışmalarında sıklıkla model olarak kullanılmasıdaki sebep ise; A β ₂₅₋₃₅ uygulamasının AH nörodejenerasyonunun patolojik özelliklerini özetlemesinden, sıçanlarda amnezi ve hafıza kaybına, fare hipokampuslarında oksidatif strese yol açmasından kaynaklanmaktadır. Çok güncel olarak yayınlanan bir makalede, insan SH-SY5Y hücrelerinde kısa süreli 30 μ M A β ₂₅₋₃₅ uygulamasının hücre içindeki PDIA3 proteininde azalmayla (ilk bir saatte yaklaşık

%25'lik bir düşüşle) birlikte PDIA3'ün farklı hücre içi lokalizasyonuna ve hücre içindeki düşüşüne paralel olarak uygulamanın ilk 3 saatinde kültür ortamına salgılanmasında önemli bir artışa (+%30) neden olduğu gösterilmiştir (Di Risola ve ark., 2022). Burada rekombinant PDIA3'ün A β ₂₅₋₃₅ fragmenti ile in vitro olarak yüksek afiniteyle doğrudan etkileşime girdiği ve hücre dışı boşluğa salgılanan PDIA3'ün A β ₂₅₋₃₅'in toksik etkilerini ve agregasyonunu önleyerek hücre canlılığını geri kazandırdığı bildirilmektedir. Ancak eklenmesi gereken mühim bir nokta, hücre içindeki PDIA3 miktarının sonraki zaman dilimlerinde (3-24 saat) kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olmadığı, hücre dışında ilk 3 saatten sonra kademeli olarak azaldığı ve uygulamadan 24 saat sonra hem hücre içi hem hücre dışındaki PDIA3 protein seviyelerinin bazal koşullara döndüğüdür.

1995 yılındaki bir makalede PDIA3'ün 3T3 hücrelerinden salgılandığı fark edildiğinde ilk kez bu proteinin ER'den kaçabiliyor olduğu anlaşılmıştır (Hirano ve ark., 1995). Sonrasında yapılan çalışmalar, PDIA3'ün hücre yüzeyinde, hücre membranı proteinleriyle kompleksler halinde veya hücre dışında bulunabileceğine dikkat çekmiştir. Farklı hücre tiplerinin hücre dışı boşluğunda PDIA3, örneğin kompleman aktivasyonunu baskılamak için veya renal fibroz başlangıcının erken bir işareti olarak tespit edilmiştir. Bu da PDIA3'ün farklı, şu anda tamamen bilinmeyen hücre dışı işlevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Sitoplazmada ve ER'de STAT3'ü bağlayan, nükleusta DNA bağlama yeteneğine sahip olan ve plazma membranında reseptörler ve sinyal transdüksiyon proteinleriyle ilişkili olmasına ek olarak, 1,25-dihidroksikolekalsiferol metaboliti için önemli bir hücre yüzeyi reseptörü olarak tanımlanan PDIA3'ün hücre yüzeyinden hücre içine ve/veya nükleusa sinyal iletim süreçlerinde önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Yukarıda bahsedilen Di Risola ve ekibinin çalışmasında hücre dışındaki PDIA3'ün A β toksisitesine koruyucu bir etki gösterebileceği varsayılmaktadır ve bu durum araştırmacılara PDIA3'ün AH tedavisinde olası bir terapötik araç olarak vurgulanabileceğini göstermiştir.

PDIA3'ün A β ile etkileşime girdiğini ve kümelenmesini önlemede rol oynayabileceğini düşündüren başka bir kanıt, PDIA3'ün ekzojen uyarıcısı olan diosgenin ile aktivasyonunun bir AH modeli olan 5XFAD (AH-ilişkili 5 mutasyonu içeren) transgenik farelerin nesne tanıma belleği performansını önemli ölçüde arttırırken, serebral korteks ve hipokampuslarındaki amiloid plakları ve nörofibriler yumakları azalttığını gösteren ve bu bölgelerde dejenerasyona uğramış akson ve presinaptik

terminallerin rejenerasyonunu arttırarak AH patolojisinin onarımına katkı sağladığı belirlenen bir çalışmadan gelmektedir (Tohda ve ark., 2012).

Bu çalışmamızda diğer nörodejeneratif hastalıklarda yer aldığı ve ALS ile Prion hastalıklarında koruyucu bir role sahip olduğu önerilen PDIA3'ün, sağlıklı bir nöron popülasyonundaki seviyesinin belirlenmesiyle birlikte, AH-benzeri hücrel bir model olarak kullanılan A β kaynaklı stres koşulları altında daha önce literatürde yer almadığı bilinen şekilde nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültüründeki ekspresyonunun olası modülasyonunu bildirmeyi ve A β 'nın nöronlarda PDIA3 protein seviyelerindeki değişiklikten sorumlu bir stres durumu yaratıp yaratmadığını anlamayı amaçladık.

Çalışmamızda, 48 saat sonunda düşük doz (0,1 μ M) A β_{1-42} uygulamasıyla hücre içi PDIA3 protein seviyesinde anlamlı bir düşüş görülürken, yüksek doz (5 μ M) uygulanan grupta anlamlı olmasa da yine kontrolden daha düşük bir PDIA3 protein seviyesi söz konusudur. 72. saate gelindiğinde ise, 48. saatte görülen etkinin tersine, 0,1 μ M A β_{1-42} uygulanan grupta kontrolden anlamlı derecede yüksek hücre içi PDIA3 seviyesine rastlanılmıştır. Ayrıca 5 μ M uygulanan grupta anlamlı olmasa da kontrole kıyasla PDIA3 seviyesinde artış görülmüştür. Bununla birlikte literatürden elde edilen artan sayıda kanıt, stres koşulları altında PDIA3 ifadesinin düzensiz olabileceğini göstermektedir.

Hücre dışındaki sonuçlara bakıldığında ise, PDIA3 proteininin ekspresyon seviyesinde 48 saat A β_{1-42} uygulanan kültür gruplarından 0,1 μ M doza sahip grupta anlamlı ($p<0,05$), 5 μ M dozlu grupta ise çok anlamlı ($p<0,01$) bir artış vardır. Bu sonuçlar, 48 saat uygulanan amiloid beta peptidinin etkisiyle hücre içindeki PDIA3 azalırken hücre dışına salınan PDIA3'te artış görüldüğünü göstermektedir. PDIA3'ün hücrelerden salınmasının sebepleri arasında A β 'yı bağlamak, A β agregasyonunu önlemeye çalışmak ve bu kompleksin endositozunu desteklemek sayılabilir. Önceki bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerinin endositoz yoluyla A β 'yı içselleştirip degrade edebildiği (Ida ve ark., 1996) bildirildiği için bu süreçte PDIA3'ün de görev alabileceği ihtimali mantıksız gelmemektedir. Bahsi geçmesi gereken önemli bir nokta ise; peptidin çoğunun hücre içinde bozunmasına rağmen bazı çözünmeyen küçük fraksiyonlarının içeride biriktiği ve birkaç gün stabil kaldığı gerçeğidir. Bu gözlemler araştırmacılara bu hücre içine alım-bozunma aktivitesinin AH patogeneze iki farklı şekilde etki edebileceğini düşündürmüştür: ya hücre dışı amiloid beta konsantrasyonları azaltılarak amiloid birikiminin önlenmesine katkı sağlanmaktadır, ya da amiloid oluşumu için çözünmeyen

tohumlar üreterek birikimi desteklenmektedir. Çalışmamıza geri dönecek olursak, 72 saat süren uygulamadan sonra ise farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin hücre dışına salınan PDIA3 seviyesi kontrol grubuna benzer hale gelmiştir ve anlamlı olmasa da kontrol grubundan daha düşük seviyede görülmesi PDIA3'ün hücre içine geri lokalize olduğu ve hücrede farklı işlevlere dahil olabileceğini açıkça düşündürmesi açısından şaşırtıcı değildir. Çünkü 72 saat sonunda peptit uygulamasının etkisiyle hücre içinde PDIA3'ün artıp hücre dışında azalmış olması tesadüf olmayan bir biçimde koraledir.

Nihayetinde çalışmamız, nörona farklılaştırılmış hücrelere verilen $A\beta_{1-42}$ 'nin uygulanma süresine ve dozuna bağımlı bir şekilde hem hücre içinde hem de hücre dışında PDIA3'ün ekspresyon seviyesinin anlamlı değişimini ilk defa göstererek bilime katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Önemli bir hücrel şaperon ve disülfid izomeraz olduğu için literatürde kapsamlı bir şekilde inceleniyor olsa da, PDIA3'ün hücre dışı alanda çeşitli protein agregatları ile ilgili gerçekleştirebileceği işlevlere ancak son zamanlarda dikkat edilmeye başlanmıştır. AH hastalarında PDIA3'ün daha az salgılanması ya da yaşlanma sürecinin etkisiyle oksidatif ortamın uygun olmayıp bu düzenlemenin kaybolması, üretilip hücre dışına salınan $A\beta$ 'nin sindirilemeyip agregat oluşumuna yol açacak bir fibrilasyon sürecinin tetiklenmesiyle bağlantılı olabilir. Bu nedenle PDIA3, AH gibi çok yaygın görülen bir nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde, nöronal hücrelerde görülen ER stresinin önüne geçebilecek ve amiloid agregasyonu tarafından indüklenen nörodejenerasyonu önlemede yararlı olabilecek olası bir terapötik hedefi temsil edebilir niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Aiyar, N., Bennett, C. F., Nambi, P., Valinski, W., Angioli, M., Minnich, M., & Crooke, S. T. (1989). Solubilization of rat liver vasopressin receptors as a complex with a guanine-nucleotide-binding protein and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochem J*, 261(1), 63-70. <https://doi.org/10.1042/bj2610063>
- Almeida, S., Zhou, L., & Gao, F. B. (2011). Progranulin, a glycoprotein deficient in frontotemporal dementia, is a novel substrate of several protein disulfide isomerase family proteins. *PLoS One*, 6(10), e26454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026454>
- Altieri, F., Maras, B., Eufemi, M., Ferraro, A., & Turano, C. (1993). Purification of a 57kDa nuclear matrix protein associated with thiol:protein-disulfide oxidoreductase and phospholipase C activities. *Biochem Biophys Res Commun*, 194(3), 992-1000. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1919>
- Alzheimer's-Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 15(3), 321-387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
- Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., & Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Lett*, 586(18), 2826-2834. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.023>
- Ashraf, G. M., Greig, N. H., Khan, T. A., Hassan, I., Tabrez, S., Shakil, S., Sheikh, I. A., Zaidi, S. K., Akram, M., Jabir, N. R., Firoz, C. K., Naeem, A., Alhazza, I. M., Damanhouri, G. A., & Kamal, M. A. (2014). Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 13(7), 1280-1293. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140917095514>
- Asmussen, N., Lin, Z., McClure, M. J., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2019). Regulation of extracellular matrix vesicles via rapid responses to steroid hormones during endochondral bone formation. *Steroids*, 142, 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.12.003>
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., & Horne, M. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 30(3), 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.02.009>
- Aureli, C., Gaucci, E., Arcangeli, V., Grillo, C., Eufemi, M., & Chichiarelli, S. (2013). ERp57/PDIA3 binds specific DNA fragments in a melanoma cell line. *Gene*, 524(2), 390-395. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.004>
- Baker, M., Mackenzie, I. R., Pickering-Brown, S. M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A. D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., . . . Hutton, M. (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*, 442(7105), 916-919. <https://doi.org/10.1038/nature05016>
- Bargsted, L., Hetz, C., & Matus, S. (2016). ERp57 in neurodegeneration and regeneration. *Neural Regen Res*, 11(2), 232-233. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.177722>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous

- culture. *Cancer Res*, 33(11), 2643-2652. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4748425>
- Bourdi, M., Demady, D., Martin, J. L., Jabbour, S. K., Martin, B. M., George, J. W., & Pohl, L. R. (1995). cDNA cloning and baculovirus expression of the human liver endoplasmic reticulum P58: characterization as a protein disulfide isomerase isoform, but not as a protease or a carnitine acyltransferase. *Arch Biochem Biophys*, 323(2), 397-403. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.0060>
- Boyan, B. D., Chen, J., & Schwartz, Z. (2012). Mechanism of Pdia3-dependent 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 signaling in musculoskeletal cells. *Steroids*, 77(10), 892-896. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.04.018>
- Boyan, B. D., Wong, K. L., Fang, M., & Schwartz, Z. (2007). 1alpha,25(OH)2D3 is an autocrine regulator of extracellular matrix turnover and growth factor release via ERp60 activated matrix vesicle metalloproteinases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 103(3-5), 467-472. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.11.003>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Brown, M. K., & Naidoo, N. (2012). The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol*, 3, 263. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00263>
- Calo, V., Migliaivacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., & Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*, 197(2), 157-168. <https://doi.org/10.1002/jcp.10364>
- Castillo, V., Onate, M., Woehlbier, U., Rozas, P., Andreu, C., Medinas, D., Valdes, P., Osorio, F., Mercado, G., Vidal, R. L., Kerr, B., Court, F. A., & Hetz, C. (2015). Functional Role of the Disulfide Isomerase ERp57 in Axonal Regeneration. *PLoS One*, 10(9), e0136620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136620>
- Chen, J., Dosier, C. R., Park, J. H., De, S., Guldberg, R. E., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2016). Mineralization of three-dimensional osteoblast cultures is enhanced by the interaction of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and BMP2 via two specific vitamin D receptors. *J Tissue Eng Regen Med*, 10(1), 40-51. <https://doi.org/10.1002/term.1770>
- Chen, J., Olivares-Navarrete, R., Wang, Y., Herman, T. R., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2010). Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoblasts. *J Biol Chem*, 285(47), 37041-37050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157115>
- Chetelat, G., Arbizu, J., Barthel, H., Garibotto, V., Law, I., Morbelli, S., van de Giessen, E., Agosta, F., Barkhof, F., Brooks, D. J., Carrillo, M. C., Dubois, B., Fjell, A. M., Frisoni, G. B., Hansson, O., Herholz, K., Hutton, B. F., Jack, C. R., Jr., Lammertsma, A. A., . . . Drzezga, A. (2020). Amyloid-PET and (18)F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet Neurol*, 19(11), 951-962. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30314-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30314-8)
- Cheung, Y. T., Lau, W. K., Yu, M. S., Lai, C. S., Yeung, S. C., So, K. F., & Chang, R. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30(1), 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.11.001>
- Chichiarelli, S., Altieri, F., Paglia, G., Rubini, E., Minacori, M., & Eufemi, M. (2022). ERp57/PDIA3: new insight. *Cell Mol Biol Lett*, 27(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00315-x>

- Chichiarelli, S., Ferraro, A., Altieri, F., Eufemi, M., Coppari, S., Grillo, C., Arcangeli, V., & Turano, C. (2007). The stress protein ERp57/GRP58 binds specific DNA sequences in HeLa cells. *J Cell Physiol*, 210(2), 343-351. <https://doi.org/10.1002/jcp.20824>
- Chichiarelli, S., Gaucci, E., Ferraro, A., Grillo, C., Altieri, F., Cocchiola, R., Arcangeli, V., Turano, C., & Eufemi, M. (2010). Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line. *Arch Biochem Biophys*, 494(2), 178-183. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.004>
- Chu, B., Li, M., Cao, X., Li, R., Jin, S., Yang, H., Xu, L., Wang, P., & Bi, J. (2021). IRE1alpha-XBP1 Affects the Mitochondrial Function of Abeta25-35-Treated SH-SY5Y Cells by Regulating Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes. *Front Cell Neurosci*, 15, 614556. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.614556>
- Colla, E., Coune, P., Liu, Y., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Iwatsubo, T., Schneider, B. L., & Lee, M. K. (2012). Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *J Neurosci*, 32(10), 3306-3320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5367-11.2012>
- Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A., Chichiarelli, S., Eufemi, M., & Turano, C. (2002). Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase ERp57 in mammalian cells. *J Cell Biochem*, 85(2), 325-333. <https://doi.org/10.1002/jcb.10137>
- Cui, X., Gooch, H., Petty, A., McGrath, J. J., & Eyles, D. (2017). Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol Cell Endocrinol*, 453, 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.035>
- Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A. G., Fletcher-Jones, A., Browne, C., Nakanishi, M., Turner, M. R., Wade-Martins, R., Cowley, S. A., & Talbot, K. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Stem Cells*, 34(8), 2063-2078. <https://doi.org/10.1002/stem.2388>
- de Medeiros, L. M., De Bastiani, M. A., Rico, E. P., Schonhofen, P., Pfaffenseller, B., Wollenhaupt-Aguiar, B., Grun, L., Barbe-Tuana, F., Zimmer, E. R., Castro, M. A. A., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2019). Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. *Mol Neurobiol*, 56(11), 7355-7367. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1605-3>
- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 280-291. <https://doi.org/10.1038/nri1053>
- Di Risola, D., Ricci, D., Marrocco, I., Giamogante, F., Grieco, M., Francioso, A., Vasco-Vidal, A., Mancini, P., Colotti, G., Mosca, L., & Altieri, F. (2022). ERp57 chaperon protein protects neuronal cells from Abeta-induced toxicity. *J Neurochem*, 162(4), 322-336. <https://doi.org/10.1111/jnc.15655>
- Dick, T. P., Bangia, N., Peaper, D. R., & Cresswell, P. (2002). Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity*, 16(1), 87-98. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00263-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00263-7)
- Dihazi, H., Dihazi, G. H., Bibi, A., Eltoweissy, M., Mueller, C. A., Asif, A. R., Rubel, D., Vasko, R., & Mueller, G. A. (2013). Secretion of ERP57 is important for

- extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset. *J Cell Sci*, 126(Pt 16), 3649-3663. <https://doi.org/10.1242/jcs.125088>
- Doroudi, M., Chen, J., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2014). New insights on membrane mediated effects of 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 signaling in the musculoskeletal system. *Steroids*, 81, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.10.019>
- Doroudi, M., Olivares-Navarrete, R., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2015). A review of 1alpha,25(OH)2D3 dependent Pdia3 receptor complex components in Wnt5a non-canonical pathway signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 152, 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.002>
- Dursun, E., & Gezen-Ak, D. (2017). Vitamin D receptor is present on the neuronal plasma membrane and is co-localized with amyloid precursor protein, ADAM10 or Nicastrin. *PLoS One*, 12(11), e0188605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188605>
- Dursun, E., Gezen-Ak, D., & Yilmazer, S. (2013a). Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin d receptor gene and induces the expression of the vitamin d catabolic enzyme gene in hippocampal neurons. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 36(1-2), 76-86. <https://doi.org/10.1159/000350319>
- Dursun, E., Gezen-Ak, D., & Yilmazer, S. (2013b). A new mechanism for amyloid-beta induction of iNOS: vitamin D-VDR pathway disruption. *J Alzheimers Dis*, 36(3), 459-474. <https://doi.org/10.3233/JAD-130416>
- Edsjo, A., Lavenius, E., Nilsson, H., Hoehner, J. C., Simonsson, P., Culp, L. A., Martinsson, T., Larsson, C., & Pahlman, S. (2003). Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. *Lab Invest*, 83(6), 813-823. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000074895.48776.d8>
- Ellerman, D. A., Myles, D. G., & Primakoff, P. (2006). A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Dev Cell*, 10(6), 831-837. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.011>
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C., & Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, 75(3), 991-1003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>
- Erickson, R. R., Dunning, L. M., & Holtzman, J. L. (2006). The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: the possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological function seen with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(5), 435-443. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.5.435>
- Erickson, R. R., Dunning, L. M., Olson, D. A., Cohen, S. J., Davis, A. T., Wood, W. G., Kratzke, R. A., & Holtzman, J. L. (2005). In cerebrospinal fluid ER chaperones ERp57 and calreticulin bind beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(1), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.090>
- Eufemi, M., Coppari, S., Altieri, F., Grillo, C., Ferraro, A., & Turano, C. (2004). ERp57 is present in STAT3-DNA complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(4), 1306-1312. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.009>
- Filigrana, R., Civiero, L., Ferrari, V., Codolo, G., Greggio, E., Bubacco, L., Beltramini, M., & Bisaglia, M. (2015). Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-SY5Y and BE(2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon

- Differentiation. *PLoS One*, 10(8), e0136769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136769>
- Fujii, T., Awaka, S. Y., Takahashi, Y., Fujita, K., Tsuji, H., Shimizu, T., Gomi, T., Tsukada, K., & Sakai, H. (2013). Modulation of H(+),K(+)-ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett*, 587(24), 3898-3905. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.030>
- Galligan, J. J., & Petersen, D. R. (2012). The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics*, 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-6-6>
- Garbi, N., Tanaka, S., Momburg, F., & Hammerling, G. J. (2006). Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol*, 7(1), 93-102. <https://doi.org/10.1038/ni1288>
- Gauci, E., Altieri, F., Turano, C., & Chichiarelli, S. (2013). The protein ERp57 contributes to EGF receptor signaling and internalization in MDA-MB-468 breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 114(11), 2461-2470. <https://doi.org/10.1002/jcb.24590>
- Gauci, E., Raimondo, D., Grillo, C., Cervoni, L., Altieri, F., Nittari, G., Eufemi, M., & Chichiarelli, S. (2016). Analysis of the interaction of calcitriol with the disulfide isomerase ERp57. *Sci Rep*, 6, 37957. <https://doi.org/10.1038/srep37957>
- Gezen-Ak, D., Atasoy, I. L., Candas, E., Alaylioglu, M., Yilmazer, S., & Dursun, E. (2017). Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3. *ACS Chem Neurosci*, 8(10), 2335-2346. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00245>
- Gezen-Ak, D., & Dursun, E. (2019). Molecular basis of vitamin D action in neurodegeneration: the story of a team perspective. *Hormones (Athens)*, 18(1), 17-21. <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0087-4>
- Gezen-Ak, D., Dursun, E., Ertan, T., Hanagasi, H., Gurvit, H., Emre, M., Eker, E., Ozturk, M., Engin, F., & Yilmazer, S. (2007). Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med*, 212(3), 275-282. <https://doi.org/10.1620/tjem.212.275>
- Gezen-Ak, D., Dursun, E., & Yilmazer, S. (2011). The effects of vitamin D receptor silencing on the expression of LVSCC-A1C and LVSCC-A1D and the release of NGF in cortical neurons. *PLoS One*, 6(3), e17553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017553>
- Gezen-Ak, D., Dursun, E., & Yilmazer, S. (2013). Vitamin D inquiry in hippocampal neurons: consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement. *Neurol Sci*, 34(8), 1453-1458. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1268-6>
- Gezen-Ak, D., Yilmazer, S., & Dursun, E. (2014). Why vitamin D in Alzheimer's disease? The hypothesis. *J Alzheimers Dis*, 40(2), 257-269. <https://doi.org/10.3233/JAD-131970>
- Goldie, B. J., Barnett, M. M., & Cairns, M. J. (2014). BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Front Cell Neurosci*, 8, 325. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00325>
- Gonzalez-Perez, P., Woehlbier, U., Chian, R. J., Sapp, P., Rouleau, G. A., Leblond, C. S., Daoud, H., Dion, P. A., Landers, J. E., Hetz, C., & Brown, R. H. (2015). Identification of rare protein disulfide isomerase gene variants in amyotrophic

- lateral sclerosis patients. *Gene*, 566(2), 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.035>
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242), 1127-1130. <https://doi.org/10.1038/nature07986>
- Greene, A. N., Parks, L. G., Solomon, M. B., & Privette Vinnedge, L. M. (2020). Loss of DEK Expression Induces Alzheimer's Disease Phenotypes in Differentiated SH-SY5Y Cells. *Front Mol Neurosci*, 13, 594319. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.594319>
- Grillo, C., D'Ambrosio, C., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Scaloni, A., Maceroni, M., Eufemi, M., & Altieri, F. (2007). DNA-binding activity of the ERp57 C-terminal domain is related to a redox-dependent conformational change. *J Biol Chem*, 282(14), 10299-10310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700966200>
- Grillo, C., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Maceroni, M., Merluzzi, S., Turano, C., & Altieri, F. (2006). Cooperative activity of Ref-1/APE and ERp57 in reductive activation of transcription factors. *Free Radic Biol Med*, 41(7), 1113-1123. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.016>
- Grimm, M. O. W., Thiel, A., Lauer, A. A., Winkler, J., Lehmann, J., Regner, L., Nelke, C., Janitschke, D., Benoist, C., Streidenberger, O., Stotzel, H., Endres, K., Herr, C., Beisswenger, C., Grimm, H. S., Bals, R., Lammert, F., & Hartmann, T. (2017). Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid-beta (Abeta) Formation and Increase Abeta-Degradation. *Int J Mol Sci*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122764>
- Grindel, B. J., Rohe, B., Safford, S. E., Bennett, J. J., & Farach-Carson, M. C. (2011). Tumor necrosis factor-alpha treatment of HepG2 cells mobilizes a cytoplasmic pool of ERp57/1,25D(3)-MARRS to the nucleus. *J Cell Biochem*, 112(9), 2606-2615. <https://doi.org/10.1002/jcb.23187>
- Guo, G., Gong, K., Wohlfeld, B., Hatanpaa, K. J., Zhao, D., & Habib, A. A. (2015). Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res*, 75(17), 3436-3441. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0989>
- Guo, G. G., Patel, K., Kumar, V., Shah, M., Fried, V. A., Etlinger, J. D., & Sehgal, P. B. (2002). Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. *J Interferon Cytokine Res*, 22(5), 555-563. <https://doi.org/10.1089/10799900252982034>
- Guo, Y., Wang, Q., Chen, S., & Xu, C. (2021). Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. *Metabolism*, 115, 154454. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154454>
- Halliday, M., & Mallucci, G. R. (2015). Review: Modulating the unfolded protein response to prevent neurodegeneration and enhance memory. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 41(4), 414-427. <https://doi.org/10.1111/nan.12211>
- Hashimoto, S., & Saido, T. C. (2018). Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease. *Open Biol*, 8(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.180024>
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18(16), 1926-1945. <https://doi.org/10.1101/gad.1212704>
- He, J., Shi, W., Guo, Y., & Chai, Z. (2014). ERp57 modulates mitochondrial calcium uptake through the MCU. *FEBS Lett*, 588(12), 2087-2094. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.041>
- Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59(2 Suppl), 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>

- Hettinghouse, A., Liu, R., & Liu, C. J. (2018). Multifunctional molecule ERp57: From cancer to neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*, 181, 34-48. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.011>
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell, K., Castilla, J., & Soto, C. (2005). The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci*, 25(11), 2793-2802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4090-04.2005>
- Hirano, N., Shibasaki, F., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T., & Hirai, H. (1995). Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur J Biochem*, 234(1), 336-342. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.336_c.x
- Hoffstrom, B. G., Kaplan, A., Letso, R., Schmid, R. S., Turmel, G. J., Lo, D. C., & Stockwell, B. R. (2010). Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol*, 6(12), 900-906. <https://doi.org/10.1038/nchembio.467>
- Holbrook, L. M., Sasikumar, P., Stanley, R. G., Simmonds, A. D., Bicknell, A. B., & Gibbins, J. M. (2012). The platelet-surface thiol isomerase enzyme ERp57 modulates platelet function. *J Thromb Haemost*, 10(2), 278-288. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04593.x>
- Holtz, W. A., & O'Malley, K. L. (2003). Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*, 278(21), 19367-19377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211821200>
- Holtzman, J. L. (2013). Cellular and animal models for high-throughput screening of therapeutic agents for the treatment of the diseases of the elderly in general and Alzheimer's disease in particular(dagger). *Front Pharmacol*, 4, 59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00059>
- Honjo, Y., Ito, H., Horibe, T., Takahashi, R., & Kawakami, K. (2010). Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer disease. *Brain Res*, 1349, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.016>
- Ida, N., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1996). Rapid cellular uptake of Alzheimer amyloid betaA4 peptide by cultured human neuroblastoma cells. *FEBS Lett*, 394(2), 174-178. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00948-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00948-9)
- Jamsa, A., Hasslund, K., Cowburn, R. F., Backstrom, A., & Vasange, M. (2004). The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(3), 993-1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.075>
- Jian, J., Tian, Q. Y., Hettinghouse, A., Zhao, S., Liu, H., Wei, J., Grunig, G., Zhang, W., Setchell, K. D. R., Sun, Y., Overkleeft, H. S., Chan, G. L., & Liu, C. J. (2016). Progranulin Recruits HSP70 to beta-Glucocerebrosidase and Is Therapeutic Against Gaucher Disease. *EBioMedicine*, 13, 212-224. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.010>
- Justice, N. J. (2018). The relationship between stress and Alzheimer's disease. *Neurobiol Stress*, 8, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.04.002>
- Kalinovskii, A. P., Osmakov, D. I., Koshelev, S. G., Lubova, K. I., Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., & Andreev, Y. A. (2022). Retinoic Acid-Differentiated Neuroblastoma SH-SY5Y Is an Accessible In Vitro Model to Study Native

- Human Acid-Sensing Ion Channels 1a (ASIC1a). *Biology (Basel)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biology11020167>
- Keasey, M. P., Razskazovskiy, V., Jia, C., Peterknecht, E. D., Bradshaw, P. C., & Hagg, T. (2021). PDIA3 inhibits mitochondrial respiratory function in brain endothelial cells and *C. elegans* through STAT3 signaling and decreases survival after OGD. *Cell Commun Signal*, 19(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00794-z>
- Kent-Braun, J. A., Walker, C. H., Weiner, M. W., & Miller, R. G. (1998). Functional significance of upper and lower motor neuron impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 21(6), 762-768. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199806\)21:6<762::aid-mus8>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199806)21:6<762::aid-mus8>3.0.co;2-5)
- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*, 18(11), 1106-1125. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200528142429>
- Kim-Han, J. S., & O'Malley, K. L. (2007). Cell stress induced by the parkinsonian mimetic, 6-hydroxydopamine, is concurrent with oxidation of the chaperone, ERp57, and aggresome formation. *Antioxid Redox Signal*, 9(12), 2255-2264. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1791>
- Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chetelat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
- Korecka, J. A., van Kesteren, R. E., Blaas, E., Spitzer, S. O., Kamstra, J. H., Smit, A. B., Swaab, D. F., Verhaagen, J., & Bossers, K. (2013). Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PLoS One*, 8(5), e63862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063862>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Kozlov, G., Maattanen, P., Schrag, J. D., Pollock, S., Cygler, M., Nagar, B., Thomas, D. Y., & Gehring, K. (2006). Crystal structure of the bb' domains of the protein disulfide isomerase ERp57. *Structure*, 14(8), 1331-1339. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.06.019>
- Krishtal, J., Bragina, O., Metsla, K., Palumaa, P., & Tougu, V. (2017). In situ fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells. *PLoS One*, 12(10), e0186636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186636>
- Krishtal, J., Metsla, K., Bragina, O., Tougu, V., & Palumaa, P. (2019). Toxicity of Amyloid-beta Peptides Varies Depending on Differentiation Route of SH-SY5Y Cells. *J Alzheimers Dis*, 71(3), 879-887. <https://doi.org/10.3233/JAD-190705>
- Krynetskaia, N. F., Phadke, M. S., Jadhav, S. H., & Krynetskiy, E. Y. (2009). Chromatin-associated proteins HMGB1/2 and PDIA3 trigger cellular response to chemotherapy-induced DNA damage. *Mol Cancer Ther*, 8(4), 864-872. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0695>
- Krynetski, E. Y., Krynetskaia, N. F., Bianchi, M. E., & Evans, W. E. (2003). A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. *Cancer Res*, 63(1), 100-106. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517784>

- Landel, V., Stephan, D., Cui, X., Eyles, D., & Feron, F. (2018). Differential expression of vitamin D-associated enzymes and receptors in brain cell subtypes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 177, 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.008>
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 25(1), 59-70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Larsson, D., Hagberg, M., Malek, N., Kjellberg, C., Senneberg, E., Tahmasebifar, N., & Johansson, V. (2008). Membrane initiated signaling by 1,25alpha-dihydroxyvitamin D3 in LNCaP prostate cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 617, 573-579. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_59
- Lecanu, L., Rammouz, G., McCourty, A., Sidahmed, E. K., Greeson, J., & Papadopoulos, V. (2010). Caprospinol reduces amyloid deposits and improves cognitive function in a rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 165(2), 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.033>
- Lee, A. S. (1981). The accumulation of three specific proteins related to glucose-regulated proteins in a temperature-sensitive hamster mutant cell line K12. *J Cell Physiol*, 106(1), 119-125. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041060113>
- Lee, J. H., Won, S. M., Suh, J., Son, S. J., Moon, G. J., Park, U. J., & Gwag, B. J. (2010). Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp Mol Med*, 42(5), 386-394. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.5.040>
- Lehew, H., Evangelista, B., Cilenti, L., & Teter, K. (2019). Protein Disulfide Isomerase Disrupts and Detoxifies Aggregates of Amyloid Beta Peptide [Abstract from the Experimental Biology 2019 Meeting]. *The FASEB Journal*, 33(S1), 464.465-464.465. https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.464.5
- Li, Y., & Camacho, P. (2004). Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol*, 164(1), 35-46. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307010>
- Lindholm, D., Wootz, H., & Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, 13(3), 385-392. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401778>
- Lindquist, J. A., Jensen, O. N., Mann, M., & Hammerling, G. J. (1998). ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J*, 17(8), 2186-2195. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2186>
- Linz, A., Knieper, Y., Gronau, T., Hansen, U., Aszodi, A., Garbi, N., Hammerling, G. J., Pap, T., Bruckner, P., & Dreier, R. (2015). ER Stress During the Pubertal Growth Spurt Results in Impaired Long-Bone Growth in Chondrocyte-Specific ERp57 Knockout Mice. *J Bone Miner Res*, 30(8), 1481-1493. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2484>
- Lista, S., O'Bryant, S. E., Blennow, K., Dubois, B., Hugon, J., Zetterberg, H., & Hampel, H. (2015). Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 47(2), 291-317. <https://doi.org/10.3233/JAD-143006>
- Liu, C. C., Leclair, P., Pedari, F., Vieira, H., Monajemi, M., Sly, L. M., Reid, G. S., & Lim, C. J. (2019). Integrins and ERp57 Coordinate to Regulate Cell Surface Calreticulin in Immunogenic Cell Death. *Front Oncol*, 9, 411. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00411>
- Liu, Y., Zhu, Y., Wu, X., Li, Y., Guo, Q., Li, W., & Ding, Z. (2014). Increased expression of ERp57 in rat oocytes during meiotic maturation is associated with sperm-egg fusion. *Mol Reprod Dev*, 81(4), 315-325. <https://doi.org/10.1002/mrd.22300>
- Lopes, F. M., Schroder, R., da Frota, M. L., Jr., Zanotto-Filho, A., Muller, C. B., Pires, A. S., Meurer, R. T., Colpo, G. D., Gelain, D. P., Kapczinski, F., Moreira, J. C.,

- Fernandes Mda, C., & Klamt, F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res*, 1337, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.102>
- Lynes, E. M., Raturi, A., Shenkman, M., Ortiz Sandoval, C., Yap, M. C., Wu, J., Janowicz, A., Myhill, N., Benson, M. D., Campbell, R. E., Berthiaume, L. G., Lederkremer, G. Z., & Simmen, T. (2013). Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER Ca²⁺ signaling. *J Cell Sci*, 126(Pt 17), 3893-3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.125856>
- Mah, S. J., Ades, A. M., Mir, R., Siemens, I. R., Williamson, J. R., & Fluharty, S. J. (1992). Association of solubilized angiotensin II receptors with phospholipase C-alpha in murine neuroblastoma NIE-115 cells. *Mol Pharmacol*, 42(2), 217-226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1513321>
- Mahmood, F., Xu, R., Awan, M. U. N., Song, Y., Han, Q., Xia, X., & Zhang, J. (2021). PDIA3: Structure, functions and its potential role in viral infections. *Biomed Pharmacother*, 143, 112110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112110>
- Markus, M., & Benezra, R. (1999). Two isoforms of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism. *J Biol Chem*, 274(2), 1040-1049. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.1040>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Matus, S., Valenzuela, V., Medinas, D. B., & Hetz, C. (2013). ER Dysfunction and Protein Folding Stress in ALS. *Int J Cell Biol*, 2013, 674751. <https://doi.org/10.1155/2013/674751>
- McAllister, A. K., Lo, D. C., & Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15(4), 791-803. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90171-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90171-x)
- Miyata, S., Mori, Y., Fujiwara, T., Ikenaka, K., Matsuzaki, S., Oono, K., Katayama, T., & Tohyama, M. (2005). Local protein synthesis by BDNF is potentiated in hippocampal neurons exposed to ephrins. *Brain Res Mol Brain Res*, 134(2), 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.10.034>
- Mpandzou, G., Ait Ben Haddou, E., Regragui, W., Benomar, A., & Yahyaoui, M. (2016). Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: A review. *Rev Neurol (Paris)*, 172(2), 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.11.005>
- Mui, A. L. (1999). The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55(12), 1547-1558. <https://doi.org/10.1007/s000180050394>
- Muramori, F., Kobayashi, K., & Nakamura, I. (1998). A quantitative study of neurofibrillary tangles, senile plaques and astrocytes in the hippocampal subdivisions and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, normal controls and non-Alzheimer neuropsychiatric diseases. *Psychiatry Clin Neurosci*, 52(6), 593-599. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1998.tb02706.x>
- Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 311-323. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>
- Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett*, 587(13), 2046-2054. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010>
- Narayanasamy, S., & Aradhyam, G. K. (2018). ER Stress, Human Health and Role of Ca²⁺-Binding Chaperones. In A. Asea & P. Kaur (Eds.), *Regulation of Heat*

- Shock Protein Responses* (Vol. 13, pp. 219-249). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-74715-6_9
- Nardo, G., Pozzi, S., Pignataro, M., Laurantano, E., Spano, G., Garbelli, S., Mantovani, S., Marinou, K., Papetti, L., Monteforte, M., Torri, V., Paris, L., Bazzoni, G., Lunetta, C., Corbo, M., Mora, G., Bendotti, C., & Bonetto, V. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*, 6(10), e25545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025545>
- Nemere, I., Farach-Carson, M. C., Rohe, B., Sterling, T. M., Norman, A. W., Boyan, B. D., & Safford, S. E. (2004). Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)2D3 membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7392-7397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402207101>
- Nemere, I., Garbi, N., Hammerling, G. J., & Khanal, R. C. (2010). Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D3-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. *J Biol Chem*, 285(41), 31859-31866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116954>
- Nemere, I., Garcia-Garbi, N., Hammerling, G. J., & Winger, Q. (2012). Intestinal cell phosphate uptake and the targeted knockout of the 1,25D3-MARRS receptor/PDIA3/ERp57. *Endocrinology*, 153(4), 1609-1615. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1850>
- Nomura, J., Hosoi, T., Kaneko, M., Ozawa, K., Nishi, A., & Nomura, Y. (2016). Neuroprotection by Endoplasmic Reticulum Stress-Induced HRD1 and Chaperones: Possible Therapeutic Targets for Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Med Sci (Basel)*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/medsci4030014>
- Obeid, M. (2008). ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J Immunol*, 181(4), 2533-2543. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2533>
- Ohtani, H., Wakui, H., Ishino, T., Komatsuda, A., & Miura, A. B. (1993). An isoform of protein disulfide isomerase is expressed in the developing acrosome of spermatids during rat spermiogenesis and is transported into the nucleus of mature spermatids and epididymal spermatozoa. *Histochemistry*, 100(6), 423-429. <https://doi.org/10.1007/BF00267822>
- Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H., & High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell*, 10(8), 2573-2582. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2573>
- Ozaki, T., Yamashita, T., & Ishiguro, S. (2008). ERp57-associated mitochondrial m-calpain truncates apoptosis-inducing factor. *Biochim Biophys Acta*, 1783(10), 1955-1963. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.011>
- Pahlman, S., Hoehner, J. C., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E., & et al. (1995). Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*, 31A(4), 453-458. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00033-f](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00033-f)
- Pahlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., & Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*, 14(2), 135-144. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(84\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0045-6039(84)90038-1)
- Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D. H. W., Mueller, S., Miller, T., & Miller, C. C. J. (2016). There's Something Wrong with my MAM; the ER-

- Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci*, 39(3), 146-157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.008>
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D. B., & Kroemer, G. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J*, 28(5), 578-590. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.1>
- Parakh, S., Jagaraj, C. J., Vidal, M., Ragagnin, A. M. G., Perri, E. R., Konopka, A., Toth, R. P., Galper, J., Blair, I. P., Thomas, C. J., Walker, A. K., Yang, S., Spencer, D. M., & Atkin, J. D. (2018). ERp57 is protective against mutant SOD1-induced cellular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 27(8), 1311-1331. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy041>
- Perri, E., Parakh, S., & Atkin, J. (2017). Protein Disulphide Isomerases: emerging roles of PDI and ERp57 in the nervous system and as therapeutic targets for ALS. *Expert Opin Ther Targets*, 21(1), 37-49. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1254197>
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., & Bozko, P. (2010). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/920161>
- Prince, J. A., & Orelan, L. (1997). Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull*, 43(6), 515-523. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00328-6)
- Prins, D., Groenendyk, J., Touret, N., & Michalak, M. (2011). Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO Rep*, 12(11), 1182-1188. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.173>
- Rahman, S., Archana, A., Jan, A. T., & Minakshi, R. (2018). Dissecting Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response (UPR(ER)) in Managing Clandestine Modus Operandi of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 10, 30. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00030>
- Rajasekhar, K., Chakrabarti, M., & Govindaraju, T. (2015). Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chem Commun (Camb)*, 51(70), 13434-13450. <https://doi.org/10.1039/c5cc05264e>
- Ramirez-Rangel, I., Bracho-Valdes, I., Vazquez-Macias, A., Carretero-Ortega, J., Reyes-Cruz, G., & Vazquez-Prado, J. (2011). Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57. *Mol Cell Biol*, 31(8), 1657-1671. <https://doi.org/10.1128/MCB.00824-10>
- Richard, C. L., Farach-Carson, M. C., Rohe, B., Nemere, I., & Meckling, K. A. (2010). Involvement of 1,25D3-MARRS (membrane associated, rapid response steroid-binding), a novel vitamin D receptor, in growth inhibition of breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 316(5), 695-703. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.12.015>
- Rohe, B., Safford, S. E., Nemere, I., & Farach-Carson, M. C. (2005). Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS)-binding protein in rat IEC-6 cells. *Steroids*, 70(5-7), 458-463. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.02.016>
- Rozas, P., Pinto, C., Martinez Traub, F., Diaz, R., Perez, V., Becerra, D., Ojeda, P., Ojeda, J., Wright, M. T., Mella, J., Plate, L., Henriquez, J. P., Hetz, C., & Medinas, D. B. (2021). Protein disulfide isomerase ERp57 protects early muscle denervation in

- experimental ALS. *Acta Neuropathol Commun*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01116-z>
- Ryu, E. J., Harding, H. P., Angelastro, J. M., Vitolo, O. V., Ron, D., & Greene, L. A. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 22(24), 10690-10698. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486162>
- Samanta, S., Ramesh, M., & Govindaraju, T. (2022). Chapter 1:Alzheimer's is a Multifactorial Disease. In *Alzheimer's Disease: Recent Findings in Pathophysiology, Diagnostic and Therapeutic Modalities* (pp. 1-34). <https://doi.org/10.1039/9781839162732-00001>
- Sarbassov, D. D., & Sabatini, D. M. (2005). Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem*, 280(47), 39505-39509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506096200>
- Sarkanen, J. R., Nykky, J., Siikanen, J., Selinummi, J., Ylikomi, T., & Jalonen, T. O. (2007). Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 102(6), 1941-1952. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04676.x>
- Schelhaas, M., Malmstrom, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grunewald, K., & Helenius, A. (2007). Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell*, 131(3), 516-529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.038>
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*, 26(7), 1749-1760. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>
- Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., & Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci*, 24(33), 7366-7377. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1739-04.2004>
- Sciandra, F., Angelucci, E., Altieri, F., Ricci, D., Hubner, W., Petrucci, T. C., Giardina, B., Brancaccio, A., & Bozzi, M. (2012). Dystroglycan is associated to the disulfide isomerase ERp57. *Exp Cell Res*, 318(19), 2460-2469. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.07.006>
- Sehgal, P. B. (2003). Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. *Acta Biochim Pol*, 50(3), 583-594. <https://doi.org/035003583>
- Sehgal, P. B., Guo, G. G., Shah, M., Kumar, V., & Patel, K. (2002). Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J Biol Chem*, 277(14), 12067-12074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200018200>
- Selivanova, A., Winblad, B., Dantuma, N. P., & Farmery, M. R. (2007). Biogenesis and processing of the amyloid precursor protein in the early secretory pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 357(4), 1034-1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.062>
- Sepulveda, M., Rozas, P., Hetz, C., & Medinas, D. B. (2016). ERp57 as a novel cellular factor controlling prion protein biosynthesis: Therapeutic potential of protein disulfide isomerases. *Prion*, 10(1), 50-56. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1129485>
- Sequeira, V. B., Rybchyn, M. S., Tongkao-On, W., Gordon-Thomson, C., Malloy, P. J., Nemere, I., Norman, A. W., Reeve, V. E., Halliday, G. M., Feldman, D., & Mason, R. S. (2012). The role of the vitamin D receptor and ERp57 in photoprotection by

- 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Endocrinol*, 26(4), 574-582. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1161>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Serrano, A., Qiao, X., Matos, J. O., Farley, L., Cilenti, L., Chen, B., Tatulian, S. A., & Teter, K. (2020). Reversal of Alpha-Synuclein Fibrillization by Protein Disulfide Isomerase. *Front Cell Dev Biol*, 8, 726. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00726>
- Sery, O., Povova, J., Misek, I., Pesak, L., & Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol*, 51(1), 1-9. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>
- Sheppard, O., & Coleman, M. (2020). Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch1>
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp*(108), 53193. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Simoes, R. F., Ferrao, R., Silva, M. R., Pinho, S. L. C., Ferreira, L., Oliveira, P. J., & Cunha-Oliveira, T. (2021). Refinement of a differentiation protocol using neuroblastoma SH-SY5Y cells for use in neurotoxicology research. *Food Chem Toxicol*, 149, 111967. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111967>
- Singh, R., Kaur, N., Dhingra, N., & Kaur, T. (2022). Protein misfolding, ER stress and chaperones: an approach to develop chaperone-based therapeutics for Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*, 1-21. <https://doi.org/10.1080/00207454.2021.1968859>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K., & Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 8(8), 1051-1058. <https://doi.org/10.1038/nn1503>
- Soria Lopez, J. A., Gonzalez, H. M., & Leger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*, 167, 231-255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Strother, L., Miles, G. B., Holiday, A. R., Cheng, Y., & Doherty, G. H. (2021). Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: A novel model of neuronal ageing. *J Neurosci Methods*, 362, 109301. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109301>
- Sutherland, M. K., Somerville, M. J., Yoong, L. K., Bergeron, C., Haussler, M. R., & McLachlan, D. R. (1992). Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res*, 13(3), 239-250. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(92\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0169-328x(92)90032-7)
- Talboom, J. S., Velazquez, R., & Oddo, S. (2015). The mammalian target of rapamycin at the crossroad between cognitive aging and Alzheimer's disease. *NPJ Aging Mech Dis*, 1, 15008. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2015.8>
- Tan, J., & Evin, G. (2012). Beta-site APP-cleaving enzyme 1 trafficking and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurochem*, 120(6), 869-880. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07623.x>
- Tan, J. Z. A., & Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's

- disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1861(4), 697-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>
- Teppola, H., Sarkanen, J. R., Jalonen, T. O., & Linne, M. L. (2016). Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res*, 41(4), 731-747. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1743-6>
- Thapa, S., Abdulrahman, B., Abdelaziz, D. H., Lu, L., Ben Aissa, M., & Schatzl, H. M. (2018). Overexpression of quality control proteins reduces prion conversion in prion-infected cells. *J Biol Chem*, 293(41), 16069-16082. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002754>
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*, 14, 5541-5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
- Tohda, C., Urano, T., Umezaki, M., Nemere, I., & Kuboyama, T. (2012). Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D(3)-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep*, 2, 535. <https://doi.org/10.1038/srep00535>
- Tokutomi, Y., Araki, N., Kataoka, K., Yamamoto, E., & Kim-Mitsuyama, S. (2007). Oxidation of Prx2 and phosphorylation of GRP58 by angiotensin II in human coronary smooth muscle cells identified by 2D-DIGE analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 364(4), 822-830. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.095>
- Torres, M., Medinas, D. B., Matamala, J. M., Woehlbier, U., Cornejo, V. H., Solda, T., Andreu, C., Rozas, P., Matus, S., Munoz, N., Vergara, C., Cartier, L., Soto, C., Molinari, M., & Hetz, C. (2015). The Protein-disulfide Isomerase ERp57 Regulates the Steady-state Levels of the Prion Protein. *J Biol Chem*, 290(39), 23631-23645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635565>
- Toth, C., Breithaupt, K., Ge, S., Duan, Y., Terris, J. M., Thiessen, A., Wiebe, S., Zochodne, D. W., & Suchowersky, O. (2010). Levodopa, methylmalonic acid, and neuropathy in idiopathic Parkinson disease. *Ann Neurol*, 68(1), 28-36. <https://doi.org/10.1002/ana.22021>
- Tunsophon, S., & Nemere, I. (2010). Protein kinase C isotypes in signal transduction for the 1,25D3-MARRS receptor (ERp57/PDIA3) in steroid hormone-stimulated phosphate uptake. *Steroids*, 75(4-5), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.004>
- Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., & Chichiarelli, S. (2011). ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett*, 16(4), 539-563. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0022-z>
- van der Kant, R., & Goldstein, L. S. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell*, 32(4), 502-515. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>
- Walczak, C. P., & Tsai, B. (2011). A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *J Virol*, 85(5), 2386-2396. <https://doi.org/10.1128/JVI.01855-10>
- Wang, W. T., Sun, L., & Sun, C. H. (2019). PDIA3-regulated inflammation and oxidative stress contribute to the traumatic brain injury (TBI) in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 518(4), 657-663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.100>
- Wilding, C., Bell, K., Funke, S., Beck, S., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2015). GFAP antibodies show protective effect on oxidatively stressed neuroretinal cells via

- interaction with ERP57. *J Pharmacol Sci*, 127(3), 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.12.019>
- Wilkins, H. M., & Swerdlow, R. H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull*, 133, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>
- Woehlbier, U., Colombo, A., Saaranen, M. J., Perez, V., Ojeda, J., Bustos, F. J., Andreu, C. I., Torres, M., Valenzuela, V., Medinas, D. B., Rozas, P., Vidal, R. L., Lopez-Gonzalez, R., Salameh, J., Fernandez-Collemani, S., Munoz, N., Matus, S., Armisen, R., Sagredo, A., . . . Hetz, C. (2016). ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *EMBO J*, 35(8), 845-865. <https://doi.org/10.15252/embj.201592224>
- Wu, C. K., Thal, L., Pizzo, D., Hansen, L., Masliah, E., & Geula, C. (2005). Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 195(2), 484-496. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.06.020>
- Wu, W., Beilhartz, G., Roy, Y., Richard, C. L., Curtin, M., Brown, L., Cadieux, D., Coppolino, M., Farach-Carson, M. C., Nemere, I., & Meckling, K. A. (2010). Nuclear translocation of the 1,25D3-MARRS (membrane associated rapid response to steroids) receptor protein and NFkappaB in differentiating NB4 leukemia cells. *Exp Cell Res*, 316(7), 1101-1108. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.01.010>
- Wu, Y., Ahmad, S. S., Zhou, J., Wang, L., Cully, M. P., & Essex, D. W. (2012). The disulfide isomerase ERp57 mediates platelet aggregation, hemostasis, and thrombosis. *Blood*, 119(7), 1737-1746. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360685>
- Wu, Y., & Essex, D. W. (2020). Vascular thiol isomerases in thrombosis: The yin and yang. *J Thromb Haemost*, 18(11), 2790-2800. <https://doi.org/10.1111/jth.15019>
- Xie, H. R., Hu, L. S., & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*, 123(8), 1086-1092. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497720>
- Xu, D., Perez, R. E., Rezaiekhaliq, M. H., Bourdi, M., & Truog, W. E. (2009). Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297(1), L44-51. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90626.2008>
- Yan, P., Zou, Z., Zhang, S., Wang, R., Niu, T., Zhang, X., Liu, D., Zhou, X., Chang, A. K., Milton, N. G. N., Jones, G. W., & He, J. (2021). Defining the mechanism of PDI interaction with disulfide-free amyloidogenic proteins: Implications for exogenous protein expression and neurodegenerative disease. *Int J Biol Macromol*, 174, 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.172>
- Yang, W. S., Kim, H. W., Lee, J. M., Han, N. J., Lee, M. J., & Park, S. K. (2015). 1,25-dihydroxyvitamin D3 causes ADAM10-dependent ectodomain shedding of tumor necrosis factor receptor 1 in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 87(3), 533-542. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097147>
- Yang, W. S., Yu, H., Kim, J. J., Lee, M. J., & Park, S. K. (2016). Vitamin D-induced ectodomain shedding of TNF receptor 1 as a nongenomic action: D3 vs D2 derivatives. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 155(Pt A), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.019>
- Yavuz, U., Alaylioglu, M., Sengul, B., Karras, S. N., Gezen-Ak, D., & Dursun, E. (2021). Protein disulfide isomerase A3 might be involved in the regulation of 24-dehydrocholesterol reductase via vitamin D equilibrium in primary cortical

- neurons. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 57(7), 704-714. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00602-5>
- Yi, M. C., Melkonian, A. V., Ousey, J. A., & Khosla, C. (2018). Endoplasmic reticulum-resident protein 57 (ERp57) oxidatively inactivates human transglutaminase 2. *J Biol Chem*, 293(8), 2640-2649. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001382>
- Yoo, D. Y., Cho, S. B., Jung, H. Y., Kim, W., Lee, K. Y., Kim, J. W., Moon, S. M., Won, M. H., Choi, J. H., Yoon, Y. S., Kim, D. W., Choi, S. Y., & Hwang, I. K. (2019). Protein disulfide-isomerase A3 significantly reduces ischemia-induced damage by reducing oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Neurochem Int*, 122, 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.002>
- Yoo, Y., Byun, K., Kang, T., Bayarsaikhan, D., Kim, J. Y., Oh, S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., Chung, W. I., Kim, S. U., Lee, B., & Park, Y. M. (2015). Amyloid-beta-activated human microglial cells through ER-resident proteins. *J Proteome Res*, 14(1), 214-223. <https://doi.org/10.1021/pr500926r>
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 9(11), 798-809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- Yusuf, M., Leung, K., Morris, K. J., & Volpi, E. V. (2013). Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*, 14(1), 63-70. <https://doi.org/10.1007/s10048-012-0350-9>
- Zhang, J., Wu, J., Huo, R., Mao, Y., Lu, Y., Guo, X., Liu, J., Zhou, Z., Huang, X., & Sha, J. (2007). ERp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. *Mol Hum Reprod*, 13(9), 633-639. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam049>
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-27>
- Zhu, L., Santos, N. C., & Kim, K. H. (2010). Disulfide isomerase glucose-regulated protein 58 is required for the nuclear localization and degradation of retinoic acid receptor alpha. *Reproduction*, 139(4), 717-731. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0527>

HAM VERİLER

FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AMİLOİD BETA İLE PDIA3 ARASINDAKİ İLİŞKİNİN FARKLILAŞTIRILMIŞ SH-SY5Y HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 5	% 4	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Aubryanna Hettinghouse, Ronghan Liu, Chuan-ju Liu. "Multifunctional molecule ERp57: From cancer to neurodegenerative diseases", Pharmacology & Therapeutics, 2018 Yayın	<% 1
3	Submitted to Afyon Kocatepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	www.coursehero.com İnternet Kaynağı	<% 1