



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İN VİTRO AMİLOİD-BETA TOKSİSİTE MODELİ
KULLANILARAK SIRT1 PROTEİN İNHİBİSYONUNUN
EKSOZOMAL PROTEİN İÇERİĞİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

RABİA KALKAN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÜLKAN KILIÇ

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2018

TEŞEKKÜR

Önce gerçek bilim insanları olmamız için yorulmadan uğraşan danışmanım Prof. Dr. Ülkan KILIÇ' a; eş danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ' a ve kendisinden çok fazla şey öğrendiğim Dr. Esra YALÇIN başta olmak üzere tüm ekibine; bitmek bilmeyen sorularımı sonsuz bir sabırla cevaplayan Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY' a, ilkokula başladığım günden şu güne üzerimde emeği olan bütün hocalarıma ve elbette grup arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Varlıkları ve dualarıyla en büyük destekçilerim anneme, babama; tüm eğitim hayatım boyunca her daim yanı başımda olan ablama ve tüm aileme sonsuz teşekkürler.

Bu tezin yazım sürecinin uzak yakın şahitleri ve destekçileri başta Gizem Hazal ŞENTÜRK olmak üzere tüm dostlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1.Alzheimer Hastalığı (AH).....	5
4.1.1.Epidemiyoloji	6
4.1.2.Patofizyoloji	7
4.1.2.1.Amiloid Kaskad Hipotezi.....	7
4.1.2.2.Diğer Hipotezler	11
4.1.2.2.1.Alzheimer hastalığı ve tau.....	11
4.1.2.2.2. Alzheimer hastalığı ve APOE4.....	12
4.1.2.2.3. Alzheimer hastalığı ve kolinerjik hipotez	12
4.1.2.2.4.Alzheimer hastalığı ve çevresel faktörler.....	13
4.1.3.Alzheimer Teşhisi.....	13
4.1.4.Alzheimer Tedavisi.....	13
4.2.SIRT1.....	14
4.2.1.SIRT1 Alzheimer İlişkisi	15
4.3.Eksozom.....	16
4.3.1.Eksozom Alzheimer İlişkisi	18
5. METOT VE MATERYAL	19
5.1.Materyal Listesi	19
5.2.SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürü ve Pasajlanması	20
5.3.Amiloid Beta ($A\beta_{1-42}$) Toksisite Modelinin Oluşturulması	21
5.4.İnhibitör (ex527) Dozunun Belirlenmesi	21

5.5.Amiloid Beta ve SIRT1 İnhibitörü (ex527) Uygulanması.....	22
5.6.Protein İzolasyonu ve Western Blot	23
5.7.Eksozom İzolasyonu.....	24
5.8.Eksozom İmmünpresipitasyonu	25
5.9.Eksozom Western Blot	25
5.10.Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) analizi	26
6. BULGULAR	27
6.1.Amiloid Beta ($A\beta_{1-42}$) Toksisite Modeli LDH Sonuçları	27
6.2.İnhibitör (ex527) LDH Sitotoksisite Sonuçları	27
6.3. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulaması Yapılan SH-SY5Y Hücrelerinin Kültür Sonuçları.....	28
6.4. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulaması Yapılan SHSY-5Y Hücrelerinin TAK/TOD/OSI Sonuçları.....	32
6.5. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulaması Yapılan SH-SY5Y Hücre Lizatlarının Western Blot Sonuçları.....	34
6.6. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulaması Yapılan SH-SY5Y Hücrelerinden Elde Edilen Eksozomların Western Blot Sonuçları	42
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
8. KAYNAKLAR.....	47
9. ÖZGEÇMİŞ	56

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

α 7nAChR: Alfa 7 nikotinik reseptör

A β : Amiloid beta

AH: Alzheimer hastalığı

AKT: Protein kinaz B

AMPAR: α -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit reseptör

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid öncülü protein

ERK: hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz

GSK3- α : Glikojen sentez kinaz 3 alfa

GSK3- β : Glikojen sentez kinaz 3 beta

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi

NFY: nörofibriler yumak

NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptör

p75NTR: nerotroin reseptör

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog

PSEN: Presenilin

ROS: Reaktif oksijen türleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1 Amiloid kaskad hipotezi.....	7
Şekil 4.2 APP'nin amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollarla kesilmesi.....	9
Şekil 4.3 Eksozom biyogenezi.....	16
Şekil 4.4 Eksozomların hedef hücreye alınma yöntemleri.....	17
Şekil 6.1 1,25; 2,5; 5; ve 10 µM Aβ ₁₋₄₂ uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin LDH sonuçları.....	27
Şekil 6.2 98 nm, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM ex527 uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin LDH sonuçları.....	28
Şekil 6.3 SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri: hücre ekiminden 48 saat sonra; amiloid beta ve inhibitör uygulamasından önce.....	29
Şekil 6.4 SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri: hücre ekiminden 72 saat sonra.....	30
Şekil 6.5 SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri: hücre ekiminden 96 saat sonra; hücre toplanmasından önce.....	31
Şekil 6.6 Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin besiyerlerinde toplam antioksidan kapasite ölçümü sonuçları.....	32
Şekil 6.7 Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin besiyerlerinde toplam oksidatif durum ölçümü sonuçları.....	33
Şekil 6.8 Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin besiyerlerinde oksidatif stres indeksi ölçümü sonuçları.....	33
Şekil 6.9 Amiloid beta/inhibitör uygulanan hücrelerin reprezentatif western blot membran görüntüleri.....	36
Şekil 6.10 Amiloid beta/inhibitör (ex527) uygulanan grupların western blot sonuç grafikleri.....	39
Şekil 6.11 Amiloid beta/inhibitör uygulanan hücrelerden elde edilen eksozomların reprezentatif western blot membran görüntüsü.....	42
Şekil 6.12 Amiloid beta/inhibitör (ex527) uygulanan SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen eksozomların western blot sonuç grafiği.....	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1 Deney grup listesi.....	21
--	----



1. ÖZET

İN VİTRO AMİLOİD-BETA TOKSİSİTE MODELİ KULLANILARAK SIRT1 PROTEİN İNHİBİSYONUNUN EKSOZOMAL PROTEİN İÇERİĞİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Alzheimer hastalığı (AH), dünya genelinde yaklaşık 50 milyon insanı etkileyen, ölümcül, nörodejeneratif bir hastalıktır. Patofizyolojisinin temelinde hücre dışı senil amiloid-beta plakları ve hücre içi nörofibriler yumaklar bulunmaktadır. Hastalığın seyrini durdurabilecek ya da yavaşlatabilecek bir tedavi henüz bulunmamaktadır. SIRT1 birçok kritik hücresel süreçte görev alan bir histon deasetilaz enzimidir. AH modellerinde inhibisyonunun kognitif fonksiyonlarda ve hafızada iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir. Eksozomlar nano boyutta, hücre-hücre iletişimde görevli, tüm vücut sıvılarında bulunan, endozomal kökenli veziküllerdir. AH'de amiloid beta ve tau taşıdıkları gösterilmiştir. Bu çalışmada in-vitro amiloid beta toksisitesi uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde, SIRT1 enzim inhibitörünün (Ex527), PI3K/AKT yolağındaki proteinlere ve hücrelerden salınan eksozom miktarına etkisi araştırılmıştır. Toksisite uygulamasından önce ve sonra hücrelere verilen Ex527'nin p-GSK3- α ve p-GSK3- β 'nin ekspresyon seviyelerini arttırdığı, p-mTOR'un ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Amiloid beta verilen gruba kıyasla toksisite uygulamasından önce hücrelere verilen Ex527'nin hücrelerden salınan eksozomları arttırdığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Amiloid beta, Eksozom, SIRT1, sağkalım yolağı

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF SIRT1 PROTEIN INHIBITION ON EXOSOMAL PROTEIN CONTENT BY USING IN-VITRO AMYLOID BETA TOXICITY MODEL

Alzheimer Disease is a fatal neurodegenerative disorder which affects nearly 50 million people worldwide. Extracellular amyloid-beta plaques and intracellular neurofibrillary tangles create the basis of disease pathology. There is no treatment which can eliminate or slow the progress of disease. SIRT1 is a histone-deacetylase enzyme which has many critical roles in cellular processes. Exosomes are endosomal vesicles with dimensions in nanometer; they are present in all body fluids and have role in cell to cell contact. In Alzheimer's disease case, exosomes carry amyloid beta and tau. In this study, the effect of SIRT1 inhibitor (Ex527) on proteins of PI3K/AKT pathway and secreted exosome amounts were investigated via SH-SY5Y cell line with amyloid beta toxicity. Both before and after amyloid beta toxicity application, Ex527 was given to the cells and in both; the levels of p-GSK3- α and p-GSK3- β were increased whereas the level of p-mTOR was decreased. When compared to amyloid beta group, the level of exosome was increased when Ex527 was given to the cells before amyloid beta.

Key Words: Alzheimer's Disease, Amyloid-beta, exosome, SIRT1, survival pathway

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) hafıza ve bilişsel fonksiyonlarda kayıp, davranış ve kişilik değişikliği ile karakterize, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya genelinde yaklaşık 47,5 milyon insanı etkilemekte olup, insan yaşam ömrünün uzamasıyla da birlikte, bu sayının 2030 yılına kadar 75,8 milyona çıkacağı öngörülmektedir. Alzheimer hastalığının hâlihazırdaki tedavi yöntemleri semptomatik olup, hastalığın ilerleyişini durdurabilecek ya da yavaşlatabilecek bir yöntem henüz bulunmamaktadır. AH, hem hastaların hem de bakım verenlerinin yaşam kalitelerini bir hayli düşürmektedir. [1,2]

Uzun bir klinik öncesi sürece sahip olan Alzheimer hastalığında, beyinde hücreler arası senil amiloid-beta plakları ve hücre içi hiperfosforile-tau proteininin birikmesiyle oluşan nörofibriler yumaklar görülmektedir. Bu proteinlerin aşırı ekspresyonu, anormal katlanması ve temizlenme mekanizmasındaki bozukluklar, nöron ve sinaps kaybına sebep olmaktadır.[3]

SIRT1, histon deasetilaz III ailesinden, histon ve histon olmayan proteinleri deasetilasyona uğratan bir enzimdir. Nöronal koruma, stres direnci, yaşlanma gibi birçok hücresel süreçte rol alır. Aşırı ekspresyonun ve aktivasyonun, Alzheimer hastalığı modellerinde amiloid-beta peptidinin miktarını azalttığı bulunmuştur. Bununla birlikte diğer çalışmalarda, SIRT1 enzim inhibisyonunun, kognitif fonksiyonlara ve hafızaya olumlu etki yaptığı bulunmuştur.[4,5]

Eksozomlar 40-100 nm boyutunda; protein, RNA, lipid taşıyabilen, tüm vücut sıvılarında bulunan; hücre-hücre iletişimde görevli endozomal kökenli veziküllerdir. Hastalık durumunda taşıdıkları içerik değiştiğinden, biyobelirteç olarak kullanılmalarını hedefleyen çalışmalar hayli fazladır. Alzheimer hastalığında, amiloid beta, tau gibi hastalıkla ilişkili proteinleri taşıdıkları belirlenmiştir.[6-8]

Literatürde SIRT1 inhibitörü ex527'nin *in-vitro* ve *in-vivo* Alzheimer hastalığı modellerinde sağkalım yollarında görevli proteinlere, eksozom miktarı ve

içeriğine etkileriyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, in-vitro amiloid-beta toksisitesi uygulanmış insan nöroblastoma hücrelerinde yapılan SIRT1 inhibisyonun sağkalım yollarına, biyobelirteç adayı olan hücreden salınan eksozom miktarı ve içeriğine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Günümüzde ortalama insan ömrünün uzamasıyla birlikte yaşlanmaya bağlı hastalıkların prevalansı da artmaktadır. Dünya genelinde tüm demans vakalarının yaklaşık %60-80'ini oluşturan Alzheimer hastalığı ise henüz tedavisinin olmaması, dünya nüfusunun yaşlanmasıyla birlikte daha fazla insanı etkilemesi, sosyal ve ekonomik yükünün fazla olması sebebiyle bilimsel araştırmalar için önemli bir konu haline gelmiştir. [1,9]

Alzheimer hastalığı (AH), ilk olarak 1900'lü yılların başlarında Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. [10] AH, yirmi yıla yaklaşan klinik öncesi ve prodromal sürece sahip; yaklaşık 8-10 yıl klinik süreci olan ilerleyici ve geri döndürülemez nitelikte; serebral korteks ve hipokampüste geniş alanları etkileyen; hafıza sorunlarına, kognitif ve davranışsal problemlere yol açan, fatal nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöropatolojik ve nörokimyasal belirtileri arasında nöron ve sinaps kaybı, beyinde atrofi, belirli nörotransmitterlerde azalma, hücre içi nörofibriler yumak (NFY) ve hücreler arası senil amiloid beta plakları bulunmaktadır.[11-18] AH'nin en önemli belirtileri: isimleri ve yeni gerçekleşen olayları hatırlamada zorluk; apati ve depresyon gibi davranışsal semptomlar; ilerleyen evrelerde konuşma, yutma ve yürüme gibi motor fonksiyonlarda bozukluklardır. [19-21]

AH, sporadik (geç başlangıçlı) ve otozomal dominant geçişli (erken başlangıçlı) olmak üzere iki tiptir. Geç başlangıçlı AH'de hastalığın başlaması 80 yaş dolaylarında olur, patofizyolojisinin ana sebebi amiloid-beta (A β) peptidinin aşırı üretimi ve temizlenme mekanizmasındaki bozuklukla birlikte, tau proteininin hiperfosforilasyona uğramasıdır. Erken başlangıçlı AH'nin görülme sıklığı çok düşük olmakla beraber, hastalığın başlama yaşı ortalama 45'tir; *APP* (Amyloid precursor protein), *PSEN1* (Presenilin 1) *PSEN2* (Presenilin 2) genlerinde patojenik mutasyonlar bulunur, bu sebeple amiloid-betanin fazla ya da anormal formda üretilmesi gözlemlenir.[1,11]

Alzheimer hastalığı temelde iki anormal proteinin birikmesiyle oluşur: hücre içi nörofibriler yumakları oluşturan hiperfosforile mikrotübül bağlantılı protein tau ve hücre dışı senil plakları oluşturan amiloid beta. Amiloid beta bir transmembran protein olan APP'nin β -sekretaz ve γ -sekrataz ile art arda kesilmesiyle oluşur.[3,22-25] Amiloid-betanin AH patolojisindeki rolü büyük oranda erken başlangıçlı AH çalışmalarıyla anlaşılmıştır. APP, PSEN1 ve PSEN2 mutasyonları $A\beta_{1-42}$ izoformunun üretiminin ve $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ oranının artmasına neden olur. Ayrıca Down Sendromlu hastalarda ekstra bir kopyası bulunan APP genini taşıyan kromozom 21 de amiloid-beta üretiminin artmasına ve bu bireylerde ortalama 35 yaşlarında AH'ye benzer patolojik özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olur.[11]

Diabetes mellitus, hipertansiyon, obezite, fiziksel aktivite azlığı, depresyon, sigara kullanımı, düşük eğitim seviyesi, metallere ve pestisitlere maruz kalma gibi çevresel faktörler AH'ye sebep olabilecek risk faktörlerindendir. Bu etmenlerin yanında en önemli genetik risk faktörü APOE genindeki polimorfizmdir.[11,15]

Tüm bu sebepler ışığında $A\beta$ peptidi hücre biyolojisinde en çok çalışılan peptitlerden birisi olmuştur. Aynı zamanda amiloid-betanin üretimi, temizlenmesi, toksisitesi, agregasyonu ile ilişkili yüzlerce protein olmasına rağmen bunlardan sadece APP ve PSEN1-2 mutasyonları ve APOE4 polimorfizmi yoğunlukla çalışılanlardır.[22,26]

4.1.1.Epidemiyoloji

2015 yılı dünya Alzheimer Raporu'na göre, dünya genelinde 47,5 milyon Alzheimer hastası yaşamakta, bu sayının 2030 yılına kadar 75,6 milyona, 2050 yılına kadar ise 131,5 milyona çıkacağı öngörülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre Alzheimer hastalığı ölüm sebepleri arasında 7. sırada gelmektedir.[2,27]

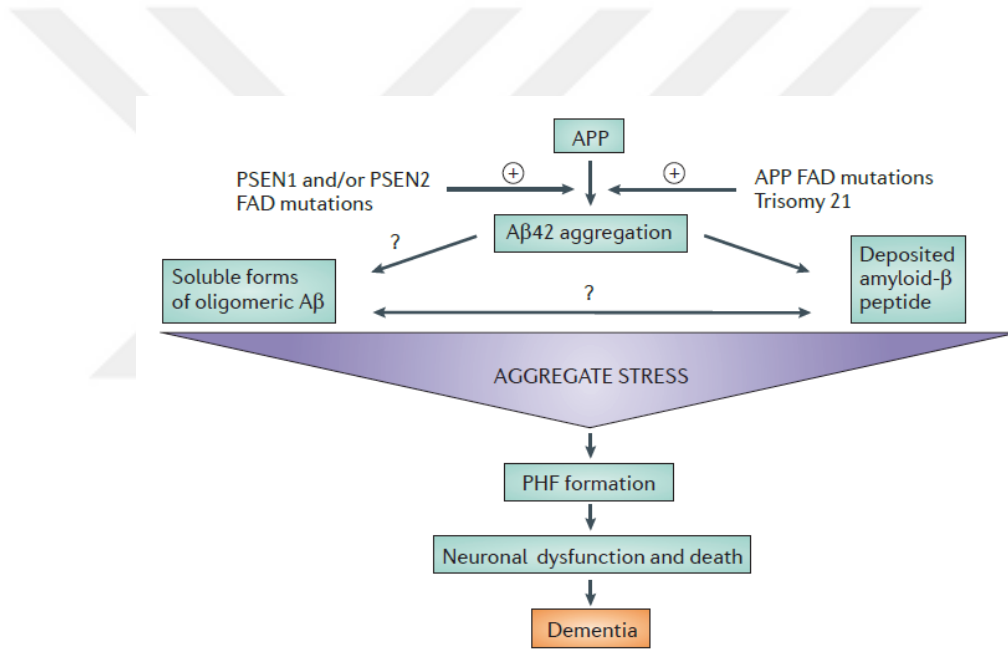
65 yaş üzeri popülasyonda Alzheimer hastalığının insidansı %1-3 arasında, prevalansı ise %10-30 aralığındadır.[11] 65 yaşından sonraki her 5 yılda bir bireylerin AH'ye yakalanma riski ikiye katlanmaktadır.[19] Gelişmekte olan

ülkelerde; Batı Avrupa ve Amerika'ya oranla hastalığın prevelansı daha yüksektir.[28]

4.1.2.Patofizyoloji

4.1.2.1.Amiloid Kaskad Hipotezi

Amiloid kaskad hipotezine göre, AH'nin oluşmasının ana sebebi A β peptid üretimin artması, yanlış katlanması, temizlenmesinin azalması, agregasyonu ve buna bağlı olarak beyinde çözünmez amiloid plaklarının ve nörofibriler yumakların oluşması sonucu, hücre ve sinaps kaybının görülmesidir. Tüm bu süreçler demansa yol açmaktadır.[29-32]



Şekil 4.1 Amiloid kaskad hipotezi. (PHF (paired helical filaments)-çiftli sarmal filamentler) [33]

APP (amyloid precursor protein, amiloid öncülü protein) tip 1 transmembran bir glikoproteindir. Glikozillenmiş N-terminal ektodomaininde büyük metal ve heparin bağlama bölgeleri mevcuttur, membranı bir kez geçer ve kısa bir sitoplazmik C-terminal kuyruğa sahiptir. Endoplasmik retikulumda üretilir, post-translasyonel modifikasyonu burada başlayıp Golgi aygıtında tamamlanır ve hücre membranına gönderilir.[1,9]

APP'nin nörogenez, nöral plastisite ve sinaptik fonksiyonlarda önemli fizyolojik rolleri bulunmaktadır, aynı zamanda hipoksi gibi hücrel stres durumlarında da kalsiyum homeostazına yardımcı olmak gibi fonksiyonları vardır. APP'nin 695-770 aminoasit uzunluğunda birçok izoformu bulunmakta; nöronlarda çoğunlukla APP695, astrosit ve mikroglia da APP751 ve APP770 formunda üretilmektedir.[1,9]

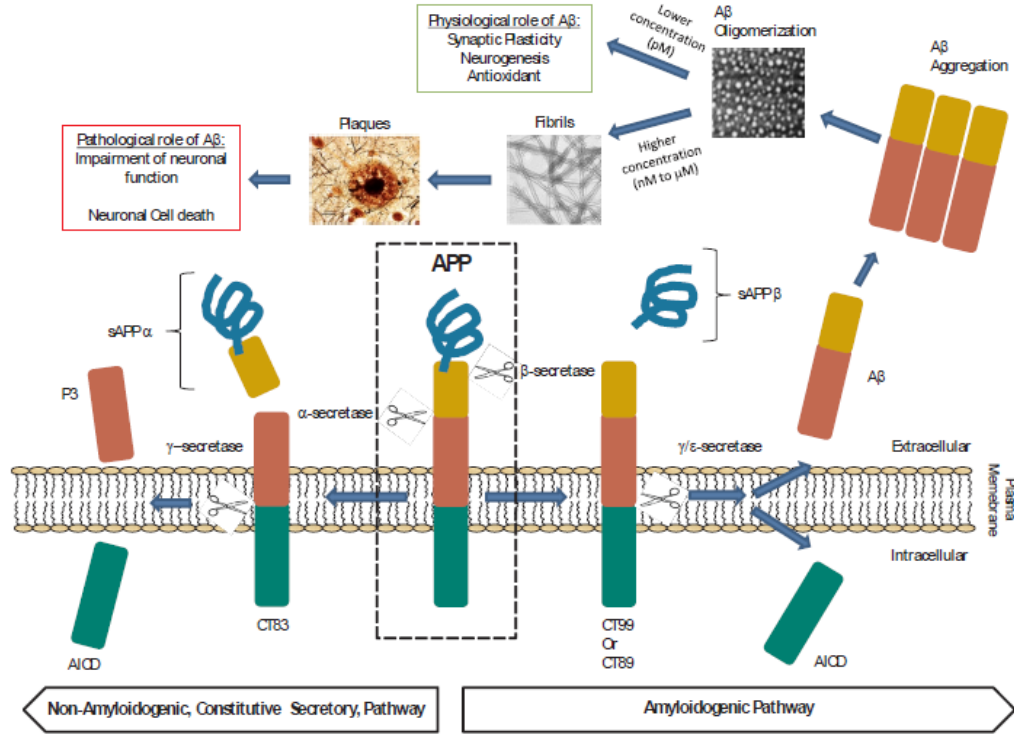
APP hücrelerde amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan formda, iki şekilde kesilebilir. Amiloidojenik olmayan yolla; APP'nin ekstrasellüler domaini metaloproteinaz ailesinden α -sekretaz enzimi ile (ADAM10 bunlardan en önemlisidir) kesilerek, çözünebilir ekstrasellüler (hücre dışı) bir parça (sAPP- α) üretilmesini sağlar. Daha sonra plazma membranında bulunan γ -sekretaz, transmembran olarak bulunan CT83'ü keserek APP hücre içi C-terminal domain (AICD) olarak adlandırılan hücre içi bir APP parçasının üretilmesini sağlar. Amiloidojenik yolla ise, APP önce β -sekretaz (BACE1) ile kesilerek N-terminal sAPP- β ve transmembran CT99 veya CT89 üretilmesini sağlar. Daha sonra Nestrin, Presenilin 1, Presenilin 2 gibi alt birimleri olan γ -sekretaz, CT99'u keserek A β ve AICD üretilmesine sebep olur. AICD'nin daha sonra ϵ -sekretaz ve ζ -sekretaz gibi enzimlerle kesilmesiyle farklı uzunlukta peptitler üretilebilir, eğer AICD çeşitli kaspazlarla kesilirse apoptoz indükleyici CT31 üretilmesine de sebep olabilir.[34-36]

Diğer APP işleme yolları olan δ -sekretaz, meprin- β , η -sekretaz ve kaspaz yolları bulunmakla beraber hastalıkla ilişkisi henüz belirlenmiş değildir.[1]

A β_{1-42} ve A β_{1-40} peptitleri normal fizyolojide pikomolar düzeyde bulunur ve nörogenezde, sinaptik plastisitede, hafıza oluşmasında, metal iyonlarının tutulmasında, kalsiyum homeostazında rol alır. Konsantrasyonun nanomolar ya da mikromolar düzeye çıkmasıyla kritik agregasyon düzeyine ulaşır, böylece nörotoksik sürecin başlamasına sebep olur.[35,37]

Amiloid betanın üretimi normal fizyolojide neprilisin, endotelin dönüştürücü enzim (ECE1 ve ECE2), insülin parçalayan enzim (IDE), plazmin gibi enzimlerle

proteolitik degradasyona uğrama; beyin dışına aktif taşıma ile çıkarılma; çözünmeyen agregatlar halinde depolanma gibi yollarla dengelenmektedir.[9]



Şekil 4.2 APP'nin amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yollarla kesilmesi. [35]

Amiloid-beta monomerleri agregasyona uğrayarak farklı formda oligomerler üretirler, daha sonra bu oligomerler birleşerek protofibrilleri ve amiloid fibrillerini oluştururlar. Amiloid fibriller çözünmez halde bulunur ve plakları oluştururlar, oligomerler ise çözünebilir yapılardır ve toksik etkilerini beyne yaydıkları düşünülmektedir. Ekstrasellüler alanda birçok moleküle, metallere, hücre yüzey reseptörlerine ve hücre membranına bağlanabilir. Aβ'nın reseptörlere bağlanarak, nörotoksik sinyal iletimini başlatıp mitokondriyal disfonksiyon, Endoplazmik Retikulum stresi ve oksidatif stres gibi hücresel defektlere sebep olduğu ileri sürülmektedir.[9,38,39]

Birçok çalışma göstermektedir ki Aβ ve taunun oluşturduğu son yapılar olan plaklar ve yumaklardan ziyade, çözünebilir formları toksisitenin büyük kısmını oluşturmaktadır.[1,17,40,41]

Sinapslar A β 'nın toksisitesinden etkilenen başlıca yapılardır. Alzheimer hastalığındaki kognitif bozukluklar büyük oranda sinaps kaybıyla ilişkilendirilmiştir. [42,43] A β AMPAR (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionic-Acid Receptors) ve NMDAR'a (N-methyl-D-aspartate receptor) bağlanarak uzun süreli potansiyel artışı (LTP, long-term potentiation) olumsuz yönde etkilemektedir.[1,39,44]

A β direkt ve indirekt olarak NMDAR'a bağlanıp, kalsiyum regülasyon bozukluğu, nöron ölümü ve sinaps fonksiyon bozukluğuna sebep olmuştur. Yapılan *in-vitro* çalışmalarda, çözünebilir A β 'nın α 7nAChR'ye (alpha-7 nicotinic receptor) bağlanarak, ERK (extracellular signal-regulated kinase) ve JNK (c-Jun N-terminal kinase) yolları üzerinden tau fosforlanmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda p75NTR'a (neurotrophin receptor) bağlanan A β 'nın rekatif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve oksitadif strese sebep olduğu, ayrıca kaspaz 3 ve 8'i aktifleştirdiği bulunmuştur. [9,38,39]

Amiloid beta birikimi reaktif oksijen türlerinin üretilmesine sebep olarak dolaylı yoldan, toksik okside olmuş protein ve perokside olmuş lipidlerin üretilmesine sebep olur. Oksitlenmiş proteinler membran bütünlüğüne zarar verir, aynı zamanda nöronal fonksiyonlarda rol alan glutamin sentetaz ve kreatin kinaz gibi enzimlerin aktivitelerini de değiştirir. Perokside olmuş lipidler hücrel aktiviteye zarar verecek 4-hidroksi-2-nonenal, 2-propenal gibi birçok toksik madde üretilmesine sebep olur. [9]

Amiloid beta özellikle nörepinefrin ve serotonin salgılayan nöronlarla; nörotransmitter olarak glutamin ve asetilkolin salgılayan nöron tiplerine zarar vermektedir. [9,45,46]

Alzheimer hastaları ve APP transgenik farelerde yapılan çalışmalarda, amiloid-beta birikmelerinin morfolojik ve biyokimyasal olarak denekler arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu farklı amiloid-beta türlerinin, agregasyon kinetiği, proteazlar tarafından parçalanmaya dirençleri, *in-vitro* çalışmalarda plak oluşturma aktivitelerindeki farklılıklar, A β 'nin farklı moleküler alt tipleri olduğunu da düşündürmektedir.[30]

4.1.2.2.Diğer Hipotezler

Birçok sağlıklı yaşlı bireyin beyinde amiloid-beta plaklarının bulunması ve hasta bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmaması; tau, APOE, kolinerjik hipotez, çevresel faktörlerin etkinliği gibi amiloid kaskad hipotezinden farklı hipotezlerin de özellikle ilaç araştırmalarında değerlendirilmeye başlamasına sebep olmuştur.[9,19]

4.1.2.2.1.Alzheimer hastalığı ve tau

Tau insanda kromozom 17q21.31'de bulunan 16 eksonluk *MAPT* geni ile kodlanır. Alternatif kırpmaya ile beyinde 6 izoformda üretilir. Bu izoformlardan 3R ve 4R eşit konsantrasyonlarda üretilir, bu oranın değişmesi APP'nin aksonal taşınması gibi birçok hücresel fonksiyonu etkileyebilir.[1,22,47]

Tau normal fizyolojide dominant olarak aksonlarda, az miktarda da dendritlerde bulunmaktadır. Mikrotübül stabilitesinde, nörogenezde, akson gelişiminde, aksonal taşımada görevlidir.[43,47-49]

MAPT genindeki mutasyon AH'ye sebep olmamakla beraber FTDP-17 (frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17) hastalığına sebep olur, bu hastalıkta nörofibriler yumaklar varken amiloid-beta plakları yoktur. *APP* ve *PSEN1* mutasyonu taşıyan farelerle *MAPT* mutasyonu taşıyan fareler çaprazlandığında amiloid-beta varlığında tau patolojisinin kötüleştiği görülmüştür, bu sebeple amiloid-beta'nın AH patolojisini başlattığı ve tau patolojisinin öncülü olduğu düşünülmektedir. [22,50]

Fizyolojik koşullarda 1 mol tau 2-3 mol fosfat taşırken, patolojik durumlarda bu sayı 7-8'e çıkabilmektedir. Tau da başlangıçta amiloid-beta gibi oligomer oluşturmakta, bu oligomerler sinaptik fonksiyon bozukluğu ve hafıza kaybı ile ilişkilendirilmektedir.[1]

Amiloid-beta agregasyonu kinaz/fosfataz aktivitelerini değiştirerek taunun hiperfosforilasyonuna sebep olmaktadır.[9]

Tau patolojisi sinapslardaki fonksiyon bozukluğunu ve nöron ölümünün temel sebeplerindendir. Normal yaşlanma sürecinde entorhinal kortekste görülen NFY, hipokmapüse ve neo-kortekse geçip amiloid-betayla karşılaşılırsa, birbirlerinin toksik etkilerini arttırırlar. Amiloid-beta kalsiyum homeostazını bozup GSK3- β gibi kinazları indükleyerek taunun hiperfosforillenmesine ve mikrotübüllerden ayrılmasına sebep olabilir, ayrıca kaspaz 3 üzerinden kesilmiş (truncated) formda tau üretilmesine sebep olabilir, taunun bu formu agregasyona daha meyillidir.[22,51]

4.1.2.2.2. Alzheimer hastalığı ve APOE4

APOE (Apolipoprotein E) geni kromozom 19'da bulunur. AH için en önemli genetik risk faktörüdür.

APOE 299 aminoasitlik bir proteindir, insanlarda birbirlerinden 1-2 aminoasit farkı bulunan 3 adet izoformu bulunur: APOE2, APOE3, APOE4. Beyinde ekspresyon seviyesi yüksektir, özellikle astrosit ve mikroglia'da üretilir, bazı durumlarda nöronlarda üretimi de görülür. APOE4 aleli sporadik AH'ye sahip hastaların yaklaşık %50'sinde görülürken, APOE2 alelinin AH riskini azalttığı bulunmuştur.[11,52]

APOE'nin en bilinen fonksiyonu vücutta lipitleri taşımaktır, fakat aynı zamanda amiloid-betanin taşımada da görevlidir. APOE4 alelinin amiloid-betanin sentezini etkilememekle beraber, hayvan modellerinde plak oluşumunu arttırdığı bulunmuştur. APOE biyolojik sıvılarda amiloid betaya bağlı halde, Alzheimer hastalarının beyin dokularında da fibriler amiloid-betayla ilişkili şekilde bulunmuştur.[19]

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda APOE4 ve tau hiperfosforilasyonu arasında bir ilişki bulunmamıştır.[11]

4.1.2.2.3. Alzheimer hastalığı ve kolinerjik hipotez

Kolinerjik hipotez AH patolojisiyle ilgili ilk ortaya atılan teorilerdendir. Şu anda klinikte kullanılmakta olan birçok ilaç da bu hipoteze dayanarak üretilmiştir.

Bu hipoteze göre, AH'de Meynert bazal çekirdeğinde kolinerjik nöron ve dolayısıyla kolinerjik aktivite kaybıyla beraber azalmış asetilkolin sentezi görülmektedir.[9,53]

4.1.2.2.4.Alzheimer hastalığı ve çevresel faktörler

Bir diğer hipoteze göre sigara içmek, enfeksiyon, diyabet, fiziksel ve mental aktivite azlığı, düşük eğitim seviyesi, AH'ye sebep olabilecek önlenabilir risk faktörlerindendir. Bu risk faktörlerinin ortadan kaldırılması AH insidansını %30 oranında azaltabilmektedir.[9,28]

4.1.3.Alzheimer Teşhisi

AH'nin hem prodromal fazda hem de demans fazında klinik teşhisi zordur. Yapılan bir çalışmada klinikte AH teşhisi alan hastaların %35'inin A β PET taramaları negatif sonuç vererek yanlış teşhis aldıkları gözlemlenmiştir.

Amiloid boyası Thioflavin T'nin radyoaktif analogu olan kan beyin bariyerinden geçerek fibriler amiloid-beta'ya bağlanan Pittsburg B komponentinin geliştirilmesi, Alzheimer hastalarında PET yöntemiyle *in-vivo* görüntüleme yapmaya olanak tanımıştır. Bu yöntemle birlikte AH'nin klinik olarak başlamasından yıllar önce amiloid-beta birikmesinin başladığı gözlemlenmiştir.

Şu anda klinikte hem A β PET taraması, hem de BOS'ta (beyin omurilik sıvısı) düşük amiloid-beta ve yüksek p-tau/t-tau seviyelerinin ölçülmesi yöntemleri yardımıyla teşhis konulmaktadır[1,11,48]

4.1.4.Alzheimer Tedavisi

AH'nin hâlihazırdaki tedavileri yalnızca hastalığın semptomlarını hafifletici nitelikte olup, hastalığı tamamen ortadan kaldıracı ya da yavaşlatabilecek bir tedavi henüz bulunmamaktadır.[9,54]

Erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı AH'nin, klinik ve histolojik olarak farklılık arz etmemesi, ailesel AH modellerinde geliştirilen tedavi yaklaşımının sporadik formda da etkili olacağını düşündürmektedir.[1]

Amiloid oligomerizasyonunu engelleyen küçük molekül inhibitörler (small molecule inhibitors: NQTrp, CINQTrp, cuomarin, fuosemid), immünterapi (A β aşısı CAD106), sekretaz inhibitörü (β -sekreataz inhibitörü: MK-8931, CTS21166; γ -sekretaz inhibitörü: semagacestat), α -sekretaz agonisti (AHT-0202) üretimi, A β 'yi parçalayan enzimlerin aşırı ekspresyonu, amiloid kanallarını bloke eden A β blokerlerinin üretimi bu yaklaşımlardan bazılarıdır.[9]

AH'nin tedavisinde çeşitli yaklaşımlarla üretilmiş ve farklı faz çalışmalarında bulunan ilaçlar denenmektedir. Bunlardan solenazumab, gantenerumab, crenezumab gibi monoklonal A β antikorları farklı faz aşamalarına gelmişlerdir. Bunlardan çözünebilir A β 'ya bağlanan solenazumab başarısız olmakla beraber, aducaumab faz 3 çalışmalarına geçmiştir.[1,11]

A β kaskad teorisine dayanarak üretilmiş birçok ilacın başarısız olması, araştırmacıları tau agregasyon inhibitörleri ve anti-tau aşısı gibi ilaç denemelerine yönlendirmiştir. Bunlardan bazıları farklı klinik faz denemelerinde olmakla beraber, GSK3 inhibitörleri gibi bir kısmı da başarısız olmuştur.

Bir diğer yöntem ise terapötik ultrason yöntemidir. APP-mutant farelerde uygulanan yöntem, farklı A β türlerini temizlemiş ve hafıza fonksiyonlarında iyileşmeye sebep olmuştur.[1]

Hâlihazırda kullanılan ilaçlar asetilkolinesteraz inhibitörü (donepezil, rivastigmine, galantamine) ve NMDA reseptör antagonisti (memantin) olmak üzere iki gruptur ve hastalarda bu iki grup ilacın kombinasyonu ile üretilen Namzaric de kullanılmaktadır. [9,11]

4.2.SIRT1

Sirtuinler (silent information regulator 2, SIR2) ilk olarak *S.cerevisiae*'de tanımlanmıştır. Bakterilerden insanlara kadar birçok organizmada korunmuş şekilde bulunmaktadır.[5,55-57]

SIRT1, mayalardaki Sir2 geninin en yakın memeli ortologudur.[58] Memelilerde *SIRT1-7* olmak üzere 7 izoform bulunur.[59,60] *SIRT1* kromozom 10q21.3'te bulunan, 10 ekzon ve 11 introndan oluşan uzun ömürlülük geni diye bilinen bir gendir.[61] *SIRT1* histon ve histon olmayan proteinleri lizin rezidülerinden deasetilasyona uğratan, NAD^+ bağımlı, yüksek oranda korunmuş sirtuin protein ailesinin 7 enziminden en çok çalışılmış olanıdır.[4, 62-68] *SIRT1*'ın deasetilasyon aktivitesi hücre içi $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ ile kontrol edilir. NAD^+ enzim aktivatörü olarak çalışırken, NADH ve nikotinamid enzim inhibitörü gibi davranırlar.[66,69]

SIRT1 histon oktomerinin H1 altbirimindeki lizin 26'yı, H3 alt birimindeki lizin 9'u ve H4 alt birimindeki lizin 16'yı deasetilasyona uğratarak heterokromatin oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca transkripsiyon faktörleri, DNA onarımında görev alan proteinler ve sinyal faktörleri gibi proteinleri de deasetilasyona uğratarak, stres direnci, metabolizma, yaşlanma, inflamasyon, nöronal koruma, lipid homeostazı gibi birçok hücresel süreçte rol alır. [58,69-72] p53, FOXO1, NF- κ B, eNOS, p300, PGC-1 α *SIRT1* substratlarından bazılarıdır.[73-76]

4.2.1.SIRT1 Alzheimer İlişkisi

SIRT1 ekspresyonu beyinde özellikle korteks, hipokampus, beyincik ve hipotalamusta görülür. Yaşlılarda, yüksek yağ içeren beslenme şekline sahip olanlarda ve çeşitli nöropatolojik durumlarda ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir.[4,55]

Yapılan bazı *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda, *SIRT1* enzim aktivasyonunun ve genin aşırı ekspresyona uğramasının α -sekretaz transkripsiyonunu arttırıp amiloidojenik olmayan yolağı aktifleştirerek amiloid-beta peptidinin miktarını azalttığı, nöronal sağ kalımı arttırdığı ve böylece nöroprotektif etki yaptığı ileri sürülmektedir. [55,62-64,69,70,73,77]

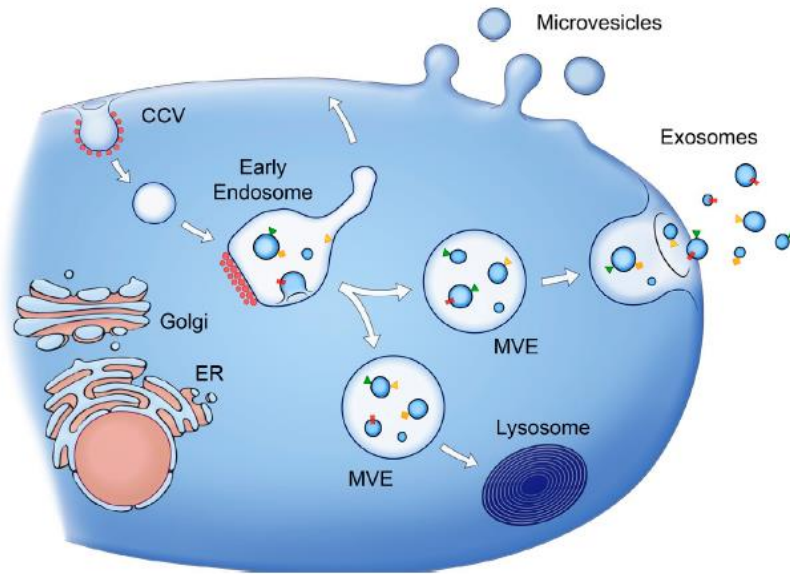
SIRT1'ın aynı zamanda BDNF(brain derived neurotrophic factor) genini aktifleştirerek hafıza ve öğrenme üzerinde olumlu etki yapabileceği öne sürülmektedir.[74]

Fakat aynı zamanda nikotinamid gibi SIRT1 inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda da bu inhibitörün transgenik farelerde kognitif fonksiyonları ve hafızayı olumlu etkilediği ayrıca Thr231'den (Treonin231) fosforlanmış tau miktarını azaltarak başlangıç ve orta düzeydeki AH'de bir iyileşme gösterdiği bulunmuştur.[4,5,73] Bu sebeple SIRT1 enzimi aktivasyonu/inhibisyonu ve AH ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar sürmektedir.

4.3.Eksozom

Eksozomlar ilk defa 1983 yılında, retikülosit olgunlaşmasıyla ilgili bir çalışmada, transferin reseptörünün hücre dışına 50 nm'lik veziküllerle taşındığının bulunmasıyla keşfedilmiş, 1987 yılında da eksozom olarak adlandırılmışlardır.[78,79]

Eksozomlar 40-100 nm boyutunda endozomal kökenli veziküllerdir. Erken endozomların zarlarının invajinasyon yapmasıyla intraluminal vezikülleri (ILV) taşıyan multiveziküler cisimciklere (MVC) dönüşürler. MVC hücre zarıyla birleşerek içerdikleri ILV'yi eksozom olarak hücre dışına bırakırlar.[6-8,80-82]

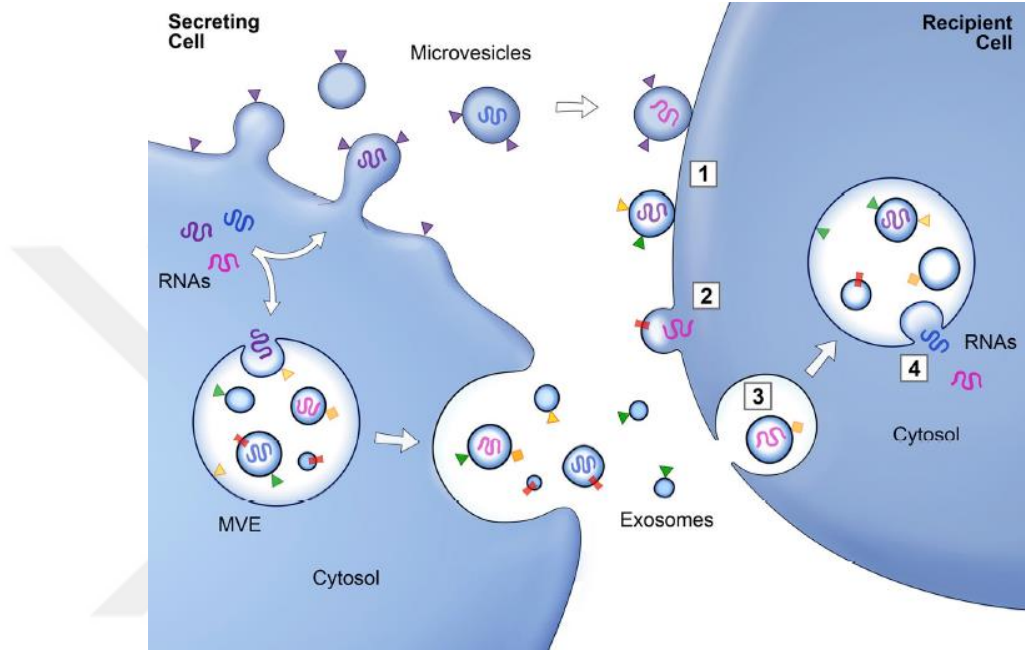


Şekil 4.3 Eksozom biyogenezi [6]

Hücre dışına salınan eksozomlar kan, beyin omurilik sıvısı, tükürük vb. tüm vücut sıvılarında bulunabilir ve hem parakrin hem de endokrin olarak yakın ve uzak

hücreleri etkileyebilirler. Hedef hücreye reseptör-ligand ilişkisiyle, membran kaynaşmasıyla ve endositozla alınabilirler.[6,7,80,83,84]

Eksozomlar endozomal kökenli birçok proteinden zengin olmakla birlikte, mitokondriyal, nüklear, endoplasmik retikulum ya da golgi orijinli proteinleri taşımazlar.[85]



Şekil 4.4 Eksozomların hedef hücreye alınma yöntemleri [6]

Eksozomlar hedef hücreye protein, lipit ve RNA taşıyabilirler. Salındıkları hücrenin sağlıklı olup olmamasına göre taşıdıkları kargo değişmektedir. Normal fizyolojide hücre-hücre iletişimde, hücre içinde istenmeyen maddelerin atılmasında; merkezi sinir sisteminde nöron korunmasında ve gelişiminde, sinir rejenerasyonunda, sinaptik plastisitenin sağlanmasında, immün yanıt oluşumuna yol açmada görevlidir.[7,80,86-88] Hastalık durumunda taşıdıkları kargo değişen eksozomların patolojik proteinlerin yayılmasına sebep olarak hastalığın yayılmasına katkıda bulundukları düşünülmektedir.[89]

4.3.1.Eksozom Alzheimer İlişkisi

Alzheimer hastalığında eksozomların A β , hiperfosforlanmış tau ve hastalıkla ilişkilendirilmiş çeşitli miRNA'ları (mikroRNA) taşıdıkları belirlenmiştir. Ayrıca A β plak bölgelerinde Alix ve Flotillin-1 gibi eksozom belirteç proteinlerine de rastlanmıştır.[7,80,89-97] Tüm bu bilgiler ışığında, eksozomların biyobelirteç olarak, aynı zamanda kan beyin bariyerini geçmeleri ve immün yanıt oluşturmamaları sebebiyle de ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmalarına dair birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır.[7,98,99]



5. METOT VE MATERYAL

5.1. Materyal Listesi

Çalışmalarda kullanılan materyal: SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı (ATCC CRL-2266, ABD); DMEM besiyeri (Biosera, Katalog No: LM-D1099, Fransa); FBS (Biosera, Katalog No: FB-1001H/100, Fransa); Penisilin/Streptomisin (Biosera, Katalog No: LM-A4118/20, Fransa), DPBS (Biosera, Katalog No: LM-S2041/500, Fransa); Eksozomdan arındırılmış FBS (Gibco, Katalog No: A2720803, ABD); Tripsin (Sigma-Aldrich, Katalog No: T4424, Almanya); SIRT1 inhibitörü (Calbiochem, Katalog No: 566322, Almanya); $A\beta_{1-42}$ (Abcam, Katalog No: ab120301, ABD); Proteaz Fosfataz İnhibitör Kokteyli (Cell Signaling, Katalog No: 5872S, ABD); Bis-tris jel (Invitrogen, Katalog No: NP0323BOX, ABD), PVDF membran (Invitrogen, Katalog No: IB401031, ABD); Yürütme tamponu (Invitrogen, Katalog No: NP0005, ABD); LDS örnek tamponu (Invitrogen, Katalog No: NP0007, ABD); İndirgenme ajanı (Invitrogen, Katalog No: NP0009, ABD); Antioksidan (Invitrogen, Katalog No: NP0005, ABD); LDH Sitotoksosite Kiti (Roche, Katalog No: 11644793001, Almanya); LDH Sitotoksosite Kiti (Pierce, Katalog No: 88953, ABD); Eksozom İzolasyon Kiti (Norgen, Katalog No: 60400, Kanada); Toplam Antioksidan Kapasite Ölçüm Kiti (Rel-Assay Diagnostics, Katalog No: RL0017, Türkiye); Toplam Oksidatif Durum Ölçüm Kiti (Rel-Assay Diagnostics, Katalog No: RL0024, Türkiye); Trisma Base (Sigma-Aldrich, Katalog No: T1503, Almanya); NaCl (Merck, katalog No: 1064041000, Almanya); Tween-20 (Sigma-Aldrich, Katalog No: P1379, Almanya); TritonX-100 (Sigma-Aldrich, Katalog No: X100, Almanya); 2-merkaptetanol (Sigma-Aldrich, Katalog No: M3148, Almanya); NH_4OH (Sigma-Aldrich, Katalog No: V000637, Almanya); DMSO (Santa Cruz Biotechnology, Katalog No: sc-358801, ABD); SDS (Sigma-Aldrich, Katalog No: L4509, Almanya); Poli-L-Lizin (Sigma-Aldrich, Katalog No: P6282, Almanya); Yağsız Süt Tozu (ChemCruz, Katalog No: sc-2325, ABD); SIRT1 antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 9475S, USA); p-AKT antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 9271S, USA); t-AKT antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 4685S, USA); p-GSK3- α/β antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 8566S, USA); t-GSK3- α/β antikoru (Cell

Signaling, Katalog No: 5676S, USA); p-mTOR antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 5536S, USA); t-mTOR antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 2983S, USA); p-PTEN antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 9554S, USA); t-PTEN antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 9559S, USA); β -actin antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 3700S, USA); anti-mouse antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 7076S, USA); anti-rabbit antikoru (Cell Signaling, Katalog No: 7074S, USA); ECL solüsyonu (Advansta; Katalog No: K-12045-D20, ABD).

Çalışmalarda kullanılan cihazlar: Sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabini (ThermoScientific, ABD); CO₂ inkübatörü (ThermoScientific, ABD); Tersfaz Işık Mikroskobu (Zeiss, ABD); Soğutmalı Santrifüj (ThermoScientific, ABD); Su Banyosu (Nüve, Türkiye); ELISA okuyucu (Awareness Technology, ABD); Nanofotometre (Implen, Almanya); Western Blot Tankı (Invitrogen, ABD); Güç Kaynağı (Invitrogen, ABD); iBlot Transfer Sistemi (Invitrogen, ABD); Membran Görüntüleme Cihazı (BioRad, ABD); Vorteks (Stuart, İngiltere); Saf Su Cihazı (ELGA, İngiltere); Ultrasaf Su Cihazı (ELGA, İngiltere); Derin Dondurucu (-20°C, Siemens, Almanya); Derin Dondurucu (-80°C, Aucma, Çin); Isıtıcı blok (Techne, İngiltere); Çalkalayıcı (Stuart, İngiltere).

Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler: hemositometre (Marienfiel, Almanya); 25 cm² kültür flaskı (Corning, ABD); 75 cm² kültür flaskı (Corning, ABD); 6 kuyucuklu plaka (Corning, ABD); 96 kuyucuklu mikropilaka (Corning, ABD); 5 ml serolojik pipet (Molgen, Türkiye); 10 ml serolojik pipet (Molgen, Türkiye); 25 ml serolojik pipet (Molgen, Türkiye); Mikropipet seti (Gilson, ABD); 15 ml konik tüp (Isolab, Almanya), 50 ml konik tüp (Isolab, Almanya); 0,5 ml mikrotüp (Nest, Çin), 1,5 ml mikrotüp (Nest, Çin)

5.2.SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürü ve Pasajlanması

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının kültürü için %1 penisilin/streptomisin, %10 FBS içeren DMEM kültür besiyeri kullanıldı.[25,39]

Dondurulmuş, pasaj numarası 14 olan SH-SY5Y hücreleri -80°C'den çıkartılıp 37°C sıcaklıktaki su banyosunda çözdürüldü. Hücreler 15 ml konik tüpte bulunan 10 ml kültür besiyerine alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pelet 5 ml DMEM besiyeri ile çözdürülerek 25 cm² kültür flaskına alındı ve 37°C sıcaklıktaki CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Her üç günde bir besiyeri değiştirildi. %70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerden besiyeri çekildi, flask 3 ml PBS ile yıkandı, hücrelerin üzerine 500 µl tripsin/EDTA eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilerek hücreler kaldırıldı. Kalkan hücreler 5 ml besiyeri ile toplanarak 15 ml konik tüpe alındı ve 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet 5 ml besiyerinde çözüldü. 75 cm² kültür flaskına 14 ml DMEM besiyeri ve 1 ml hücre süspansiyonu eklenerek hücreler 37°C sıcaklıktaki CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

5.3.Amiloid Beta (A β ₁₋₄₂) Toksisite Modelinin Oluşturulması

LDH testi protokolü üreticinin belirttiği şekilde uygulandı. (Roche, Katalog No: 11644793001, Almanya). 96 kuyucuklu mikrolakaya kuyu başına 100 µl içinde 10.000 hücre ekildi. 24 saat sonra üç tekrarlı olacak şekilde hücrelere, kuyucuklardaki son konsantrasyonlar 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM olacak şekilde %1 NH₄OH içerisinde çözülüp 48 saat 37°C'de bekletilen A β ₁₋₄₂ uygulaması yapıldı. Hücreler 24 saat inkübasyon için 37°C sıcaklıktaki CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

24 saat sonra; çalışma solüsyonu (working solution) hazırlandı ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücrelerden 100 µl besiyeri çekilip yeni bir 96 kuyucuklu mikrolakaya aktarıldı. Besiyerlerin üzerine çalışma solüsyonundan 100 µl eklendi 492 nm'de ELISA okuyucu kullanılarak okutma yapıldı.

5.4.İnhibitör (ex527) Dozunun Belirlenmesi

LDH testi üreticinin protokolüne göre uygulandı.(Pierce, Katalog No: 88953, ABD) 96 kuyucuklu mikrolakaya kuyu başına 100 µl içinde 10.000 hücre ekildi. 24

saat sonra üç tekrarlı olacak şekilde hücrelere, kuyucuklardaki son konsantrasyonlar 98 nM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM olacak şekilde madde uygulaması yapıldı. Hücreler 24 saat inkübasyon için 37°C sıcaklıktaki CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

24 saat sonra; kit içeriğindeki substrat karışımı 11,4 ml distile su ile çözüldü, üzerine 0,6 ml tayin tamponu (assay buffer) eklendi ve reaksiyon karışımı hazırlandı. Hücrelerden 50 µl besiyeri çekilip yeni bir 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı. Besiyerlerin üzerine reaksiyon karışımından 50 µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. Inkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µl durdurucu solüsyon eklendi. Primer filtre 492 nm, sekonder filtre 630 nm olacak şekilde ELISA okuyucu kullanılarak okutma yapıldı.

5.5.Amiloid Beta ve SIRT1 İnhibitörü (ex527) Uygulanması

Tablo 5.1 Deney grup listesi

	GRUPLAR	0. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1	Kontrol	Hücre Ekimi			Hücre toplanması
2	Ex527 - Vehikül		DMSO		
3	Aβ- Vehikül		1% NH ₄ OH		
4	Ex527		ex527		
5	Aβ		Aβ		
6	(Ex527 + Aβ)		ex527 + Aβ		
7	Aβ + ex527		Aβ	ex527	
8	Ex527 + Aβ		ex527	Aβ	

6 kuyucuklu plakalar, 1ml Poli-L-Lizin solüsyonu ile kaplanarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 3 kere 1 ml otoklavlı çift distile su ile yıkanarak hücre ekimine hazır hale getirildi.

75 cm² kültür flaskında %70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerden besiyeri çekildi, flask 5 ml PBS ile yıkandı. Hücreler 1,3 ml tripsin/EDTA ile oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilerek kaldırıldı, kalkan hücreler 13 ml besiyeri ile toplanarak konik tüpe alındı. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet 5 ml besiyerinde çözöldü. 10 µl hücre süspansiyonu alınarak hemositometre kullanılarak sayıldı. 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 1,5 ml içinde 200.000 hücre ekildi.

Amiloid beta %1'lik NH₄OH içerisinde çözölerek 48 saat beklemesi için 37°C'ye alındı.

48 saat sonra kuyucuklardan besiyerler çekildi, kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkandı. Hücrelere eksozomu uzaklaştırılmış FBS ile hazırlanan besiyeri (%10 exosom-depleted FBS, %1 penisilin/streptomisin) eklendi. Ex527-vehikül grubuna 4,48 µl DMSO içeren 15 µl besiyeri + DMSO karışımı (DMSO oranı %0.29); Aβ-vehikül grubuna 67.7 µl %1 NH₄OH; kuyucuktaki son konsantrasyon 80 µM [100] olacak şekilde ex527 grubuna 15 µl 8 mM ex527, kuyucuktaki son konsantrasyon 10 µM olacak şekilde Aβ grubuna 67.7 µl 221.5 µM amiloid beta; (ex527 + Aβ) grubuna 15 µl 8mM ex527 ve 67.7 µl 221.5 µM amiloid beta; Aβ + ex527 grubuna 67.7 µl 221.5 µM amiloid beta; ex527 + Aβ grubuna 15 µl 8mM ex527 eklendi.

72 saat sonra: Aβ + ex527 grubuna 15 µl 8mM ex527; ex527 + Aβ grubuna 67.7 µl 221.5 µM amiloid beta eklendi.

96 saat sonra kültür besiyerleri toplandı. Hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı.

5.6. Protein İzolasyonu ve Western Blot

96 saat sonra altı kuyucuklu plakada bulunan hücrelerin besiyerleri toplandı. Kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücreler 2 ml soğuk PBS ile kaldırıldı, konik tüplere alınarak 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı, pelletler %1 proteaz

fosfataz inhibitörü içeren 100 µl lizis tamponu (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH:8), %1 Triton-X-100) ile çözülüp 1.5 ml Eppendorf türine alındı, buz üzerine 25 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 14000 g'de 15 dakika santrifüj edildi, total proteinleri içeren süpernatantlar yeni tüplere alındı. Nanospektrofotometre cihazı kullanılarak çift distile su ile 1:50 dilüsyon yapılan örneklerin protein konsantrasyonları ölçüldü.

Deney gruplarından eşit miktarda protein (20-40 µg) LDS örnek tamponu (LDS sample buffer), indirgenme ajanı (reducing agent) ve çift distile su kullanılarak 10 µl hacime tamamlandı, proteinler 70°C'de 10 dakika inkübe edilerek lineer hale getirildi.

Lineer hale getirilen proteinler %4-12 Bis-Tris jele yüklenerek elektroforez yapılarak proteinler ağırlıklarına göre ayrıldı. iBlot Dry transferring system kullanılarak proteinler jelden poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Membrana, TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris, %0.1 Tween-20) içinde çözölmüş %5 süt tozu kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemi yapıldı (p-mTOR ve t-mTOR için 2 saat). Membranlar %5 süt tozu içeren TBST içinde çözönen primer antikorlar (SIRT1 1:1000; p-AKT 1:1000; t-AKT 1:1000; p-GSK3- α/β 1:1000; ; t-GSK3- α/β ; p-mTOR 1:500; t-mTOR 1:500; p-PTEN 1:1000; t-PTEN 1:1000; β -actin 1:1000) ile 4°C'de 16 saat (p-mTOR ve t-mTOR için 20 saat) çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 3 kere beş dakika TBST ile yıkandı daha sonra 5% süt tozu içeren TBST'de çözönen HRP bağı sekonder antikorlar (anti-rabbit 1:2500; anti-mouse 1:2500) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar 3 kere beş dakika TBST ile yıkandı. ECL HRP substrat kullanılarak membran görüntüleri alındı.[101]

5.7.Eksozom İzolasyonu

96 saat sonunda toplanan besiyerleri hücre debrislerinden kurtulmak için 1000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. 1,1 ml besiyeri yeni mikrotüplere aktarıldı. Üzerlerine kit içeriğinde bulunan ExoC tamponundan 2.75 µl ve 200 µl Slurry E solüsyonu eklendi. Tüpler 10 saniye vortekslenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe

edildi. İnkübasyondan sonra 10 saniye daha vorteks yapıldıktan sonra, tüpler 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet 200 µl ExoR tamponu ile çözülerek 10 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 10 saniye daha vorteks yapıldı ardından 500 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant spin kolonuna (mini-filter spin column) aktararak 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı, elüsyon tüpüne akan eksozomlar -20°C'ye kaldırıldı.

5.8.Eksozom İmmünpresipitasyonu

İzolasyonu tamamlanan eksozomların immünpresipitasyonu üreticinin indirekt immünpresipitasyon protokolüne göre yapıldı. (Millipore, Katalog No: LSKMAGAG10, ABD)

100 µl eksozom ve 2 µl Alix antikoruna 1,5 ml'lik Eppendorf aktarıldı. 4°C'de 16 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Yeni 1,5 ml'lik Eppendorf tüplere 50 µl G-protein manyetik boncuk eklendi. Tüpler manyetik tüplüğe alınarak koruyucu tampon çözeltisi çekildi. Manyetik boncuklar %0.1 Tween-20 içeren 500 µl PBS ile yıkandı.

Bir gün önce inkübasyona koyulan eksozom ve antikor karışımı manyetik boncukları üzerine alınıp karıştırıldı, 10 dakika, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Tüpler manyetik tüplüğe alınarak eksozom-antikor karışımı çekilip atıldı. Manyetik boncuklar 3 kere %0.1 Tween-20 içeren 500 µl PBS ile yıkandı. Boncukların üzerine 19,5 µl otoklavlı çift distile su, 7,5 µl LDS örnek tamponu ve 3 µl indirgeyici ajan eklenerek 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.

5.9.Eksozom Western Blot

İmmünpresipitasyonu tamamlanarak LDS örnek tamponu ve indirgeyici ajan ile muamale edilen eksozomlar %4-12 Bis-Tris jele yüklendi ve elektroforez yapıldı.

iBlot Dry transferring system kullanılarak proteinler jelden poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Membrana, TBST içinde çözülmüş %5 süt

tozu kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemi yapıldı. Membranlar %5 süt tozu içeren TBST içinde çözünen Tsg-101 (1:500) antikoru ile 4°C'de 16 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 3 kere beş dakika TBST ile yıkandı daha sonra 5% süt tozu içeren TBST'de çözünen HRP bağlı sekonder antikor (anti-mouse 1:2000) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar 3 kere beş dakika TBST ile yıkandı. ECL HRP substrat kullanılarak membran görüntüleri alındı.

5.10.Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) analizi

96 saat sonunda hücrelerden toplanan besiyerleri ile TAK ve TOD analizleri yapıldı. Her grup için 3 tekrarlı olarak çalışıldı.

TAK analizi için; kit içeriğinde bulunan tayin tamponundan (assay buffer-Reagent 1) 96 kuyucuklu mikrolaka kuyucuklarına 100 µl eklendi. Üzerlerine 6 µl standart 1 (distile su); standart 2 (1 mmol TroloxEquiv/L); ya da 6 µl besiyeri eklendi. 630 nm'de ELISA okuyucu kullanılarak okutma yapıldı. Tüm kuyucuklara 15 µl ABST radikal solüsyonu (Reagent 2) eklendi, oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra 630 nm'de ikinci okutma yapıldı.

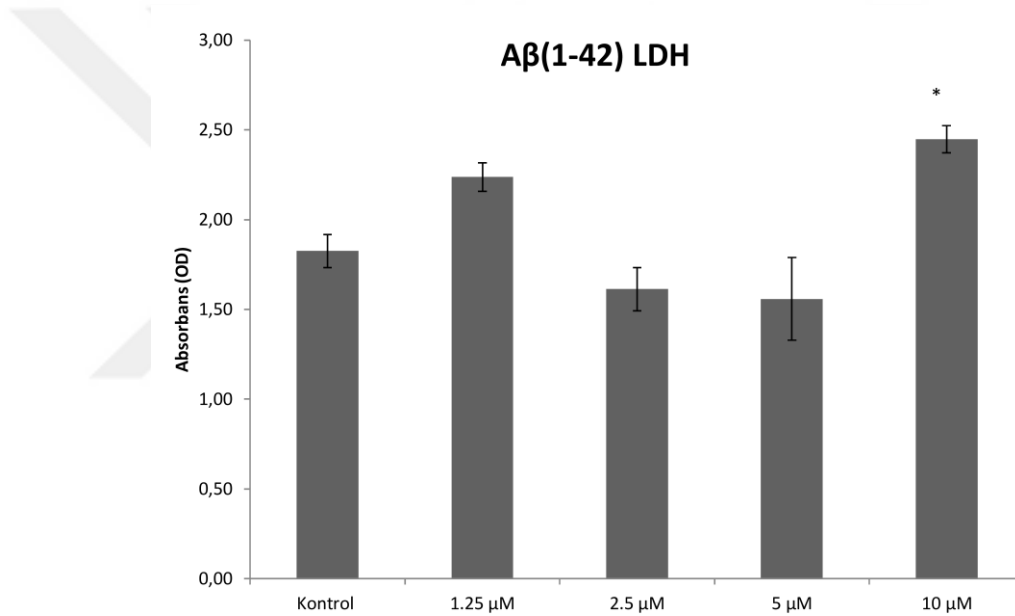
TOD analizi için; standart 2 (stock stabilized standard solution, 800 mM H₂O₂) solüsyonundan 50 µl alınarak 10 ml distile su ile karıştırıldı. Bu yeni karışımdan da 50 µl alınarak 10 ml distile su ile karıştırılarak standart çalışma solüsyonu (working standard solution) hazırlandı. Tüm kuyucuklara 100 µl tayin tamponu eklendi. Üzerlerine 15 ul standart 1; standart çalışma solüsyonu ya da besiyeri eklendi. 540 nm'de birinci okutma yapıldı. Tüm kuyucuklara 5 µl prokromojen solüsyonu (Reagent 2-prochromogen solution) eklendi, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 540 nm'de ikinci okutma yapıldı.

6. BULGULAR

6.1.Amiloid Beta ($A\beta_{1-42}$) Toksisite Modeli LDH Sonuçları

SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde etkili toksik ($A\beta_{1-42}$) dozunun belirlenmesi için yapılan LDH sitotoksisite testinin sonuçları Şekil 6.1’de verilmiştir.

Kontrol grubuna göre, 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonlarda absorbans değeri azalırken; 1,25 μ M konsantrasyonda anlamlı düzeyde olmayan bir artış gözlemlenmiştir. 10 μ M konsantrasyon değerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür.

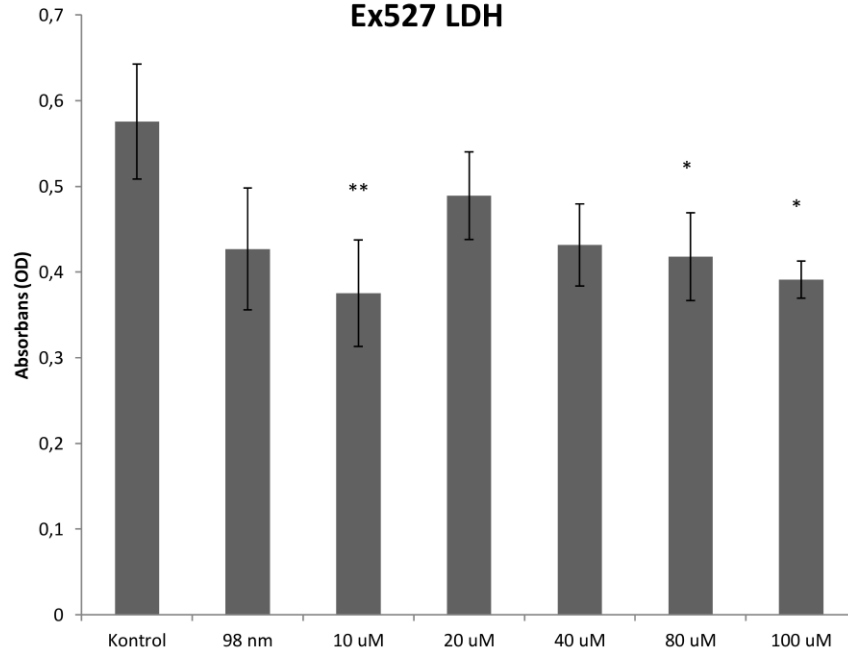


Şekil 6.1 1,25; 2,5; 5; ve 10 μ M $A\beta_{1-42}$ uygulaması yapılan SHSY-5Y hücrelerinin LDH sonuçları (kontrole göre * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; One-Way ANOVA, Tukey test)

6.2.İnhibitör (ex527) LDH Sitotoksisite Sonuçları

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde toksik olmayan inhibitör (ex527) dozunun belirlenmesi için yapılan LDH sitotoksisite testinin sonuçları Şekil 6.2’de verilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere tüm konsantrasyonlarda absorbans değeri kontrole göre azalmış ve inhibitör sitotoksik bir etki göstermemiştir. Tek yönlü

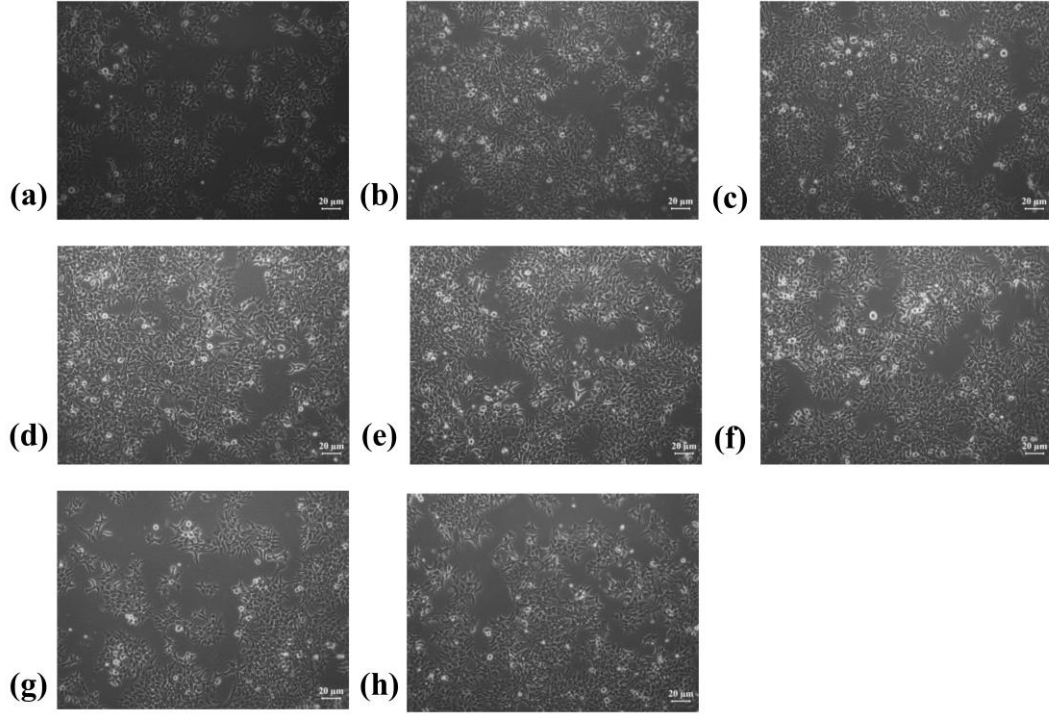
ANOVA testi ile gruplar arası anlamlı farklılıklar hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre 10 μ M, 80 μ M ve 100 μ M gruplarında anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir.



Şekil 6.2 98 nm, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M ex527 uygulaması yapılan SHSY-5Y hücrelerinin LDH sonuçları (kontrole göre * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; One-Way ANOVA, Tukey test)

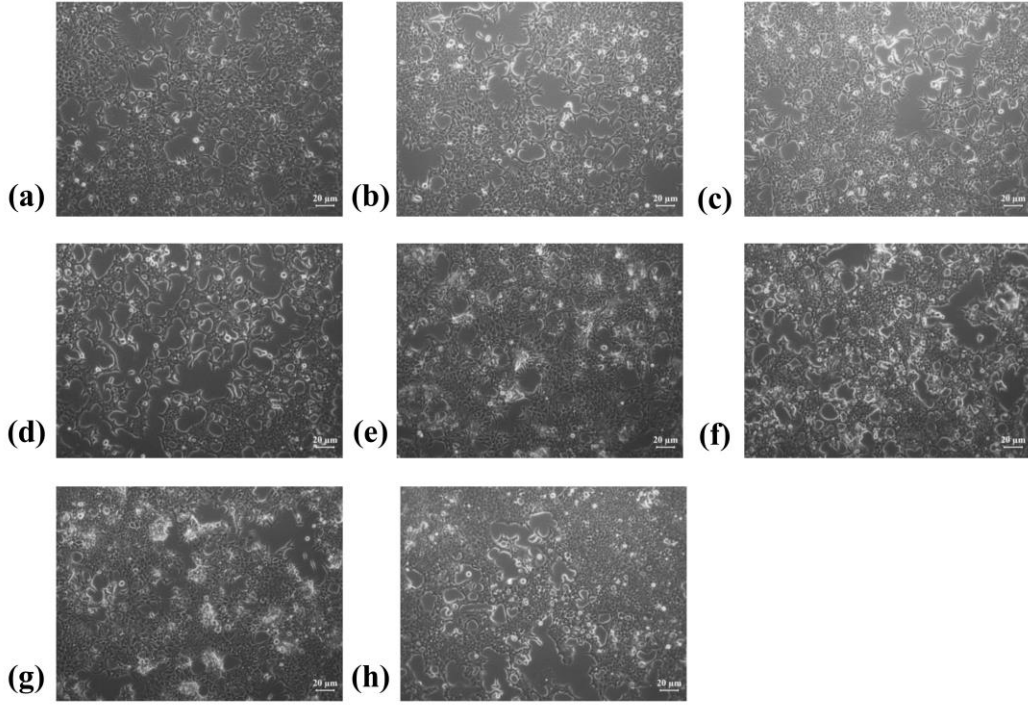
6.3. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulaması Yapılan SH-SY5Y Hücrelerinin Kültür Sonuçları

Hücre ekiminden 48 saat sonra amiloid beta ve inhibitör verilmeden önce ters faz mikroskobu kullanılarak 10x objektif ile hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 6.3'te görüldüğü gibi tüm gruplarda hücre morfolojileri aynıdır.



Şekil 6.3 SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri: hücre ekiminden 48 saat sonra; amiloid beta ve inhibitör uygulamasından önce. **a) kontrol**; **b) Ex527-vehikül** [DMSO, 48.saat]; **c) A β -vehikül** [%1NH₄OH, 48.saat]; **d) Ex527** (80uM, 48.saat); **e) amiloid beta** (10 uM, 48.saat); **f)(ex527 + amiloid beta)** [ex527 (80 uM) + amiloid beta (10 uM); 48.saat]; **g) amiloid beta + ex527** [amiloid beta (10 uM, 48.saat) + ex527 (80 uM; 72.saat)]; **h) ex527 + amiloid beta** [ex527 (80 uM, 48.saat)+ amiloid beta (10 uM, 72.saat)]. (Zeiss Primovert inverted microscope, ABD; 10x objektif)

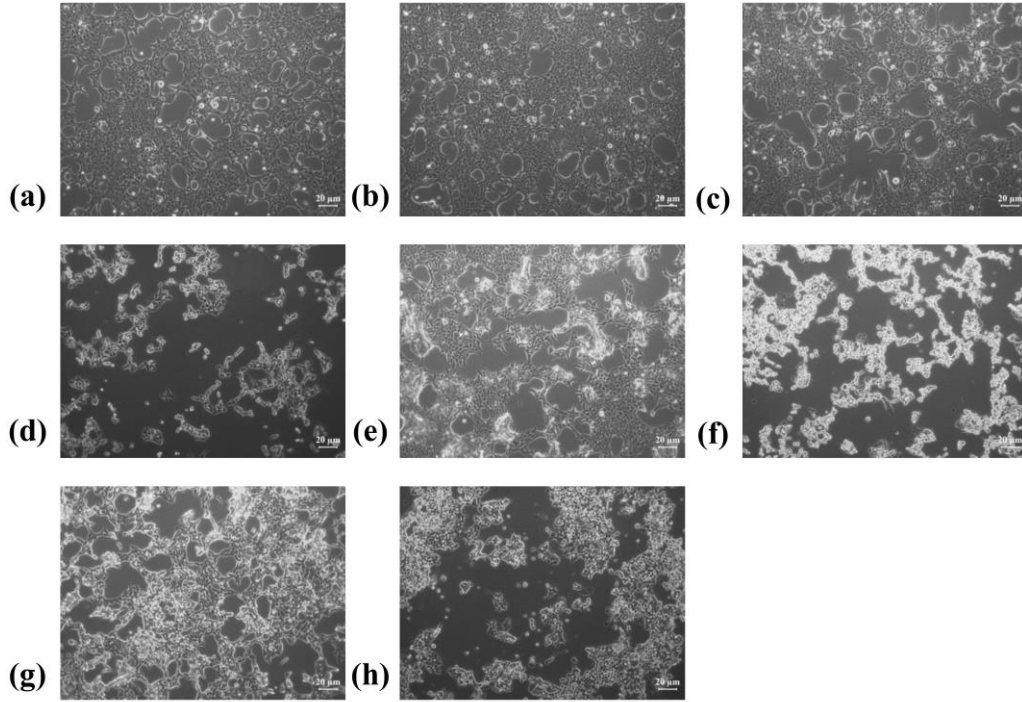
Hücre ekiminden 72 saat sonra, tekrar madde eklenmeden önce hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 6.4'te görüldüğü üzere inhibitör uygulaması yapılan gruplarda hücre gövdelerinde küçülme gözlemlenmiştir.



Şekil 6.4 SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri: hücre ekiminden 72 saat sonra. **a) kontrol;** **b) *Ex527-vehikül*** [DMSO, 48.saat]; **c) *Aβ-vehikül*** [%1NH₄OH, 48.saat]; **d) *Ex527*** (80uM, 48.saat); **e) *amiloid beta*** (10 uM, 48.saat); **f) (*ex527* + *amiloid beta*)** [ex527 (80 uM) + amiloid beta (10 uM); 48.saat]; **g) *amiloid beta* + *ex527*** [amiloid beta (10 uM, 48.saat) + ex527 (80 uM; 72.saat)]; **h) *ex527* + *amiloid beta*** [ex527 (80 uM, 48.saat) + amiloid beta (10 uM, 72.saat)]. (Zeiss Primovert inverted microscope, ABD; 10x objektif)

Hücre ekiminden 96 saat sonra, hücreler toplanıp total protein izolasyonu yapılmadan önce hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

İnhibitör verilen gruplarda hücre gövdelerinin daha da küçüldüğü, amiloid beta verilen hücrelerde hücre ölümüne bağlı olarak yüzen hücreler olduğu gözlemlenmiştir



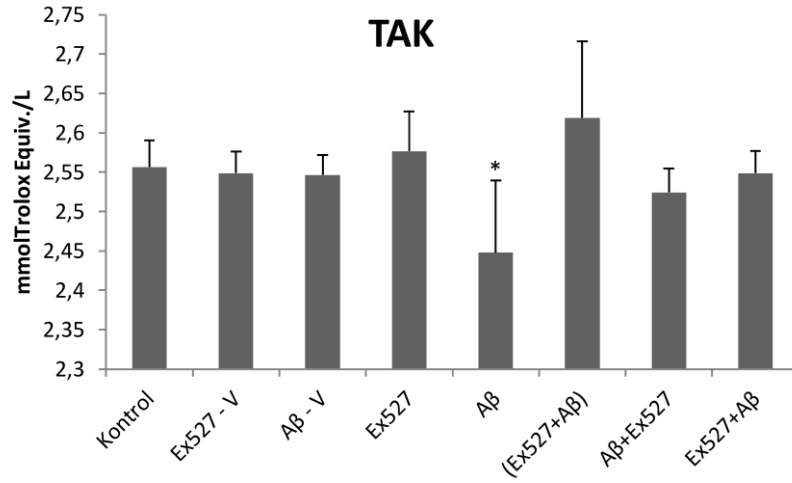
Şekil 6.5 SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri: hücre ekiminden 96 saat sonra; hücre toplanmasından önce **a) kontrol**; **b) Ex527-vehikül** [DMSO, 48.saat]; **c) A β -vehikül** [%1NH₄OH, 48.saat]; **d) Ex527** (80uM, 48.saat); **e) amiloid beta** (10 uM, 48.saat); **f)(ex527 + amiloid beta)** [ex527 (80 uM) + amiloid beta (10 uM); 48.saat]; **g) amiloid beta + ex527** [amiloid beta (10 uM, 48.saat) + ex527 (80 uM; 72.saat)]; **h) ex527 + amiloid beta** [ex527 (80 uM, 48.saat) + amiloid beta (10 uM, 72.saat)]. (Zeiss Primovert inverted microscope, ABD; 10x objektif)

6.4. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulaması Yapılan SHSY-5Y Hücrelerinin TAK/TOD/OSI Sonuçları

Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SHSY-5Y hücre besiyerlerinden yapılan toplam antioksidan kapasite, toplam oksidatif durum ve oksidatif stres indeks grafikleri Şekil 6.6, Şekil 6.7 ve Şekil 6.8’de verilmiştir.

Sonuçlar Tek Yönlü ANOVA (LSD) testi ile analiz edilmiştir.

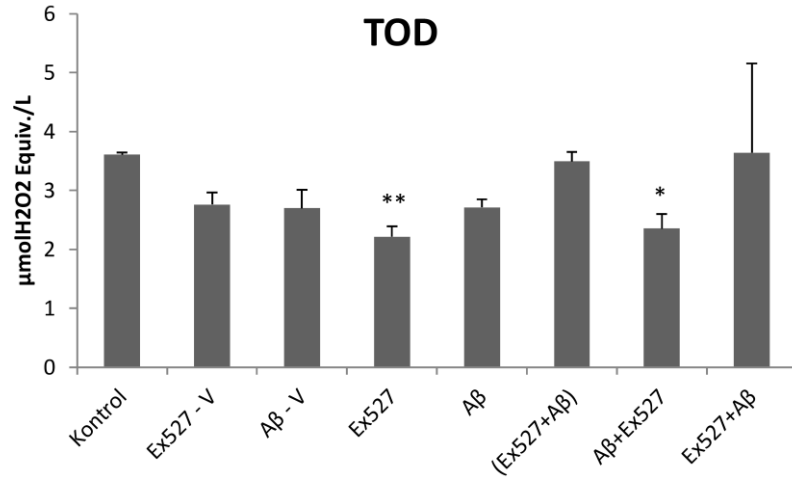
Total antioksidan kapasite grupları incelendiğinde, kontrol grubuna göre amiloid beta grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür. (Şekil 6.6)



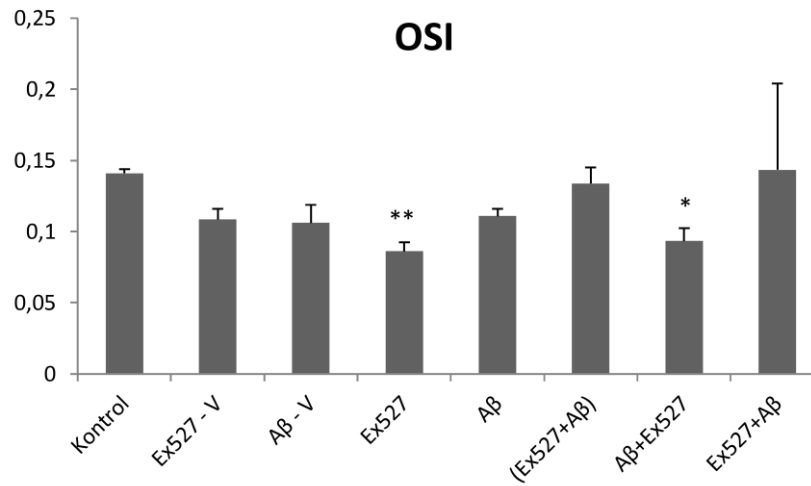
Şekil 6.6 Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin besiyerlerinde toplam antioksidan kapasite ölçümü sonuçları (kontrol grubuna göre *p<0.05; One-way ANOVA, LSD test)

Toplam oksidatif durum sonuçlarında ex527 ve amiloid beta + ex527 gruplarında anlamlı azalmalar görülmüştür. (Şekil 6.7)

Gruplar arası oksidatif stres indeksleri karşılaştırıldığında, kontrole oranla ex527 ve amiloid beta + ex527 gruplarında anlamlı seviyede azalmalar gözlemlenmiştir. (Şekil 6.8)



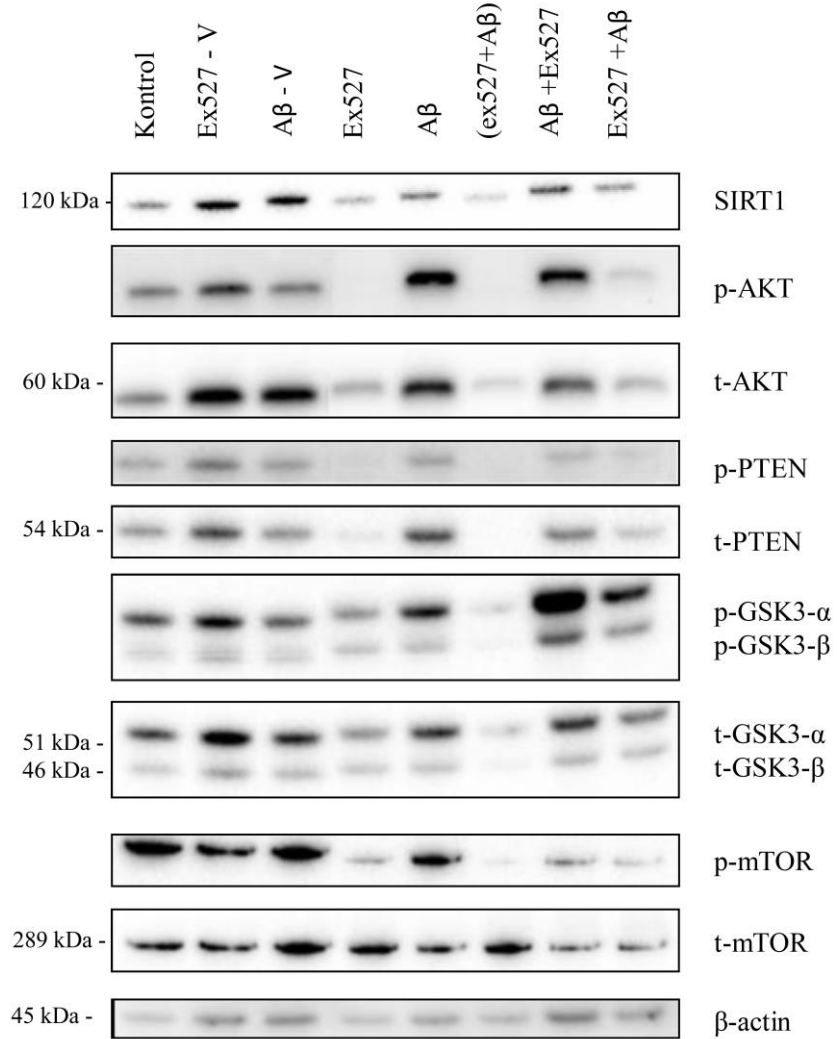
Şekil 6.7 Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin besiyerlerinde toplam oksidatif durum ölçümü sonuçları (kontrol grubuna göre *p<0.05, **p<0.01; One-way ANOVA, LSD test)



Şekil 6.8 Amiloid beta/inhibitör uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinin besiyerlerinde oksidatif stres indeksi sonuçları (kontrol grubuna göre *p<0.05, **p<0.01; One-way ANOVA, LSD test)

6.5. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulanması Yapılan SH-SY5Y Hücre Lizatlarının Western Blot Sonuçları

SH-SY5Y hücrelerine amiloid beta/inhibitör uygulanması sonucu elde edilen western blot membran görüntüleri ve grafikleri Şekil 6.9 ve Şekil 6.10'da verilmiştir.



Şekil 6.9 Amiloid beta/inhibitör uygulanan hücrelerin reprezentatif western blot membran görüntüleri sırasıyla: SIRT1, p-AKT, t-AKT, p-PTEN, t-PTEN, p-GSK3-α, p-GSK3-β, t-GSK3-α, t-GSK3-β, p-mTOR, t-mTOR, β-actin (V: vehikül)

Total protein miktarları β-aktin miktarlarına göre, fosfo protein miktarları total protein miktarlarına göre normalize edilmiştir. Bant yoğunlukları Image J

programı ile analiz edilmiş ve istatistikleri Tek Yönlü ANOVA (Tukey) testi ile yapılmıştır.

β -aktine göre normalize edilen SIRT1 protein miktarlarında kontrole göre Ex527-vehikül ve $A\beta$ + Ex527 gruplarında anlamlı artış; (Ex527+ $A\beta$) grubunda anlamlı artış gözlemlenmiştir. (Şekil 6.10a)

β -aktine göre normalize edilen total AKT miktarlarında kontrol grubuna oranla: Ex527-vehikül, $A\beta$ -vehikül, $A\beta$, $A\beta$ + ex527 gruplarında anlamlı artış gözlemlenmiştir. (Şekil 6.10b)

Total AKT'ye göre normalize edilen fosfo AKT miktarlarında kontrol grubuna göre: Ex527-vehikül, $A\beta$ -vehikül, ex527, (ex527 + $A\beta$), ex527 + $A\beta$ gruplarında anlamlı azalma görülürken; $A\beta$ + ex527 grubunda anlamlı artış belirlenmiştir. (Şekil 6.10c)

β -aktin miktarlarına göre normalize edilen total PTEN seviyelerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında: $A\beta$ -vehikül, ex527, (ex527 + $A\beta$), $A\beta$ + ex527 ve ex527 + $A\beta$ gruplarında anlamlı seviyede azalış görülmüştür. (Şekil 6.10d)

Total PTEN miktarına göre normalize edilen fosfo PTEN protein miktarında kontrol grubuna göre: (ex527 + $A\beta$) grubunda anlamlı seviyede artış görülmesine karşın; $A\beta$, $A\beta$ + ex527 ve ex527 + $A\beta$ gruplarında anlamlı düzeyde azalış gözlemlenmiştir. (Şekil 6.10e)

β -aktine göre normalize edilen total GSK3- α miktarları analiz edildiğinde kontrol grubuyla kıyaslandığında $A\beta$ -vehikül ve (ex527 + $A\beta$) gruplarında anlamlı azalma görülmüştür. (Şekil 6.10f)

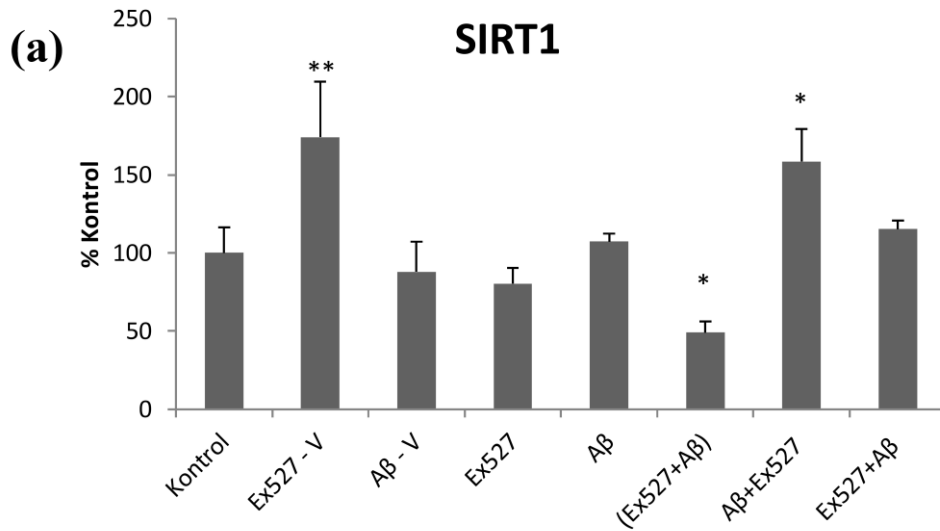
Total GSK3- α 'ya göre normalize edilen fosfo GSK3- α miktarlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, (ex527 + $A\beta$) grubunda anlamlı azalma görülürken; $A\beta$ + ex527 ve ex527 + $A\beta$ gruplarında anlamlı artış gözlemlenmiştir. (Şekil 6.10g)

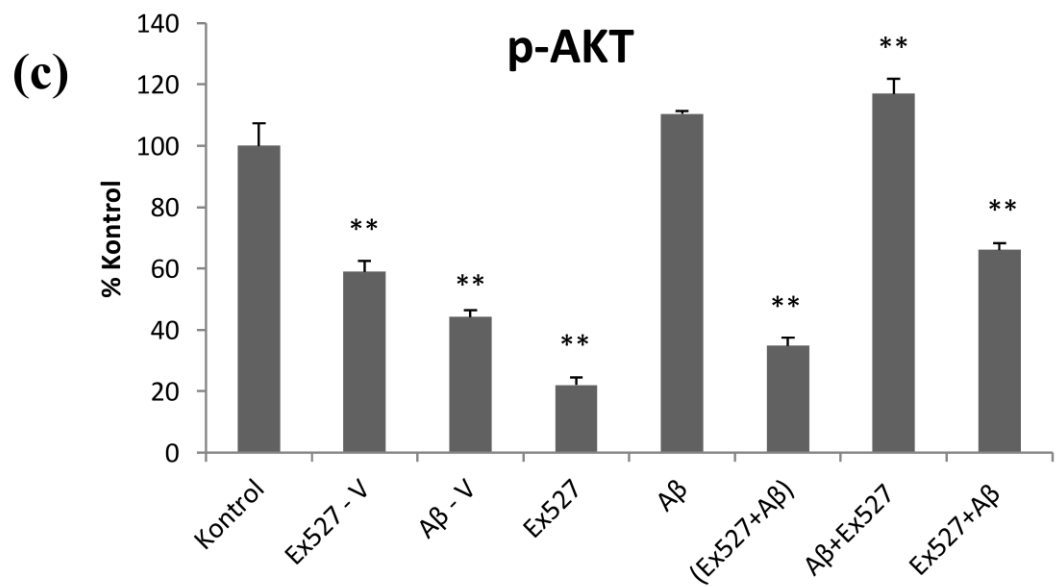
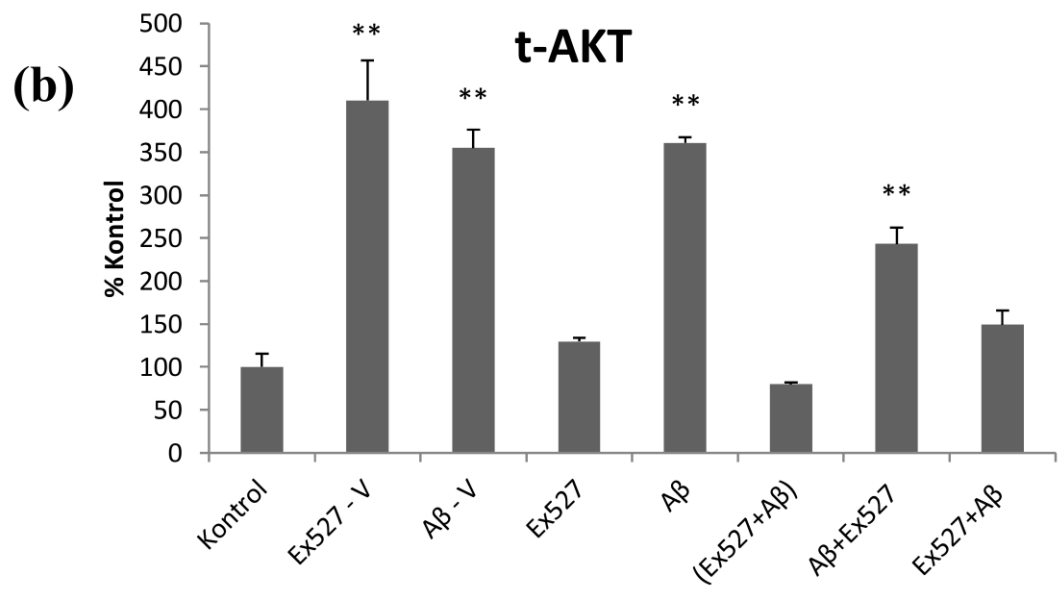
β -aktine göre normalize edilen total GSK3- β miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ex527 ve ex527 + $A\beta$ gruplarında anlamlı düzeyde artma; (ex527 + $A\beta$) grubunda ise anlamlı seviyede azalma tespit edilmiştir. (Şekil 6.10h)

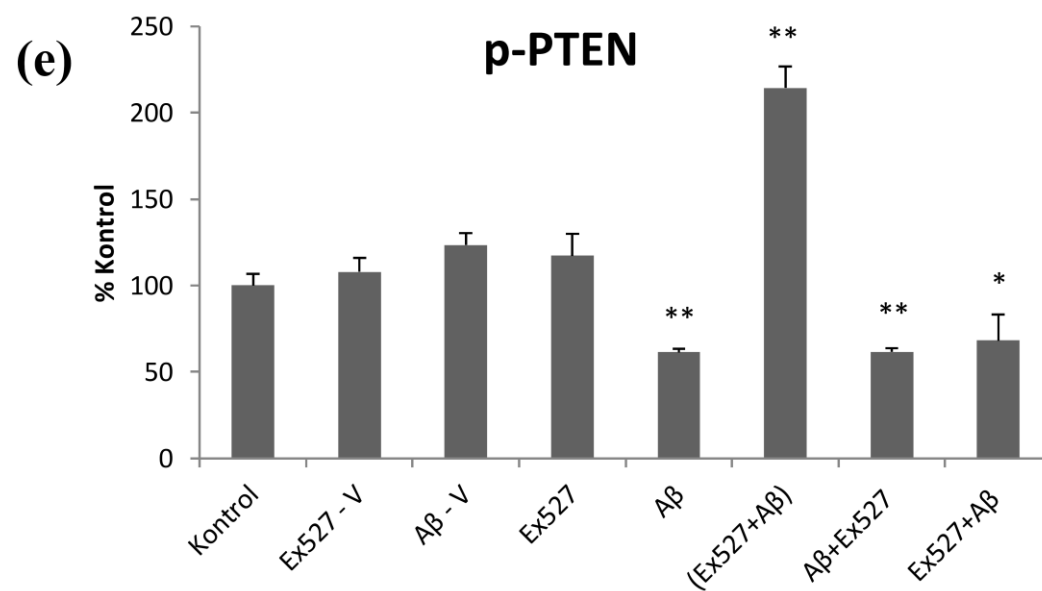
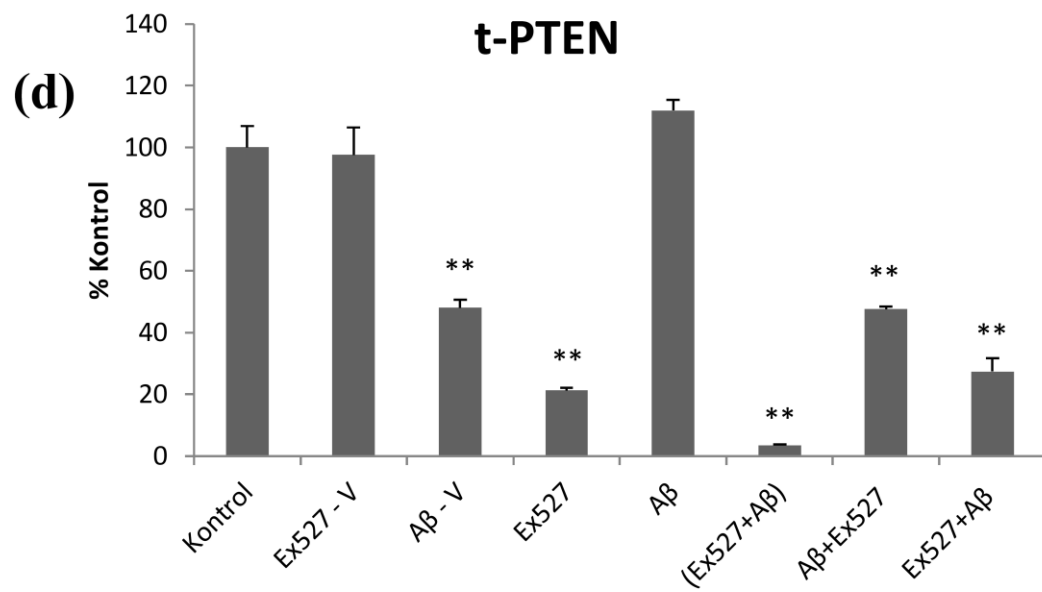
Total GSK3- β 'ya göre normalize edilen fosfo GSK3- β protein miktarlarında kontrol grubuna oranla A β + ex572 ve ex527 + A β gruplarında anlamlı seviyede protein artışı belirlenmiştir. (Şekil 6.10i)

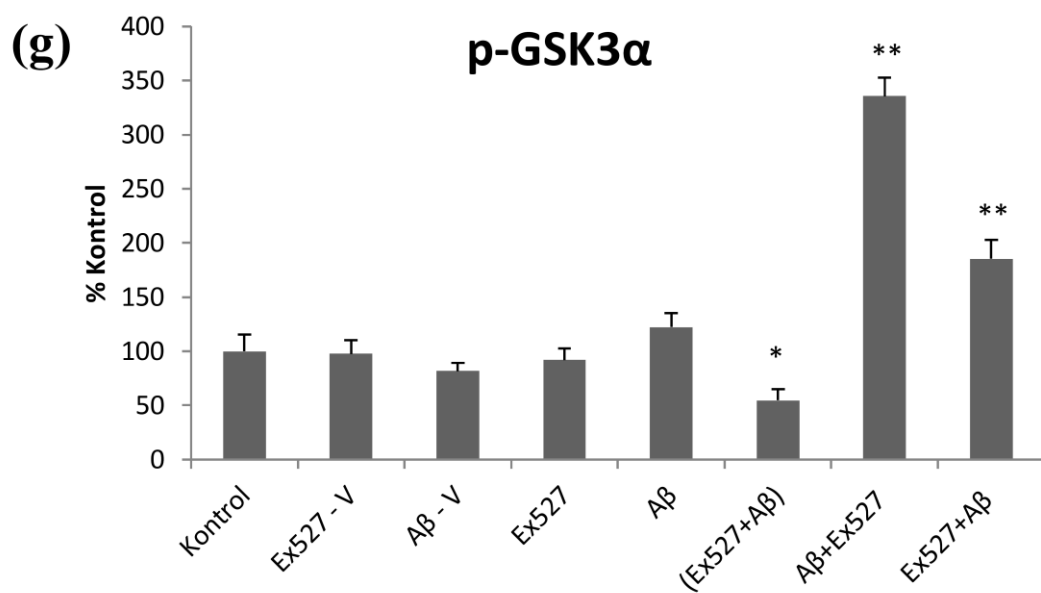
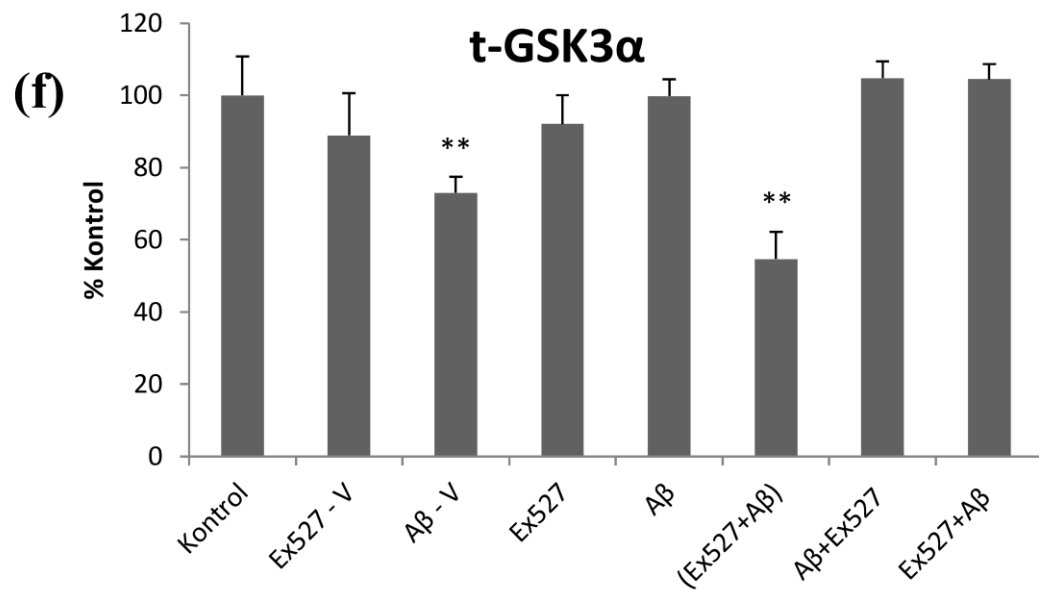
β -aktin protein seviyesine göre normalize edilen total mTOR'da kontrol grubuna göre: A β -vehikül grubunda anlamlı artış; A β + ex527 grubunda anlamlı seviyede azalış belirlenmiştir. (Şekil 6.10j)

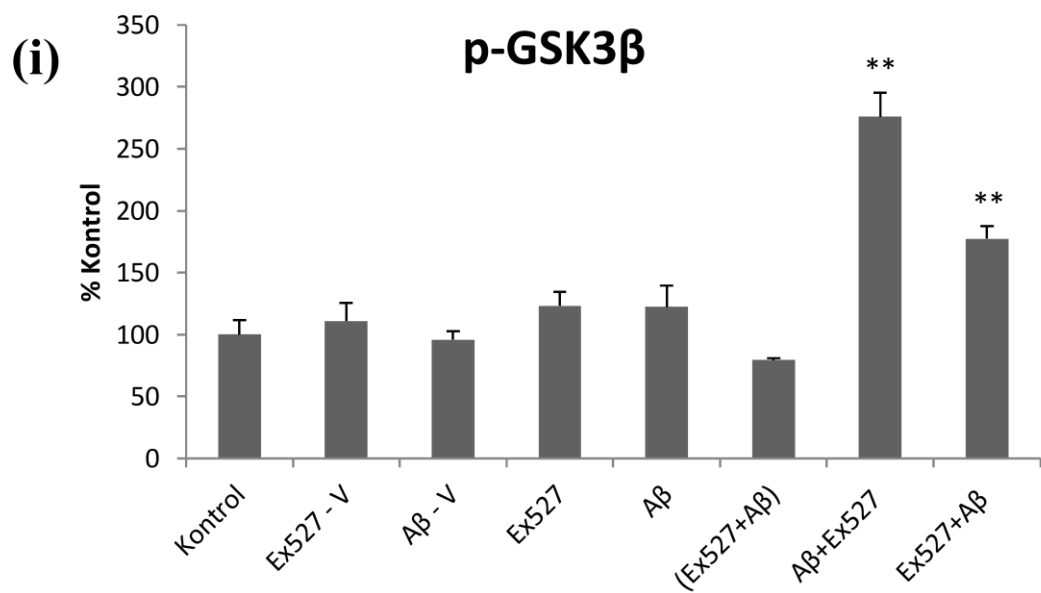
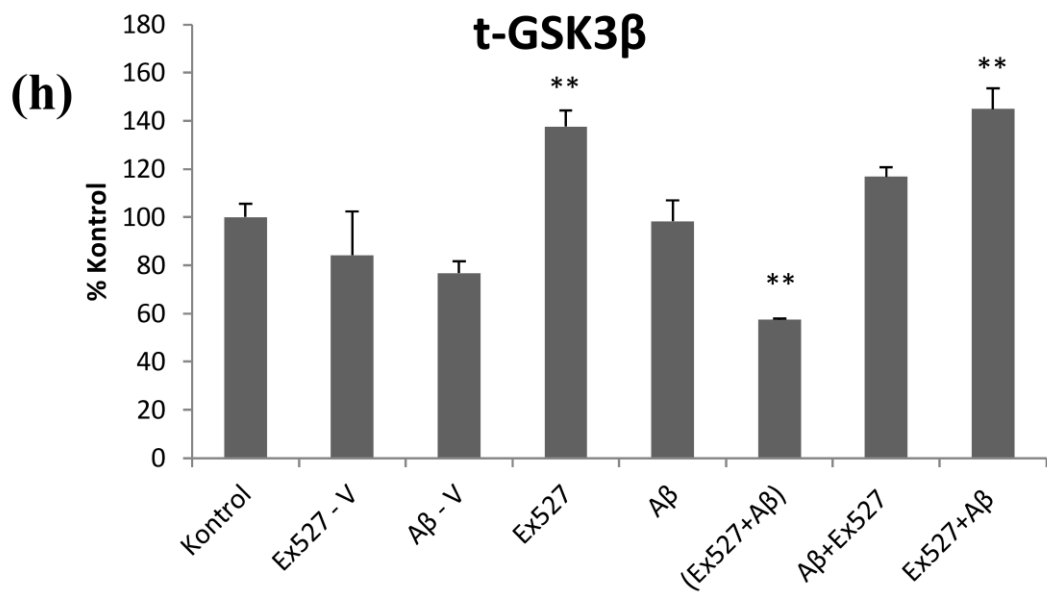
Total mTOR seviyesine göre normalize edilen fosfo mTOR seviyelerinde kontrol ile kıyaslandığında Ex527-vehikül, A β -vehikül, ex527, (ex527 + A β), A β + ex527 ve ex527 + A β gruplarında anlamlı seviyede protein miktarında azalma görülmüştür. (Şekil 6.10k)

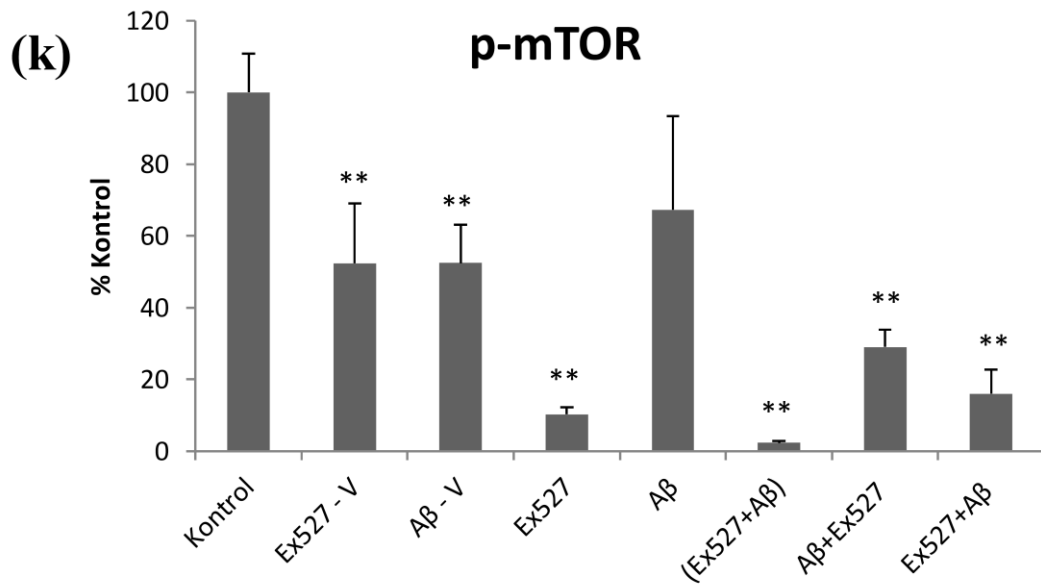
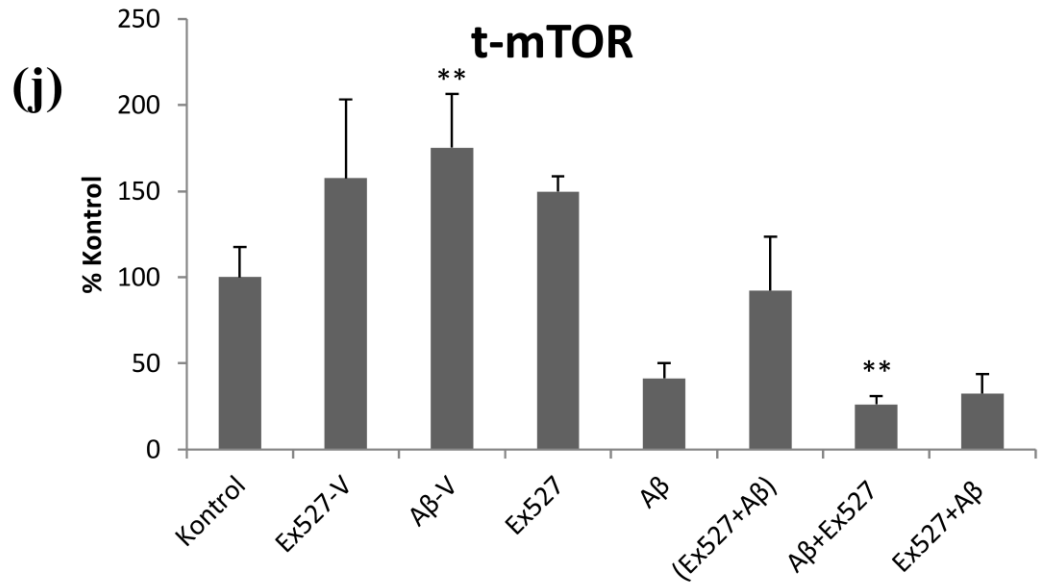








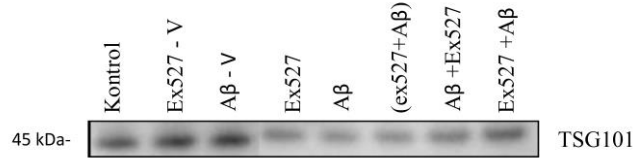




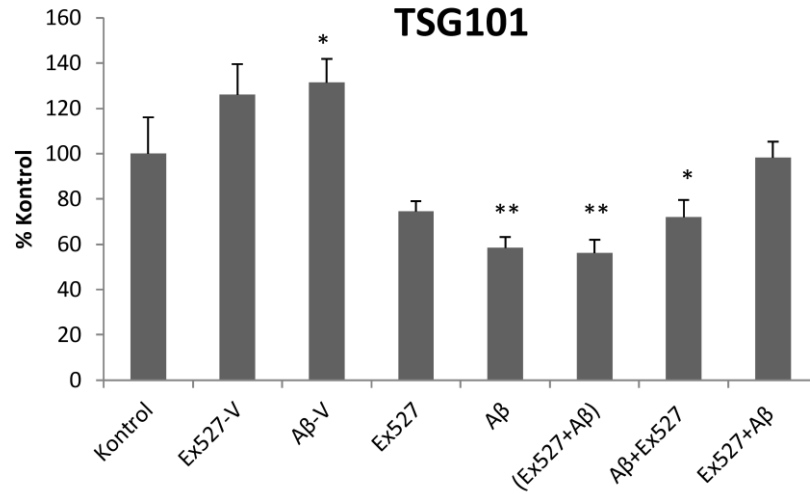
Şekil 6.10 Amiloid beta/inhibitör (ex527) uygulanan grupların western blot sonuç grafikleri: a) SIRT1, b) t-AKT, c) p-AKT, d) t-PTEN, e) p-PTEN f) t-GSK3 α g) p-GSK3 α , h) t-GSK3 β , i) p-GSK3 β , j) t-mTOR, k) p-mTOR (kontrol grubuna göre *p<0.05, **p<0.01; One-Way ANOVA, Tukey test)

6.6. Amiloid Beta/İnhibitör (ex527) Uygulanması Yapılan SH-SY5Y Hücrelerinden Elde Edilen Eksozomların Western Blot Sonuçları

SH-SY5Y hücrelerine amiloid beta/inhibitör uygulanması sonucu elde edilen eksozomlarla yapılan western blot membran görüntüsü sonucu ve grafiği Şekil 6.11 ve Şekil 6.12’de verilmiştir.



Şekil 6.11 Amiloid beta/inhibitör uygulanan hücrelerden elde edilen eksozomların reprezentatif western blot membran görüntüsü



Şekil 6.12 Amiloid beta/inhibitör (ex527) uygulanan SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen eksozomların western blot sonuç grafiği (kontrol grubuna göre *p<0.05, **p<0.01; One-Way ANOVA, Tukey test)

Şekil 6.12’de görüldüğü gibi, kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada Aβ-vehikül grubunda anlamlı düzeyde TSG101 artışı gözlemlenirken; Aβ, (ex527 + Aβ) ve Aβ +ex527 gruplarında anlamlı düzeyde azalma belirlenmiştir.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alzheimer hastalığı, insan ömrünün uzamasıyla birlikte gittikçe daha fazla insanı etkileyen, fatal nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya genelinde 50 milyona yakın insan Alzheimer hastasıdır. Hastalık, hem hastaların hem de onlara bakım verenlerin yaşam kalitelerini ciddi şekilde düşürmektedir. Henüz hastalığın seyrini yavaşlatabilecek ya da durdurabilecek bir tedavi olmadığından, bu alanda yapılan çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

Hastalığın patolojik süresinde, beyinde özellikle hipokampus ve serebral kortekste hücreler arası senil plaklar ve hücre içi nörofibriler yumaklar oluşmakta, bu süreçlere bağlı olarak nöron ve sinaps kaybı gözlemlenmektedir. *APP*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerindeki mutasyonlar, *APOE4* polimorfizmi, diyabet, sigara kullanımı, düşük eğitim seviyesi, obezite, hipertansiyon gibi etmenler AH için risk faktörleridir.[20,22,23]

SIRT1 birçok önemli hücresel süreçte görevli, histon ve histon olmayan proteinleri deasetilasyona uğratan bir enzimdir. İlerleyen yaşa bağlı olarak azaldığı bulunmuştur. AH modellerinde aşırı ekspresyonu ve aktivasyonunun amiloid-beta miktarını azalttığı bulunmakla beraber inhibisyonunun da transgenik farelerde hafıza ve kognitif fonksiyonlarda iyileşmeye yardımcı olduğu bulunmuştur.[4,5]

Eksozomlar nano boyutta endozomal kökenli veziküllerdir. Lipit, nükleik asit ve protein taşırlar, tüm vücut sıvılarında bulunup, hücre-hücre iletişimde önemli rol oynarlar. Hastalık durumlarında patolojik proteinleri taşıdıkları gösterilmiştir. AH'de A β ve p-tau/tau taşıdıkları belirlenmiştir.[6,7]

Bu çalışmamızda, in-vitro amiloid-beta toksisitesi uyguladığımız SH-SY5Y hücrelerinde; toksisite oluşturulmadan önce ve sonra olmak üzere SIRT1 enzim inhibitörü uygulanmasının, sağkalım yolağındaki proteinlere ve hücrelerden salınan eksozom miktarlarına etkilerini araştırdık.

In-vitro amiloid-beta toksisitesi oluşturmak için yapılan LDH testinde, 10 μ M konsantrasyona sahip A β ₁₋₄₂, absorbans değerinde anlamlı bir yükselişe sebep olarak, etkili toksik konsantrasyon düzeyini oluşturmuştur. Yapılan LDH testi sonucunda ve

daha önce literatürde de kullanılmış olması sebebiyle 10 μ M seçilerek deneylere devam edilmiştir.[51]

İnhibitörün hücreler için toksisite oluşturmayan etkin dozunun bulunması için yapılan LDH testi sonucunda, 10 μ M, 80 μ M ve 100 μ M konsantrasyon değerlerinin absorbansı anlamlı derecede düşürdükleri ve hücreler için toksik olmadıkları bulunmuştur. Daha önce literatürde de 80 μ M konsantrasyonda inhibitör kullanılmış olması sebebiyle bu değer seçilerek deneylere devam edilmiştir.[100]

A β grubu incelendiğinde, kontrol grubuna göre değerlendirme yapıldığında, p-PTEN'in azaldığı bulunmuştur. Bazı araştırmalarda Alzheimer hastalarının beyin dokularından alınan örneklerde PTEN'in azaldığı belirtilmiştir.[102,103] A β grubundaki p-PTEN azalmasının, hastalığın in-vitro modellenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

(Ex527+ A β) grubunun sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna göre yapılan değerlendirmede SIRT1, p-AKT, p-GSK3- α , p-mTOR gruplarında anlamlı seviyede azalma varken, p-PTEN grubunda anlamlı düzeyde artış gözlemlenmiştir. SIRT1'in metabolizma, yaşlanma, stres direnci gibi birçok süreçte rol alması ve inhibisyonuyla bu süreçlerin olumsuz etkilenmesiyle beraber; hücrelere toksik etkisi olan A β 'nın aynı anda verilmesi, PI3K/AKT sağkalım yolağının inaktifleşmesine bu sebeple p-AKT ve hedef proteinleri olan p-GSK3- α ve p-mTOR seviyesinde azalmaya sebep olmuş olabilir.

A β +Ex527 grubuna bakıldığında kontrol grubuna göre SIRT1, p-AKT, p-GSK3- α , p-GSK3- β seviyelerinde anlamlı artış gözlemlenirken, p-PTEN ve p-mTOR düzeylerinde anlamlı azalma belirlenmiştir.

Ex527 + A β grubunda ise kontrol grubuna göre yapılan değerlendirmede p-AKT, p-PTEN, p-mTOR seviyelerinin anlamlı düzeyde azaldığı, p-GSK3 α ve p-GSK3- β seviyelerinin anlamlı artış gösterdiği bulunmuştur.

Alzheimer hastalarının beyin dokularıyla yapılan çalışmalarda, p-mTOR seviyesinin kontrol gruplarına göre arttığı gözlemlenmiştir. mTOR proteinin

aktivasyonun artmasıyla birlikte A β peptidinin temizlenmesindeki en önemli süreçlerden birisi olan otofajide bozulma meydana gelmektedir.[51,102,104]

Deney gruplarından Ex527 incelendiğinde, kontrol grubuna göre yapılan değerlendirmede p-AKT ve p-mTOR seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir. Ex527'nin p-mTOR seviyesini azaltarak otofajinin artmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

A β +Ex527 ve Ex527+A β gruplarında p-GSK3 α ve p-GSK3 β seviyeleri artarak GSK3'ün inaktivasyonu gerçekleşmiştir. Literatürde GSK3 β 'nin aşırı aktivasyonunun hafıza problemlerine, tau fosforilasyonuna ve nöron ölümüne sebep olduğu; inaktif formu olan p-GSK3 β miktarının artmasının ise nöroprotektif etki yaptığı belirtilmiştir.[105] Ex527'nin, hem A β toksisitesi oluşturulmadan önce hem de oluşturulduktan sonra verildiği durumlarda; p- GSK3 β seviyesinin artması, p-mTOR seviyesinin ise azalması, nöroprotektif etkinin oluştuğunu ve otofaji inhibisyonunun azaldığını düşündürmektedir. Ayrıca A β +Ex527 grubunda p-AKT'nin de artmış olması PI3K/AKT sağkalım yolağının aktifleşmiş olduğunu göstermektedir. Bu gruplarda p-PTEN seviyesinin ise kontrole göre azalmış durumda olması, Ex527'nin PTEN fosforilasyonunu sağlayamadığını akla getirmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında SIRT1 inhibitörü ex527'nin, hem A β patolojisi oluşmadan önce nöroprotektif bir etki yapabileceği, hem de patoloji oluşuktan sonra tedavi edici bir yönü olabileceği düşünülmektedir.

Hücrelerden salınan eksozomlardan yapılan western blot sonucunda kontrol grubuna göre A β , (Ex527+A β) ve A β +Ex527 gruplarında, TSG101 seviyelerinde anlamlı azalmalar görülmüştür. Bir eksozom belirteci olan TSG101 miktarındaki değişiklikler hücrelerden salınan eksozom miktarlarını yansıtmaktadır. Bu sebeple belirtilen gruplardan salınan eksozom miktarları azalmıştır. En fazla azalma A β grubunda görülmüş olup, A β 'dan sonra Ex527 verilmesi eksozom miktarında anlamlı olmayan bir yükselmeye sebep olmuştur. A β grubuna göre değerlendirme yapıldığında Ex527+ A β grubunda anlamlı düzeyde artış belirlenmiştir. Mohammad Abdullah ve ark. yaptığı bir çalışmada eksozomların A β ₁₋₄₂'nin temizlenmesinde görevli olduğu belirtilmiş ve A β ₁₋₄₂ uygulaması yapılan astrosit hücrelerinde ise

eksozom salınımının azaldığı bulunmuştur.[106] Bu sebeple, Ex527'nin eksozom salınımını arttırarak A β ₁₋₄₂ temizlenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan TAK/TOD deneylerinin sonuçlarına göre toplam antioksidan kapasite A β grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır. TOD ve OSI sonuçları değerlendirildiğinde Ex527 ve A β +Ex527 gruplarında anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Toplam antioksidan kapasitedeki azalmanın A β 'nin oksidatif strese sebep olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. TOD ve OSI'deki azalma ise ex527'nin oksidatif stresin azalmasına yardımcı olarak, A β toksistesine karşı koruyucu bir etki yapmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, SIRT1 inhibitörü Ex527'nin sağkalım yolağındaki proteinleri aktifleştirip, eksozom salınımını arttırması, oksidatif stres indeksini azaltması, AH'de hem nöroprotektif hem de tedavi edici bir etkisinin olma ihtimalini düşündürmektedir. Ancak daha önceki tedavi stratejilerinde olduğu gibi, AH'nin çok faktörlü bir hastalık olması tedavi yaklaşımlarının etkinliğini azaltmaktadır. Ayrıca daha önce SIRT1 aktivasyonun A β toksisitesini azaltarak nöroprotektif etki yapmış olması, öte yandan SIRT1 inhibisyonun kognitif fonksiyonlar ve hafıza üzerinde olumlu etkisinin olması [4,5] SIRT1 inhibisyonu ile birçok hücrel sürecin etkilendiğini ve sonuçların bu noktada daha fazla araştırmaya muhtaç olduğunu göstermektedir.

8. KAYNAKLAR

- [1] J. C. Polanco, C. Li, L. G. Bodea, R. Martinez-Marmol, F. A. Meunier, and J. Götz, "Amyloid- β and tau complexity - Towards improved biomarkers and targeted therapies," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 14, no. 1, pp. 22–40, 2018.
- [2] P. H. Reddy *et al.*, "Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease," *J. Investig. Med.*, vol. 64, no. 8, pp. 1220–1234, 2016.
- [3] J. Götz, A. Schild, F. Hoernkli, and L. Pennanen, "Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: Insight from transgenic mouse and tissue-culture models," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 22, no. 7, pp. 453–465, 2004.
- [4] Ng, Fanny, Laura Wijaya, and Bor Luen Tang. "SIRT1 in the brain—connections with aging-associated disorders and lifespan." *Frontiers in cellular neuroscience* vol. 9, no. 64, 2015.
- [5] K. N. Green *et al.*, "Nicotinamide Restores Cognition in Alzheimer's Disease Transgenic Mice via a Mechanism Involving Sirtuin Inhibition and Selective Reduction of Thr231-Phosphotau," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 45, pp. 11500–11510, 2008.
- [6] Raposo, Graça, and Willem Stoorvogel. "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." *J Cell Biol* vol.200, no.4, pp. 373-383, 2013.
- [7] D. K. Sarko and C. E. McKinney, "Exosomes: Origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease," *Front. Neurosci.*, vol. 11, no. 82, pp. 1–7, 2017.
- [8] Vella, L. J., Sharples, R. A., Nisbet, R. M., Cappai, R., and Hill, A. F. "The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases." *European Biophysics Journal* vol. 37, no. 3, pp. 323-332, 2008.
- [9] G. F. Chen *et al.*, "Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 38, no. 9, pp. 1205–1235, 2017.
- [10] S. Sadigh-Eteghad, B. Sabermarouf, A. Majdi, M. Talebi, M. Farhoudi, and J. Mahmoudi, "Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease," *Med. Princ. Pract.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [11] C. L. Masters, R. Bateman, K. Blennow, C. C. Rowe, R. A. Sperling, and J. L. Cummings, "Alzheimer's disease," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 1, pp. 1–18, 2015.
- [12] M. Meyer-Luehmann *et al.*, "Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts," *Nat. Neurosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 370–377, 2003.

- [13] A. Demuro, E. Mina, R. Kaye, S. C. Milton, I. Parker, and C. G. Glabe, "376. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 17294–17300, 2005.
- [14] A. Thathiah and B. De Strooper, "The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 2, pp. 73–87, 2011.
- [15] Calissano, P., C. Matrone, and G. Amadoro. "Apoptosis and in vitro Alzheimer's disease neuronal models." *Communicative & integrative biology* vol.2, no. 2, pp. 163-169, 2009.
- [16] M. N. Carolindah, R. Rosli, A. Adam, and N. Nordin, "An Overview of in Vitro Research Models for Alzheimer'S Disease (Ad)," *Regen. Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 8–13, 2013.
- [17] Stoppelkamp, Sandra, et al. "In vitro modelling of Alzheimer's disease: degeneration and cell death induced by viral delivery of amyloid and tau." *Experimental neurology* vol. 229, vol .2, pp. 226-237, 2011.
- [18] T. M. Ryan *et al.*, "Ammonium hydroxide treatment of A β produces an aggregate free solution suitable for biophysical and cell culture characterization," *PeerJ*, vol. 1, p. e73, 2013.
- [19] K. Herrup, "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis," *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 6, pp. 794–799, 2015.
- [20] F. M. LaFerla, "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 3, no. 11, pp. 862–872, 2002.
- [21] G. Di Paolo and T. Kim, "Linking Lipids to Alzheimer ' s Disease : Cholesterol and Beyond," *Aging (Albany. NY.)*, vol. 12, no. 5, pp. 284–296, 2012.
- [22] D. Campion, C. Pottier, G. Nicolas, K. Le Guennec, and A. Rovelet-Lecrux, "Alzheimer disease: Modeling an A β -centered biological network," *Mol. Psychiatry*, vol. 21, no. 7, pp. 861–871, 2016.
- [23] H. Oakley *et al.*, "Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 40, pp. 10129–10140, 2006.
- [24] K. Broersen *et al.*, "A standardized and biocompatible preparation of aggregate-free amyloid beta peptide for biophysical and biological studies of Alzheimers disease," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 24, no. 9, pp. 743–750, 2011.
- [25] Y. Zhang *et al.*, "An extract from shrimp processing by-products protects SH-SY5Y cells from neurotoxicity induced by A β 25-35," *Mar. Drugs*, vol. 15, no.

3, 2017.

- [26] M. Biochemistry, D. Eyl, and D. Eyl, "The Effect of Dichloronitrophenol on Amyloid Beta Toxicity and Steroid Levels," *Journal of Neurological Sciences*, no. 1, pp. 16–31, 2017.
- [27] World Health Organization. "Towards a dementia plan: a WHO guide." 2018.
- [28] P. Scheltens *et al.*, "Alzheimer's disease," *Lancet*, vol. 388, no. 10043, pp. 505–517, 2016.
- [29] M. Mold, M. Kumar, A. Mirza, E. Shardlow, and C. Exley, "Intracellular tracing of amyloid vaccines through direct fluorescent labelling," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2018.
- [30] G. Di Fede *et al.*, "Molecular subtypes of Alzheimer's disease," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018.
- [31] R. F. Sowade and T. R. Jahn, "Seed-induced acceleration of amyloid - β Mediated neurotoxicity in vivo," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [32] E. S. Musiek and D. M. Holtzman, "Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and 'wingmen,'" *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 6, pp. 800–806, 2015.
- [33] Karran, Eric, Marc Mercken, and Bart De Strooper. "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics." *Nature reviews Drug discovery*, vol. 10, no. 9, pp. 698-712, 2011.
- [34] K. Saadipour *et al.*, "Amyloid beta1-42 (A β 42) up-regulates the expression of sortilin via the p75NTR/RhoA signaling pathway," *J. Neurochem.*, vol. 127, no. 2, pp. 152–162, 2013.
- [35] Cárdenas-Aguayo, M. del C., et al. "Physiological role of amyloid beta in neural cells: the cellular trophic activity." *Neurochemistry*. InTech, 2014.
- [36] R. Peron, I. P. Vatanabe, P. R. Manzone, A. Camins, and M. R. Cominetti, "Alpha-secretase ADAM10 regulation: Insights into Alzheimer's disease treatment," *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 1, pp. 1–19, 2018.
- [37] M. Novo, S. Freire, and W. Al-Soufi, "Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1-42) oligomers," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 3–10, 2018.
- [38] M. P. Murphy and H. L. Iii, "Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–17, 2010.
- [39] S. P. *et al.*, "Neuroprotective effects of geniposide in SH-SY5Y cells and primary hippocampal neurons exposed to A β 42," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 284314, 2014.

- [40] R. P. Friedrich *et al.*, "Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A pathogenicity," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 5, pp. 1942–1947, 2010.
- [41] B. T. Hyman and J. Yuan, "Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, no. 6, pp. 395–406, 2012.
- [42] T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman, "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease," *Neuron*, vol. 82, no. 4, pp. 756–771, 2014.
- [43] L. M. Ittner and J. Götz, "Amyloid- β and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer's disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 2, pp. 67–72, 2011.
- [44] K. M. Olsen and M. Sheng, "NMDA receptors and BAX are essential for A β impairment of LTP," *Sci. Rep.*, vol. 2, pp. 5–9, 2012.
- [45] R. G. Nagele, M. R. D'Andrea, W. J. Anderson, and H.-Y. Wang, "Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease.," *Neuroscience*, vol. 110, no. 2, pp. 199–211, 2002.
- [46] A. Sotthibundhu, A. M. Sykes, B. Fox, C. K. Underwood, W. Thangnipon, and E. J. Coulson, "-Amyloid1-42 Induces Neuronal Death through the p75 Neurotrophin Receptor," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 15, pp. 3941–3946, 2008.
- [47] S. S. Khan and G. S. Bloom, "Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease," *Front. Neurosci.*, vol. 10, no. 31, pp. 1–5, 2016.
- [48] I. Zerr, L. Kaerst, J. Gawinecka, and D. Varges, "Cerebrospinal fluid based diagnosis in Alzheimer's disease." *The Clinical Spectrum of Alzheimer's Disease-The Charge Toward Comprehensive Diagnostic and Therapeutic Strategies*. InTech, 2011.
- [49] M. E. Orr, A. C. Sullivan, and B. Frost, "A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 38, no. 7, pp. 637–648, 2017.
- [50] Hurtado, David E., et al. "A β accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model." *The American journal of pathology* 177.4 (2010): 1977-1988.
- [51] E. Eitan *et al.*, "Extracellular vesicle-associated A β mediates trans-neuronal bioenergetic and Ca²⁺-handling deficits in Alzheimer's disease models," *npj Aging Mech. Dis.*, vol. 2, no. 1, p. 16019, 2016.
- [52] D. J. Selkoe and J. Hardy, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years," *EMBO Mol. Med.*, vol. 8, no. 6, pp. 595–608, 2016.
- [53] M. S. Rafii and P. S. Aisen, "Advances in alzheimer's disease drug development," *BMC Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, 2015.

- [54] R. G. Canter, J. Penney, and L. H. Tsai, "The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease," *Nature*, vol. 539, no. 7628, pp. 187–196, 2016.
- [55] G. Donmez, "The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 33, no. 9, pp. 494–501, 2012.
- [56] L. Polito, P. G. Kehoe, G. Forloni, and D. Albani, "The molecular genetics of sirtuins: association with human longevity and age-related diseases," *Int J Mol Epidemiol Genet*, vol. 1, no. 3, pp. 214–225, 2010.
- [57] Y. Li, W. Xu, M. W. McBurney, and V. D. Longo, "SirT1 Inhibition Reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 Signaling and Protects Neurons," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 1, pp. 38–48, 2008.
- [58] G. Donmez and T. F. Outeiro, "SIRT1 and SIRT2: Emerging targets in neurodegeneration," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 3, pp. 344–352, 2013.
- [59] M. Gertz *et al.*, "Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 30, pp. E2772–E2781, 2013.
- [60] C. Cornelius *et al.*, "Cellular stress response, sirtuins and UCP proteins in Alzheimer disease: Role of vitagenes," *Immun. Ageing*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [61] U. Kilic *et al.*, "A remarkable age-related increase in SIRT1 protein expression against oxidative stress in elderly: SIRT1 gene variants and longevity in human," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–19, 2015.
- [62] B. P. Hubbard and D. A. Sinclair, "Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 35, no. 3, pp. 146–154, 2014.
- [63] G. Donmez, "The effects of SIRT1 on Alzheimer's disease models," *Int. J. Alzheimers. Dis.*, vol. 2012, pp. 4–6, 2012.
- [64] R. Lalla and G. Donmez, "The role of sirtuins in Alzheimer's disease," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 5, no. APR, pp. 1–4, 2013.
- [65] P. Singh, P. S. Hanson, and C. M. Morris, "SIRT1 ameliorates oxidative stress induced neural cell death and is down-regulated in Parkinson's disease," *BMC Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [66] W. W. Seeley, E. J. Huang, Y. Shen, and E. Masliah, "Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy," vol. 67, no. 6, pp. 953–966, 2011.
- [67] H. S. Ghosh, M. McBurney, and P. D. Robbins, "SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin," *PLoS One*, vol. 5, no. 2, pp. 1–8, 2010.

- [68] F. J. Alcaín and J. M. Villalba, "Sirtuin inhibitors," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 19, no. 3, pp. 283–294, 2009.
- [69] V. Carafa, A. Nebbioso, and L. Altucci, "Sirtuins and disease: The road ahead," *Front. Pharmacol.*, vol. 3, no. 4, pp. 1–6, 2012.
- [70] W. Qin *et al.*, "Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 31, pp. 21745–21754, 2006.
- [71] J. M. Solomon *et al.*, "Inhibition of SIRT1 Catalytic Activity Increases p53 Acetylation but Does Not Alter Cell Survival following DNA Damage Inhibition of SIRT1 Catalytic Activity Increases p53 Acetylation but Does Not Alter Cell Survival following DNA Damage," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 28, pp. 28–38, 2006.
- [72] E. H. Cho and Y. Dai, "SIRT1 controls cell proliferation by regulating contact inhibition," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 478, no. 2, pp. 868–872, 2016.
- [73] S. Lavu, O. Boss, P. J. Elliott, and P. D. Lambert, "Sirtuins - Novel therapeutic targets to treat age-associated diseases," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 10, pp. 841–853, 2008.
- [74] L. Guarente, "Sirtuins, Aging, and Medicine," *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 364, no. 23, pp. 2235–2244, 2011.
- [75] A. Salminen, K. Kaarniranta, and A. Kauppinen, "Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: Impact on the aging process," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 3834–3859, 2013.
- [76] F. Zhang *et al.*, "Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system," *Prog. Neurobiol.*, vol. 95, no. 3, pp. 373–395, 2011.
- [77] D. J. Bonda *et al.*, "The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: Mechanistic and therapeutic considerations," *Lancet Neurol.*, vol. 10, no. 3, pp. 275–279, 2011.
- [78] B. T. Pan and R. M. Johnstone, "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor," *Cell*, vol. 33, no. 3, pp. 967–978, 1983.
- [79] R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide, "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 19, pp. 9412–9420, 1987.
- [80] S. A. Bellingham, B. Guo, B. Coleman, and A. F. Hill, "Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?," *Frontiers in physiology* vol. 3, no. 124, 2012.
- [81] A. M. Janas, K. Sapoń, T. Janas, M. H. Stowell, and T. Janas, "Exosomes

- and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* vol. 1858, no .6, pp. 1139-1151, 2016.
- [82] Cocucci, Emanuele, and Jacopo Meldolesi. "Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles." *Trends in cell biology* vol. 25, no. 6, pp. 364-372, 2015.
 - [83] Zhang, Jian, et al. "Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function." *Genomics, proteomics & bioinformatics* vol. 13, no. 1, pp. 17-24, 2015.
 - [84] L. F. Bátiz *et al.*, "Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. 501, pp. 1–28, 2016.
 - [85] Bellingham, Shayne A., Belinda Guo, and Andrew F. Hill. "The secret life of extracellular vesicles in metal homeostasis and neurodegeneration." *Biology of the Cell* vol. 107, no. 11, pp. 389-418, 2015.
 - [86] B. S. Chia, Y. P. Low, Q. Wang, P. Li, and Z. Gao, "Advances in exosome quantification techniques." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* vol. 86, pp. 93-106, 2017.
 - [87] Théry, Clotilde, Laurence Zitvogel, and Sebastian Amigorena. "Exosomes: composition, biogenesis and function." *Nature Reviews Immunology* vol. 2, no. 8, pp. 569-579, 2002.
 - [88] F. Properzi, E. Ferroni, A. Pileggi, and R. Vinci, "The regulation of exosome function in the CNS: implications for neurodegeneration." *Swiss Med Wkly* vol. 145, no. w14204, 2015.
 - [89] T. Malm, S. Loppi, and K. M. Kanninen, "Exosomes in Alzheimer's disease," *Neurochem. Int.*, vol. 97, pp. 193–199, 2016.
 - [90] Vella, Laura J., Andrew F. Hill, and Lesley Cheng. "Focus on extracellular vesicles: exosomes and their role in protein trafficking and biomarker potential in Alzheimer's and Parkinson's disease." *International journal of molecular sciences* vol. 17, no. 2, 2016.
 - [91] Yuyama, Kohei, et al. "A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide." *FEBS letters* vol. 589, no .1, pp. 84-88, 2015.
 - [92] Winston, Charisse N., et al. "Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile." *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* vol. 3, pp. 63-72, 2016.
 - [93] J. C. Polanco, B. Scicluna, A. Hill, and J. Götz, "Extracellular vesicles isolated from brains of rTg4510 mice seed tau aggregation in a threshold-dependent manner." *Journal of Biological Chemistry* vol. 291, pp. 12445-

12466, 2016.

- [94] J. Howitt and A. F. Hill, "Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 52, pp. 26589–26597, 2016.
- [95] K. Yuyama, H. Sun, S. Mitsutake, and Y. Igarashi, "Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 14, pp. 10977–10989, 2012.
- [96] Goetzl, Edward J., et al. "Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease." *Annals of clinical and translational neurology* vol. 2, no. 7, pp. 769-773, 2015.
- [97] Fiandaca, Massimo S., et al. "Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: a case-control study." *Alzheimer's & Dementia* vol. 11, no. 6, pp. 600-607, 2015.
- [98] Tsilioni, Irene, Smaro Panagiotidou, and Theoharis C. Theoharides. "Exosomes in neurologic and psychiatric disorders." *Clinical therapeutics* vol. 36, no. 6, pp. 882-888, 2014.
- [99] S. Musunuri *et al.*, "Increased Levels of Extracellular Microvesicle Markers and Decreased Levels of Endocytic/Exocytic Proteins in the Alzheimer's Disease Brain," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 54, no. 4, pp. 1671–1686, 2016.
- [100] S. A. Shah *et al.*, "Novel osmotin inhibits SREBP2 via the AdipoR1/AMPK/SIRT1 pathway to improve Alzheimer's disease neuropathological deficits," *Mol. Psychiatry*, vol. 22, no. 3, pp. 407–416, 2017.
- [101] Kilic, Ulkan, et al. "Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia." *Journal of pineal research* vol. 52, no. 2, pp. 228-235, 2012.
- [102] A. Tramutola *et al.*, "Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): Analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD," *J. Neurochem.*, vol. 133, no. 5, pp. 739–749, 2015.
- [103] R. J. Griffin *et al.*, "Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology," *J. Neurochem.*, vol. 93, no. 1, pp. 105–117, 2005.
- [104] Z. Tang *et al.*, "MTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 7, pp. 1646–1657, 2015.
- [105] S. Jimenez *et al.*, "Age-dependent accumulation of soluble amyloid β (A β)

oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- α (sAPP α) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 21, pp. 18414–18425, 2011.

- [106] Abdullah, Mohammad, et al. "Amyloid- β reduces exosome release from astrocytes by enhancing JNK phosphorylation." *Journal of Alzheimer's Disease* vol. 53, no. 4, pp. 1433-1441, 2016.



9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Rabia	Soyadı	KALKAN
Doğum Yeri	Üsküdar	Doğum Tarihi	01.03.1993
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail	Rabia.klkn@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzman		
Yüksek Lisans		
Lisans	Fatih Üniversitesi	2016
Lise	Özel Maltepe Coşkun Fen Lisesi	2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu ☐								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	83,75							

☐☐ Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

☐ KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	90,99	90,89	76,23
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Orta
SPSS	Zayıf

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin