



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

BAHAR SARİKAMIŞ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÜLKAN KILIÇ

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL – 2018

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca ihtiyaç duyduğum her anda bilgisi, tecrübesi ile destek olan ve bana akademik hayatın kapılarını aralayan, her daim örnek aldığım ve kendisiyle çalışmaktan her daim mutluluk duyacağım saygı değer danışman hocam Prof.Dr. Ülkan KILIÇ' a

Deneyleirim sırasında yardımlarını ve vaktini hiç bir zaman esirgemeyen sınıf arkadaşım Rabia KALKAN' a

Yüksek lisans dönemim boyunca desteklerini esirgemeyen ve iş hayatı ile okul hayatı arasındaki koşuşturmacamda her zaman yanımda olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi personellerinden sorumlu Veteriner Hekimi Mert ÇELİKTEN' e, Dr. Beyza Servet GÖNCÜ ve Uzm. Moleküler Biyolog Sezen ATASOY' a

Hayatımın her anında desteklerini hissettiğim, her zaman mutluluk ve güven veren, akademik hayata adım atmamı teşvik eden canım annem, babam ve kardeşlerime,
Sonsuz teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1.ÖZET	1
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	4
4.1.Alzheimer Hastalığı.....	4
4.1.1. Alzheimer Hastalığı' nın Tarihçesi	5
4.1.2.Alzheimer Epidemiyolojisi.....	7
4.1.3.Alzheimer Patofizyolojisi	8
4.1.3.1.Amiloid Plaklar	8
4.1.3.2.Nörofibriller Yumaklar.....	11
4.1.4.Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri	13
4.2.Sirtuinler	14
4.2.1.Histon Deasetilazlar.....	15
4.2.2.SIRT1' in Moleküler Mekanizması	16
4.2.3.Alzheimer Hastalığında SIRT1 'in Rolü.....	19
4.3.Eksozomlar	20
4.3.1Alzheimer Hastalığı' nda Eksozomların Rolü	22
5.MATERYAL VE METOT	23
5.1.Materyal.....	23
5.2.Metot	28
5.2.1.CAY10602 LDH Analizi.....	28
5.2.2.A β ₁₋₄₂ Toksikite Modeli Oluşturma	28
5.2.3.SH-SY5Y Hücre Kültürü	29
5.2.3.1.SH-SY5Y Hücre Hattının Çözdürülmesi ve Ekimi.....	29
5.2.3.2.SH-SY5Y Hücre Hattının Pasajlanması.....	29

5.2.3.3.SH-SY5Y Hücre Hattının Dondurulması.....	30
5.2.3.4.SH-SY5Y Hücre Hattının Altı Kuyucuklu Plakaya Aktarılması	30
5.4.3.SH-SY5Y Hücrelerinin A β ve SIRT 1 Aktivatör II ile Muamelesi	30
5.2.4.Total Protein İzolasyonu	33
5.2.4.1. Protein Miktar Tayini	33
5.2.5.Protein Jel Elektroforezi	33
5.2.5.1.Transfer	34
5.2.5.2.Primar/sekonder antikor ile muamele ve kemilüminesan reaksiyonu	35
5.2.5.3.Membran Stripleme	36
5.2.6.Toplam Antioksidan Statü ve Toplam Oksidatif Durum Analizi.....	36
5.2.7.Eksozom İzolasyonu.....	37
5.2.8.Eksozom İmmuno Çökeltme	37
5.2.10. İstatistiksel analiz	37
6.BULGULAR.....	38
6.1. A β ₍₁₋₄₂₎ Toksikite Modeli.....	39
6.2.CAY10602 LDH Analizi.....	40
6.3.Hücre Mikroskop Görüntüleri	41
6.4.Protein Ekspresyonları	43
6.5.TAS/ TOS / OSI	57
7.TARTIŞMA ve SONUÇ	60
8.KAYNAKLAR	65
9.ÖZGEÇMİŞ.....	72

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AH	: Alzheimer Hastalığı
NFY	: Nörofibriler Yumaklar
A β	: Amiloid beta
V.	: Vehikül
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz 3
APP	: Amiloid öncül proteini
μ l	: Mikro litre
μ M	: Mikro molar
$^{\circ}$ C	: Celcius

TABLolar LİSTESİ

Tablo.4.2.1. Memelilerde sirtuinlerin görevleri ve hücre içi konumları.	15
Tablo.4.3. Alzheimer Hastalığında eksozomların farklı rolleri.....	22
Tablo 5.1.1. Deneylerde kullanılan cihazların listesi	23
Tablo 5.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kit Listesi	24
Tablo 5.1.3. Deneylerde kullanılan antikolar.....	26
Tablo 5.1.4. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler.....	27
Tablo 5.2.4.1. Madde Uygulamaları ve Gruplar	32
Tablo 5.2.6.1.1. Transfer basamağı için kullanılan tamponun hazırlanışı	34
Tablo 5.2.5.6.1. Kullanılan antikolar ve son konsantrasyonları.....	35



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. A) Oskar Fisher B) Alois Alzheimer C) Auguste Deter D) Bielschowsky metodu ile görütülenmiş Auguste Deter' in beyninden alınmış kesitteki nörofibriler yumak E) AH frontal kortekste bir GFAP pozitif glia hücresi (yeşil) ile çevrelenmiş bir çift amiloid beta immün boyalı plağın (kırmızı) floresan görüntüsü.....	7
Şekil.4.1.3.1.Amiloidojenik ve Amiloidojenik olmayan yolak	10
Şekil.4.1.3.2. MAPT ve yetişkin insan beyninde ifade edilen altı tau izoformu.	11
Şekil.4.1.3.2.2. Tau hiperfosforilasyonu.....	13
Tablo.4.2.1.Memelilerde sirtuinlerin görevleri ve hücre içi konumları.	15
Şekil.4.2.1.Gen ifadesinin SIRT1 tarafından baskılanması	16
Şekil.4.2.2.1.SIRT 1 tarafından öğrenme ve hafızanın düzenlenmesi.....	18
Şekil.4.2.2.2. SIRT1 gen transkripsiyonlarını subgenomik seviyede düzenler.	19
Şekil.4.3.Eksozomların oluşumu ve hücreden salınımı	21
Şekil 6.1.492 nm' de ölçülmüş A β konsantrasyonları.....	39
Şekil.6.2.1.SIRT1 aktivatörü olan CAY10602' ye ait LDH deneyi.....	40
Şekil.6.4.1.Hücre ekiminden 48 saat sonra.....	41
Şekil.6.4.2.Hücre ekiminden 72 saat sonra.....	42
Şekil.6.4.3.Hücre ekiminden 96 saat sonra.....	43
Şekil.6.5. Western Yöntemi ile tayin edilmiş proteinlerin bant görüntüleri.....	54
Şekil.6.5.1. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre SIRT1 ekspresyonunun değişimi.....	45
Şekil.6.5.2. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-AKT ekspresyonunun değişimi.....	46
Şekil.6.5.3. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-AKT ekspresyonunun değişimi.....	47
Şekil.6.5.4. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-PTEN ekspresyonunun değişimi	48
Şekil.6.5.5. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-PTEN ekspresyonunun değişimi.	49
Şekil.6.5.6. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-GSK3 α ekspresyonunun değişimi.....	50
Şekil.6.5.7. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-GSK3 α ekspresyonunun değişimi	51
Şekil.6.5.8. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-GSK3 β ekspresyonunun değişimi.....	52

Şekil.6.5.9. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-GSK3 β ekspresyonunun değişimi	53
Şekil.6.5.9. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-mTOR ekspresyonunun değişimi	54
Şekil.6.5.10. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-mTOR ekspresyonunun değişimi	55
Şekil.6.5.11. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre Tsg101 ekspresyonunun değişimi	56
Şekil.6.6.1. Toplam Antioksidan Statü Düzeyleri	57
Şekil.6.6.2. Toplam Oksidatif Durum Düzeyleri	58
Şekil.6.6.3. Oksidatif Stres İndeksi Düzeyleri	59
Şekil.7.1. GSK3 ve PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı	61



1.ÖZET

İN VİTRO AMİLOİD BETA TOKSİSİTESİ KULLANILARAK SIRT 1 PROTEİN AKTİVASYONUNUN EKSOZOMAL PROTEİN İÇERİĞİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Alzheimer hastalığı birincil olarak senil plaklar, nörofibriler yumak ve nörodejenerasyon ile karakterize edilir. Çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hattı kullanılarak A β toksisitesi oluşturulmuştur. A β toksisitesi oluşturulan hücrelerde NAD⁺ bağımlı deasetilazlardan sirtuin ailesinin yedi üyesinden biri olan in vivo ve in vitro olarak APP' nin amiloidojenik yolakta işlenmesini azalttığı bilinen SIRT1 aktivasyonunun, bir çok hücre tipi tarafından salgılanabilen ve vücut sıvılarında bulunabilen nano boyutlu eksozomların protein içeriğine etkisi ve SIRT1' in protein ekspresyonları üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı varyasyonlarda gruplar oluşturularak hücre kültürü yapılan SH-SY5Y hücrelerine bir SIRT1 aktivatörü olan CAY10602 uygulanarak SIRT1 'in enzimatik aktivitesi etkinleştirilmiştir. Deney gruplarında eksozom salınımı belirlemek için eksozom yüzey belirteci olan Tsg101' in ekspresyonu incelenmiştir ve toksisite oluşturulmuş modellerde Tsg101' in arttığı görülmüştür. Ayrıca protein ekspresyonları incelenen AKT, PTEN, GSK3 ve mTOR seviyelerinde de SIRT1' in nöroprotektif etkileri görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer, SIRT1, eksozom, SH-SY5Y

2.ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ACTIVATION SIRT1 PROTEIN TO THE EXOSOMES PROTEIN CONTENTS BY USING IN VITRO AMYLOID BETA TOXICITY

Alzheimer's disease is primarily characterized by neurofibrillary tangles, senile plaques and neurodegeneration. In this study A β toxicity was made using SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. One of the seven members of the sirtuin family of NAD⁺-dependent deacetylases, which is known to reduce the processing of APP in the amyloidogenic pathway in vivo and in vitro named SIRT1 and its activation investigated to nano-sized exosomes that can be secreted by many cell types and found in body fluids and the effect of SIRT1 activation on protein expression was examined in A β toxicity-induced cells. Enzymatic activity of SIRT1 was activated by applying CAY10602 is a SIRT1 activator, to SH-SY5Y cells cultured in different variated groups. In the experiment groups, the expression of Tsg101, an exosomal surface marker, was examined to determine exosomal release, and Tsg101 was found to increase in the toxicity-induced models. In addition, SIRT1' neuroprotective effect was also observed for AKT, PTEN, GSK3 and mTOR in which protein expressions were examined.

Keywords: Alzheimer, SIRT1, exosome, SH-SY5Y

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), geri dönüşü olmayan, kademeli olarak artan klinikte hafıza kaybı ve bilişsel düşüş ile karakterize edilen ilerleyen yaşla ilgili bir rahatsızlıktır. AH' nin patolojik işaretleri beyinde ekstrasellüler amiloid beta birikimi ve nörofibriler yumak oluşumudur. [1] Ailesel olduğu gibi sporadik olarak da gelişebilen AH insan ömrünün uzaması sebebiyle daha çok görülmektedir ve en çok 65 yaş ve üstünü etkilemektedir. AH' nin patofizyolojisi günümüzde tam olarak bilinmemektedir.

Kalori kısıtlaması, yaşlanmayı düzenleyen mekanizmalara ilginç bir bakış açısı getirdi. Kalori kısıtlaması yapılan *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ve farelerde ömrün uzadığı ve yaşlanmaya bağlı ölümlerin azaldığı görülmüştür. Bu faydaların sirtuins denilen NAD⁺ bağımlı histon deasetilaz ailesi tarafından kısmen aracılık ettiği gösterilmiştir. [2] Sirtuin ailesinden olan SIRT1 proteini AH' de çeşitli proteinleri deasetilleyerek nöronlarda koruyucu etki göstermektedir.

Ekstrasellüler veziküller, Alzheimer hastalığına bağlı patojenik proteinlerin hücrel iletişimi ve taşınmasında bir oyuncu olarak ortaya çıkmaktadır. Bir çeşit ekstrasellüler vezikül olan eksozomlar nano boyuttadır ve endozomal kaynaklıdır. Eksozomlar birçok hücre tipinden salgılanabilirler. Hücre sinyal iletiminde önemli rolleri olan eksozomlar ısı şok proteinleri, tetraspaninler, proteinler ve nükleik asitleri taşırlar. AH' de tau proteininin yayılmasına katkıda bulunduğu ve toksik A β peptidleri için bağlanma bölgeleri içerdiğine dair çalışmalar vardır.[3] Öte yandan in vivo çalışmalarda eksozomların A β ' nin nörotoksik etkisini inhibe ettiğine dair çalışmalar mevcuttur. Ancak eksozomların AH' deki rolünü anlamak için çalışmalar devam etmektedir.[4] Alzheimer hastası sayısı her geçen gün artmaktadır ve AH tanılı bireyler öz bakımlarını yerine getiremeyecek oldukları için toplum için maddi ve manevi yük oluşturmaktadır. Mevcut çalışmanın amacı SH-SY5Y hücrelerine SIRT1 aktivatörü uygulayarak SIRT1 aktivatörünün hem protein ekspresyonları üzerine etkisini incelemeyi hem de eksozomal protein içeriğine etkisini inceleyerek literatüre katkıda bulunmaktır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Alzheimer Hastalığı

İnsanlar üstün entelektüel ve zihinsel yetenekleriyle diğer primatlardan ayrılırlar. Bu bilişsel işlevlerin kademeli ve kronik kaybı, bağımsız bir yaşam kaybına yol açtığı zaman kişi demanslı olarak tanımlanır. Böyle bir kayıp bilişsel işlevler edinme ile ilgili hafıza, akıl yürütme, dil, pratik beceriler gibi tüm zihinsel süreçleri kapsar. Alzheimer Hastalığı (AH) günümüzde demansın en sık nedeni olarak görülen nörodejeneratif bir rahatsızlıktır. [5] AH, serebral korteks ve hipokampus bölgelerinde nöron kaybı ve sinaptik dejenerasyon, senil plaklar ve nörofibriler yumaklar oluşumu nedeni ile ortaya çıkan ve bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, davranışsal bozukluklar, kişi- yer- zaman oryantasyonunda bozukluklar ile karakterize edilen geç başlangıçlı, geri dönüşü olmayan nörodejeneratif bir rahatsızlıktır. [6], [7]

Beyindeki biyokimyasal değişikliklerin başlangıcı ile AH' nın klinik semptomlarının görülmesi arasında uzun asemptomatik bir dönem vardır. AH' nın en yaygın belirtisi hafıza zayıflığıdır. Diğer bilişsel işlevlerin bozulmasına bellek zayıflığı eşlik eder veya bellek zayıflamasının ardından ortaya çıkar. Hastalığın erken belirtileri arasında visuospsyal anormallikler ve yönetici disfonksiyon vardır. Dil, görsel- uzaysal fonksiyonlar, dikkat, yürütücü işlevler gibi bilişsel bozukluklar ve günlük yaşam aktivitelerinde bozukluklar ve davranış değişiklikleri genellikle hastalığın sonraki aşamalarında görülür. Depresyon, ajitasyon, hezeyanlar ve halüsinasyonlar gibi davranışsal değişiklikler hastalığın seyri sırasında herhangi bir dönemde ortaya çıkabilir. [8], [9],[10]

1983 yılında, Nörolojik ve İletişimsel Hastalıkları ve İnme Ulusal Enstitüsü (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke- NINCDS) ve Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (Alzheimer's Disease and Related Disorders Association- ADRDA) AH'nın klinik teşhisini tanımlamak ve temel tanı kriterlerini belirlemiştir. 2011 yılında tanı kriterleri tekrar düzenlenmiştir. NINCDS- ADRDA kriterleri arasında sinsi başlangıçlı, rapor veya gözlem ile bilişin kötüleşmesinin açık tarihçesi, öğrenme eksikliği, konuşma

bozukluğu, yönetimsel fonksiyon bozukluğu sayılır ve bu etkilerin kişinin kullandığı herhangi bir nörolojik veya nörolojik olmayan ilaçlardan kaynaklanmaması gereklidir. Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (Diagnostic and Statistical Manuel -DSM) NINCDS- ADRDA' nın dışında tanı için kullanılan kriterlerdir. DSM' ye göre hastanın klinik değerlendirmesi yapılırken öğrenme ve hafıza, dil, yönetici işlev, dikkat, algısal motor işlevi ve sosyal biliş göz önünde bulundurulur ve bu bilişsel yetilerden bir veya daha fazlasının anlamlı derecede kaybedilmiş olması bilişsel bozukluk olduğunu göstermektedir. DSM ve NINCDS- ADRDA tanı kriterleri yalnızca olası Alzheimer Hastalığı tanısını koyabilmektedir. Kesin Alzheimer hastalığı tanısı otopsi veya biyopside alınan doku örneğinin patolojik incelenmesi sonucunda konabilir. [8], [11]

4.1.1. Alzheimer Hastalığı' nın Tarihçesi

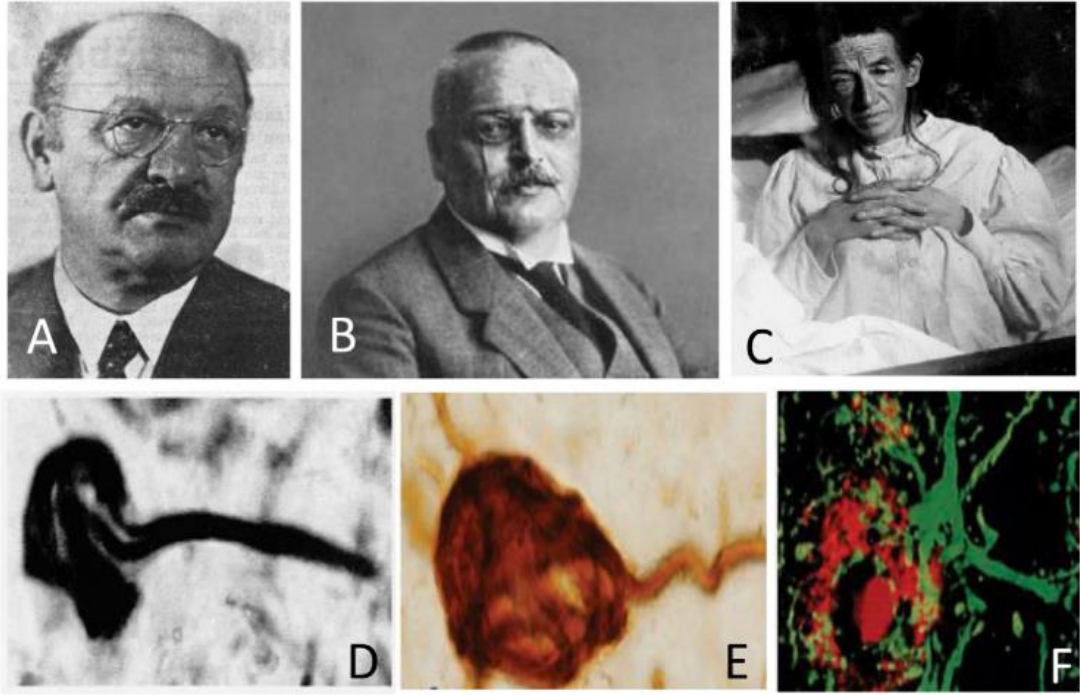
İnsanlık tarihi kadar eski olan ve yaşlanmanın sonucu olarak kabul edilen demans ve demansın özel bir tipi olan Alzheimer hastalığının bilimsel tanımlaması yirminci yüz yılın başlarında yapılmıştır. 20.yy' nin başlarında birçok nörobiyolog insan beyinde ekstrasellüler lezyonların varlığını demans olarak tanımladı. [12]

1892 yılında nöropatolog Paul Blocq ve sinir bilimci Georges Marinesco kronik epileptik hastalığı olan iki yaşlı bireyden aldıkları post- mortem beyin dokularında 60 µm boyutlarında korteksin çeşitli katmanlarına yayılmış agrege hücre dışı plak varlığını rapor ettiler ve 'amas ronds' yani yuvarlak yığınlar olarak tanımladılar. Ancak plakları demansla ilişkilendirmediler. [13][14]

1898 yılında Emil Redlich 78 yaşında demans rahatsızlığı olan bir hastadan aldığı post-mortem yaptığı incelemeler sonucunda beynin boyutunun küçüldüğünü, serebral korteksin frontal ve temporal loblarında yüksek oranda atrofi olduğunu gözlemledi ve yaptığı histolojik boyamalar sonucunda ise rastladığı senil plaklara 'miliare Sklerose' (miliary sclerosis) adını verdi. Ayrıca Emil Redlich bu yapıları günümüzde kullanıldığı gibi 'plaklar' adını da vermiştir. Blocq ve Marinesco gibi Redlich 'de plakların yoğun fibröz materyal varlığı yüzünden değişime uğramış glial hücresi olduğuna karar verdi.[15]

1907 yılında Oskar Fischer (Şekil 4.1.1) , Bielschowsky gümüş de dâhil olmak üzere çeşitli boyama teknikleri kullanarak 16 yaşlı senil demans olgusunun serebral korteksini inceledi. 12 vakada plakların varlığını tanımladı ve şimdi nöritik plak olarak bilinen şeyin ilk tanımını sağladı. Diğer araştırmacıların aksine Fischer, plakları 10 µm' den 120 µm 'ye kadar değişen farklı boyutlarda orijini bilinmeyen inkülyasyon olarak tanımladı ve 'drusige nekrose' isimlendirdi. Oskar Fischer, 1910 yılında yaptığı çalışmada 1907'deki bulgularını doğruladı ve 'Sphaerotrichia multipleks serebri' (plağın küresel doğasını ve ipliksi organizasyonunu yansıtacak şekilde) olarak adlandırdığı “drusige Nekrose” un presbyophrenic demansın tanımlayıcı patolojik özelliği olduğunu öne sürdü.[12], [15]

Alman psikiyatrist Alois Alzheimer (Şekil 4.1.1) 1901 yılında, hafıza kaybı, uyku bozuklukları, paranoya belirtileri gösteren 51 yaşında Auguste Deter isimli hastayı tedavi etmeye başladı. 1906 yılında ölen hastanın beyini otopsi ile incelendi. Alzheimer, otopside beyin atrofsisi, nöronal kayıp ve yumak şeklinde yoğun agrege fibriller tomurcuklar ve plaklar gözlemledi. Alois Alzheimer o devirde kullanılan Bielschowsky gümüş boyama ile nörofibriler yumak varlığını gösterdi. Alois Alzheimer' ın klinik şefi olan Dr. Emil Kraepel' in 1910 yılında yazdığı kitapta nöronal kayıp, plak ve nörofibriler yumak belirti ve semptomları için "Alzheimer Hastalığı" terimini kullanmıştır ve günümüzde de Alzheimer Hastalığı terimi olarak kullanılmaktadır. [9], [12]



Şekil 4.1.1. A) Oskar Fisher B) Alois Alzheimer C) Auguste Deter D) Bielschowsky metodu ile görütülenmiş Auguste Deter' in beyninden alınmış kesitteki nörofibriler yumak E) AH frontal kortekste bir GFAP pozitif glia hücresi (yeşil) ile çevrelenmiş bir çift amiloid beta immün boyalı plağın (kırmızı) floresan görüntüsü. [12]

4.1.2. Alzheimer Epidemiyolojisi

Alzheimer hastalığı yaşlı bireylerde en yaygın görülen ilerleyici ve geri dönüşü olmayan demans tipidir ve dünyada ölüm sebebi olarak beşinci sırada yer almaktadır. Dünya popülasyonunda ölüm sebeplerinin %3' ünü oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığı keşfedildiğinden beri tedavi edilemeyen ve geciktirilemeyen, ilerleyici ve en çok ölümcül hastalıklardan biri olmuştur. 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü' nün verilerine göre dünyada %60-70 ' ini Alzheimer hastalarının oluşturduğu 47,5 milyon demans hastası vardır ve her yıl bu sayıya 7,7 milyon yeni olgu eklenmektedir. Uluslararası Alzheimer Hastalığı' nın raporuna göre Alzheimer hastası olan 4 kişiden 1 kişiye teşhis konmaktadır ve Alzheimer hastalarının her 3 bireyinden biri kadındır. [7] [16]

Milyonlarca Amerikalı Alzheimer hastalığına veya diğer demans tiplerine yakalanmıştır. 65 yaş ve üstü ABD nüfusunun büyüklüğü ve oranı arttıkça, Alzheimer tanılı veya diğer demans tanılı Amerikalıların sayısı artacaktır. Bu sayının önümüzdeki yıllarda hızla artması, 65 yaş ve üstü Amerikalıların nüfusunun 2018 yılında 53 milyondan 2050 yılına kadar 88 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Amerika'da her 65 saniyede bir Amerikalı, AH' ye yakalanmaktadır ve 2050 yılında 33 saniyeye düşeceği tahmin edilmektedir. Demans tanılı 65 yaşın üzerindeki hastaların sağlık bakımı, uzun süreli bakım ve darülaceze hizmetleri için 2018 yılında toplam ödeme tutarı 277 milyar dolar olarak tahmin edilmektedir. Dolayısıyla toplum aile ve bireyler için ciddi bir yük oluşturmaktadır. [17]

Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu' nun yayınladığı 2016 Türkiye Sağlık Araştırması raporuna göre son 12 ay içerisinde kliniğe başvuran 65 yaş ve üzeri hastaların %5,1' i erkek, %6,1' i ise kadındır. Kadınlarda 2002 yılında DALY (Erken ölüm sebebi ile kaybedilen yaşam yılı ve ölüme yol açmayan ancak ideal olmayan sağlık koşullarında yaşanan yılların toplamını ifade eder. Sağlık kaybı ölçütüdür. 1 DALY, 1 sağlıklı yaşam yılından kaybı ifade eder.) rakamı 216.550 iken 2016 yılında 294.793' e ulaşarak %36,1 artış göstermiştir. 2016 yılında ise DALY değeri 2002 yılına göre %36,2 artmıştır. [18]

4.1.3. Alzheimer Patofizyolojisi

AH patogenezi iki tip yanlış katlanmış protein birikimleri içerir: hücre dışında biriken amyloid- β (A β) peptidi içeren senil plaklar ve hücre içinde biriken mikrotübül ilişkili hiperfosforile tau proteininin nörofibriler yumaklarıdır. Ancak bu ayırıcı özelliklere ve yapılan geniş çaplı araştırmalara rağmen Alzheimer hastalığı patogenezi tam olarak bilinmemektedir. AH' nin ölümcül olması ve oluşturduğu toplumsal ekonomik yük sebebiyle patogenezinin anlaşılması önemli bir basamaktır ve AH' nin patogenezini araştırma çalışmaları hâlâ devam etmektedir.

4.1.3.1. Amiloid Plaklar

Senil amiloid plakların oluşumu AH' nin en önemli belirtisidir ve özellikle amigdala, hipokampus ve neokortekste görülür. [19] Senil plakların çekirdeği,

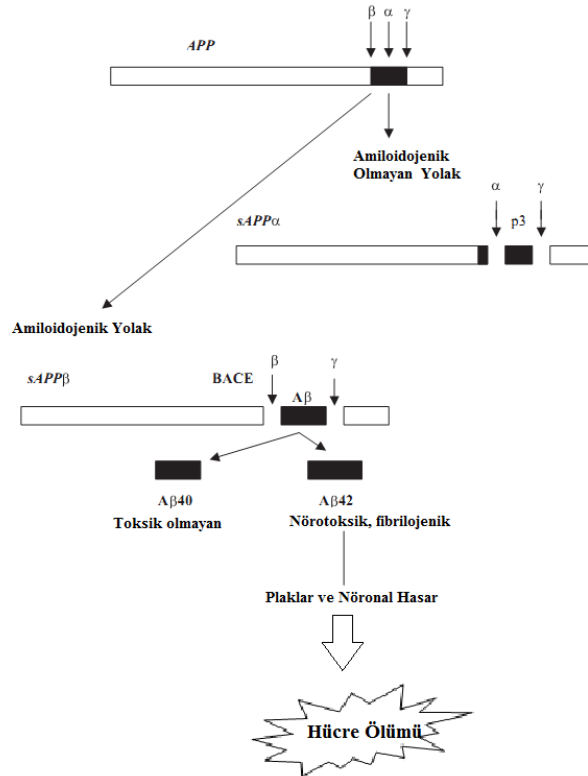
ölmekte olan nörit ile çevrelenmiş β - amyloid ($A\beta$) peptitlerden oluşur. $A\beta$, sağlıklı insan beyninde pikomolar seviyede bulunmaktadır ve son yapılan çalışmalar nöronal plastisite, sinaps oluşumu ve homeostasis üzerinde etkili olduğunu vurgulamaktadır. [20] Amiloid plakların kalan %10 'u apolipoprotein E, lipidler, metal iyonlar ve diğer bileşikleri içerir. [21] $A\beta$, amiloid öncü proteininin (APP) ardışık kesilmesi ile oluşan 39-43 amino asit uzunluğunda peptitlerdir. APP' nin endoproteolitik kesilmeleri α -sekretaz, β -sekretaz, γ -sekretaz enzimleri tarafından kontrol edilir. APP, metal bağlayıcı ve heparin bağlayıcı bölge içeren tip 1 transmembran glikoproteindir ve ekstrasellüler N-terminal bölgesi, intrasellüler C- terminal bölgesinden oluşur. APP geninin 563' ten 770' e kadar değişen amino asit sekansları ile alternatif kırılmayla 10 farklı izoform oluşturabilen 18 ekzonu vardır. Sinir sisteminde bulunan en yaygın oluşumu APP 695'dir. APP, 21.gen üzerinde bulunur. Down sendromlu hastalarda trizomi 21' den dolayı daha fazla miktarda APP eksprese edilir bu sebeple AH tipi patolojinin, down sendromlu hastalarda daha erken yaşlarda geliştiği bilinmektedir. APP' nin biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. APP birçok periferik organda sentezlenir ancak birçok çalışma APP ürünlerinin nörojenesis, plastisite, sinaptik fonksiyonlar ve hücre stres yanıtı gibi roller aldığı düşünüldüğü için beyin üzerine kurgulanmıştır. Yapılan son çalışmalarda APP sentezi ve işlenmesi aksonal transport, sinaptogenezis ve periferik sinir sisteminin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. [22] [21] [23] [24]

APP, amiloidojenik yolak ve amiloidojenik olmayan yolak olmak üzere iki yolla metabolize olmaktadır. Sinaptik aktivite ile uyarılan amiloidojenik olmayan yolakta APP öncelikle α -sekretaz enzimi ile proteolitik yıkıma uğrar, sAPP α oluşur ve hücre dışı ortama salınır. İlk kesilimin ardından APP' nin küçük bir parçası olan C-terminal fragment (α -CTF veya C83 olarak da bilinir) membran içine yerleşmiş olarak kalır. Membranda kalan bu fragment γ -sekretaz tarafından tekrar kesilerek AICD (APP intrasellüler domain) ve p3 proteini oluşturulur. [23]

$A\beta$ peptidi, amiloidojenik yolakta β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri ile iki basamakta oluşturulur. Birinci basamakta APP' nin β -secretase (BACE1- β kısmı amiloid öncül protein kesen enzim 1) enzimi tarafından kesilmesi ile 99 amino asitlik C- terminal fragment (β - CTF ya da C99) ve sAPP β (çözünür APP β) oluşturulur. C99' un γ -sekretaz enzimi tarafından kesilmesiyle çözünemeyen $A\beta$ ve AICD

(amiloid öncü protein intrasellüler domain) oluşur. Çözünemeyen A β plaklarında en yaygın olarak A β_{1-40} bulunur ve ikinci en yaygın formu A β_{1-42} 'dir. Ancak amiloid birikiminin ana bileşeni ve bunlardan daha toksik olanı A β_{1-42} 'dir ve ilk çöken de A β_{1-42} olur. A β monomerleri β tabaka yapısı gösterir ve başlangıçta diffüz (gevşek) plaklar oluştururken zamanla katı plak oluşumuna katılarak yoğun nöritik (senil) plaklara dönüşürler. [19], [21], [22]

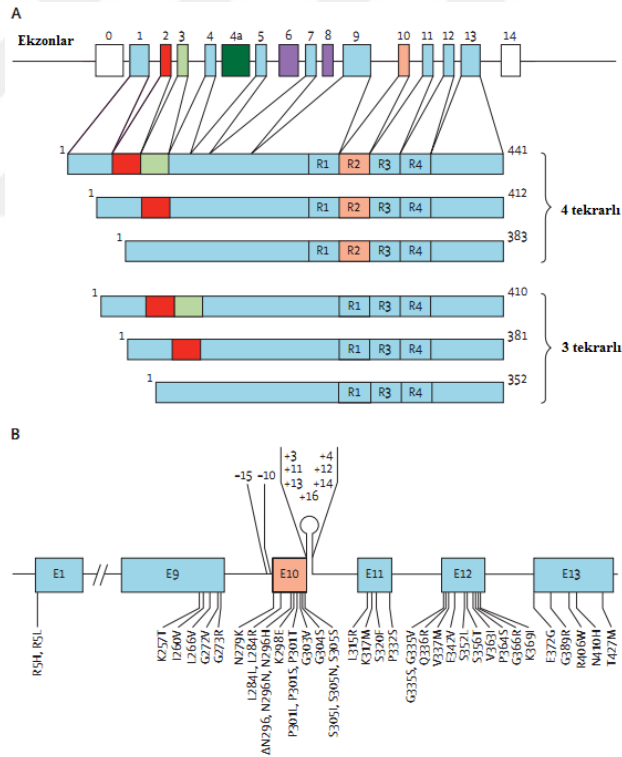
A β plaklarının AH' nin sebebi veya sonucu olduğu hakkında araştırmalar devam etmekle birlikte A β peptidlerinin aşırı üretimi ve birikimi sonucu toksik etkisinin artması nörodejenerasyonun ve bilişsel zayıflamanın birincil sebebi olarak düşünülmektedir. Hardy & Higgins ve Hardy & Selkoe' nin sunduğu "Amiloid Kaskad Hipotezi" ne göre AH patogenezinde meydana gelen birincil olay APP metabolizmasındaki anormalliklerden sonra beyinde A β birikimidir. Diğer patolojik özellikler (nörofibriler yumaklar, nöronal hasar ve hücre ölümü) daha sonra ikincil olarak ortaya çıkar. (Şekil.4.1.3.1) [21] [25]



Şekil.4.1.3.1. Amiloidojenik ve Amiloidojenik olmayan yolak [25] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

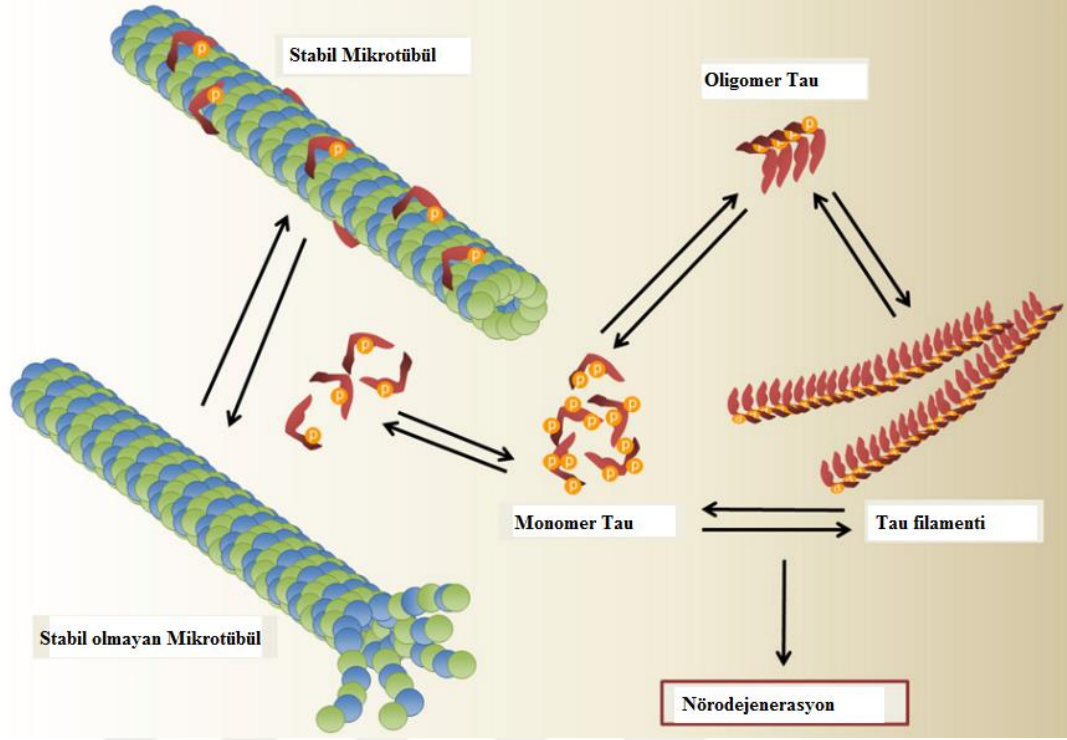
4.1.3.2.Nörofibriller Yumaklar

Tau proteini, fosforilasyona bağımlı olarak mikrotübüllerin stabilizasyonunu ve yoğunlaşmasını sağlayan ve hücre içi mikrotübül ilişkili proteindir (MAP). Tau proteini 16 ekzon içeren 17q21 kromozomunda bulunan mikrotübül asosiyasyon protein tau (*MAPT*) geni tarafından kodlanır. Günümüzde *MAPT* geninin ekzon 2,3 ve 10'un alternatif kırılması ile altı tau izoformu tanımlanmıştır. Ekzon 10'un dâhil edilmesi, her biri dört tekrarlı olmak üzere üç izoformun üretilmesi ile sonuçlanırken ekzon 10'un dâhil edilmemesi üç tekrarlı üç izoformun oluşması ile sonuçlanır. (Şekil.4.1.3.2) Tekrarlar ve bazı bitişik diziler tau proteininin mikrotübüle bağlanma alanlarını oluşturur. Sağlıklı yetişkin insanların serebral korteksinde üç tekrarlı ve dört tekrarlı tau izoformları kabaca eşittir ve dengesizlikleri nörodejenerasyon ve demansa neden olmak için yeterlidir.



Şekil.4.1.3.2. MAPT ve yetişkin insan beyinde ifade edilen altı tau izoformu. MAPT 16 ekzon (E) içerir. Alternatif kırılma ile altı izoform ortaya çıkar. 4 tekrarlayan bölgesi olan üç izoform ve üç tekrarlayan bölgesi olan üç izoform gösterilmiştir. B) MAPT ' de 42 kodlama bölgesi ve E10' da dokuz intronik mutasyon gösterilmiştir. [26] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Neokorteksin gri maddesinde, serebellumun beyaz maddesinde olduğundan yaklaşık olarak iki kat daha fazla tau proteini ifade edilir. Tau izoformları esas olarak nöronlarda bulunur ancak düşük seviyelerde de olsa glia hücrelerinde bulunabilir. Sitozolik Tau proteini nöral polarizasyon, aksonal taşınım, aksonogenesis, sinaptik fonksiyonların düzenlenmesi ve nöral sinyaller gibi fizyolojik fonksiyonları da vardır. Tau proteini hücre dışında, fosforilasyon, glikolizasyon, izomerizasyon, deaminasyon, nitrasyon, metilasyon gibi farklı post-translasyonel değişimlere uğrar. Tau fosforilasyonundaki değişikliklerin, mikrotübüller ile etkileşimini önleyerek proteinin işlev kaybını tetiklediği bilinmektedir. Tau filamentleri etkilenmiş bütün hastalıklarda tau proteini hiperfosforile olmuştur ve sonuç olarak mikrotübüllere bağlanamazlar. Sağlıklı bir insan beyinde her bir mol tau başına ortalama olarak 1,9 mol fosfat düşerken AH olan kişilerin anormal tau filamentleri her bir mol tau başına 6-8 mol fosfat taşımaktadır. Böylece sağlıklı beyine göre hasta kişilerin beyinlerinde tau proteini daha fazla fosforilasyona uğrar ve fosforile/birikmiş hücre içi tau proteini nöronlar için toksik etki oluşturur. Hiperfosforile tau proteininin anormal birikimi, nörofibriler yumaklar (NFT'ler) olarak adlandırılan hücre içi anormal agregatların oluşumuna yol açar. Alzheimer hastalığında, nörofibriler yumakla kaplanmış hücreler öldükten sonra, tau filamentleri, tau tekrar bölgesinden oluşan hayalet yumaklar olarak hücre dışı alanda kalabilirler. Bu yapılar AH, taupati, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların yaygın histopatolojik bulgularıdır.[27] [26][28]



Şekil.4.1.3.2.2. Tau hiperfosforilasyonu nörodejenerasyona yol açar. Tau, sitosolik mikrotübül stabilize edici bir proteindir. Tau hiperfosforile olduğunda, oligomerler, filamentler ve toksik NFT'ler gibi daha yüksek mertebeden yapıların oluşması eğilim artar. [29] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

4.1.4. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri

Başlangıç yaşına dayanarak AH, bütün Alzheimer hastaları vakalarının %1 ile %5 ' ini oluşturan erken başlangıçlı AH (EOAD, başlangıcı <65 yaştan önce) ve %95 ' ini oluşturan geç başlangıçlı AH (LOAD, başlangıcı >65 yaştan sonra) olarak sınıflandırılır. Klinik olarak LOAD' den ayırt edilememekle birlikte, EOAD genellikle daha hızlı ilerleme hızı ve Mendelian kalıtım ile ilişkilidir. APP proteinin yanlış kesilmesine ve A β üretimine neden olan, APP, PSEN1 ve PSEN2 genleri EOAD patofizyolojisi ile ilişkilidir. Bu üç gen içerisindeki AH' na bağlı mutasyonlar yüksek penetrans gösterir (>% 85), çoğunlukla otozomal dominant kalıtsaldır ve A β agregasyonu ve erken başlangıçlı hastalığa yol açarlar. 19q13 kromozomunda bulunan APOE ϵ 4 alleli LOAD için önemli bir risk faktörüdür. APOE, APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 ve ϵ 4 allelleri tarafından kodlanan lipid-bağlayıcı bir proteindir. APOE ϵ 4, özellikle bellek alanında düşük bilişsel performansla, hafif bilişsel bozuklukla (MCI) ve MCI' dan demansa doğru ilerlemesi ile ilişkilidir.

Hemorajik infarktlar, küçük ve büyük iskemik kortikal infarktlar, vaskülopatiler ve beyaz cevher değişiklikleri gibi serebrovasküler değişiklikler demans riskini artırır, ancak spesifik olarak altta yatan mekanizmalar belirsizliğini korur. Bu gibi rahatsızlıklar beynin talamus gibi hafıza ile ilgili bölgelerine zarar verdiği, A β birikimini arttırdığı veya bilişsel işlevi bozan inflamasyona sebep olduğu düşünülmektedir. Son olarak, hipoperfüzyon, sinaps oluşumu ve sinaptik plastisite için kritik olan bir serin-treonin kinazı olan sikline bağımlı kinaz 5'in (CDK5) aşırı ekspresyonuna yol açabilir. Aşırı CDK5 aktivasyonu nöronal apoptosise sebep olur. Bu kinazın NFT 'nin oluşumuna katkıda bulunan tau'nun aşırı fosforilasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir.

Hipertansiyon, kan-beyin bariyerinin (BBB) vasküler bütünlüğü üzerindeki etkiyle AH riskini artırabilir ve beyin dokusuna protein ekstrasvazasyonu ile sonuçlanabilir. Protein ekstrasvazasyonu, hücre hasarına, nöronal azalmaya veya sinaptik fonksiyon, apoptoz ve bilişsel bozuklukla sonuçlanan Ab birikimindeki artışa sebep olabilir.

İnsülin ve leptin Tip 2 Diyabet (T2D) 'te yer alan hormonlardır. İnsülin ve leptin, insülin homeostasisi dışında beynin farklı bölgelerinde nöronal ve sinaptik fonksiyonları düzenler ve nöronları hücre ölümüne, nörodejenerasyona, karşı korur. Ayrıca, bu hormonların β -amiloid seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir. İnsülin kan beyin bariyerini geçebilir. Beyinde hipokampus ve entorhinal korteks dâhil olmak üzere LOAD' da erken etkilenen bu yapılarda insülin reseptörleri bulunur. İnsülin degrade eden enzim (IDE) beyinde A β klirensi ile ilişkilendirilmiştir ve insülin ile Ab IDE 'nin substratı olmak için yarışır. Böylece beyindeki insülinin A β ve tau fosforilasyonunu arttırdığı düşünülmektedir.[30]

4.2.Sirtuinler

Sirtuinler, hücre yaşamı, genom stabilitesi ve instabilitesi, transkripsiyon, DNA hasarı ve tamiri, hücre sağ kalımı gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol alan, arkelerden insanlara kadar geniş bir organizma yelpazesinde bulunan NAD⁺ bağımlı enzim ailesidir. İlk defa *Saccharomyces cerevisiae*' de keşfedilen sirtuinler sessiz

bilgi düzenleyicileri (SIRs) olarak isimlendirildi ve sınıf III histon deasetilaz (HDACs) olarak sınıflandırılmıştır. [31][32]

4.2.1.Histon Deasetilazlar

Proteinler fonksiyonlarını yerine getirebilmek için bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrarlar. Bu modifikasyonlardan biri proteinlerin lizin rezidülerinden deasetillenmesidir. Asetil grupların uzaklaştırılması bir enzim ailesi olan deasetilazlar tarafından kolaylaştırılır. Bunlara örnek olarak histonların asetilasyonu verilebilir. Asetillenmiş histonlar DNA'ya bağlanamaz ve transkripsiyona izin verirken deasetillenmiş histonlar DNA'ya sıkı sıkıya bağlanır ve transkripsiyonu önler. Yani, histonların deasetilasyonu kromatinin yoğunlaşmasını böylece de gen ifadesinin baskılanmasını sağlar.[32][33]

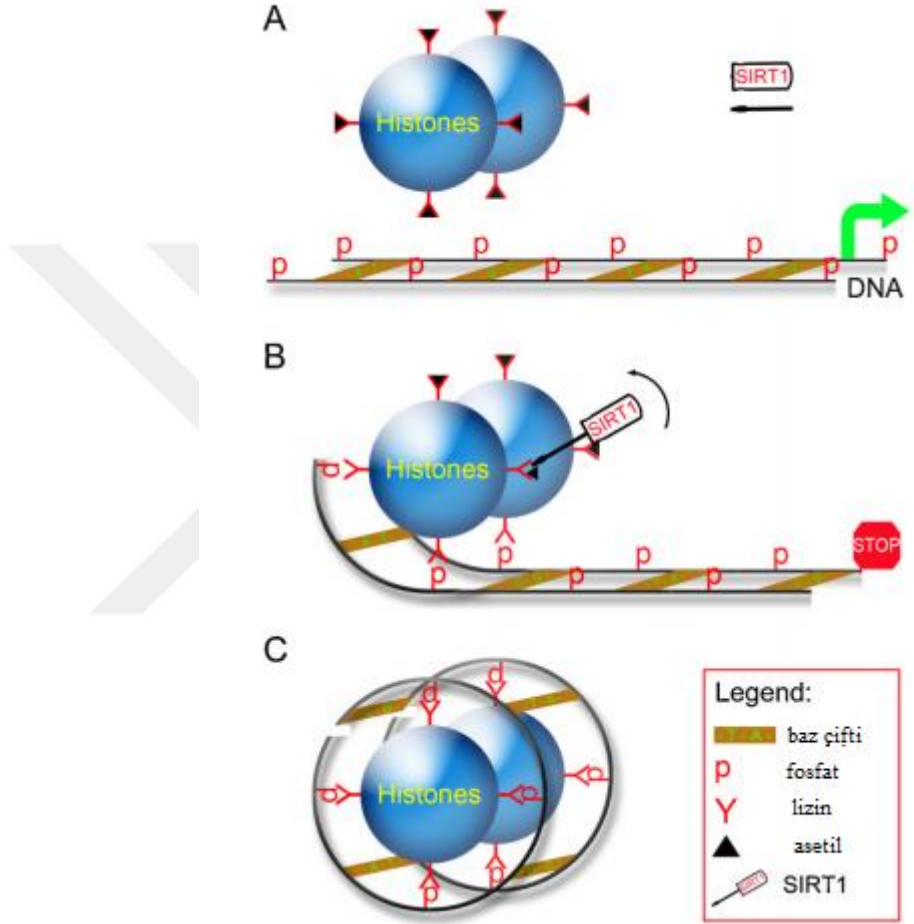
Memelilerde dört farklı deasetilaz sınıfı vardır ve sınıf III deasetilazlar kataliz için NAD^+ 'a gereksinim duymaları ile diğerlerinden ayrılırlar. Ayrıca NAD^+ bağımlı histon deasetilaz olarak da bilinirler. Farklı enzimatik aktiviteler ve fonksiyonları olan yedi adet sirtuin (SIRT1-SIRT7) vardır. (Tablo.4.2.1) [34]

Tablo.4.2.1.Memelilerde sirtuinlerin görevleri ve hücre içi konumları. [34] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Memeli Sirtüinleri	Enzimatik Aktivite	Hücre içi lokalizasyon
SIRT1	Deasetilaz	Nükleus, sitoplazmik
SIRT2	Deasetilaz	Nükleus, sitoplazmik
SIRT3	Deasetilaz	Mitokondri
SIRT4	ADP-Ribozil transferaz	Mitokondri
SIRT5	Deasetilaz	Mitokondri
SIRT6	ADP-Ribozil transferaz Deasetilaz	Mitokondri, Nükleus
SIRT7	Deasetilaz	Nükleolus

Sirtüinler, transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon ko-aktivatörleri, DNA tamir enzimleri, protein kinazlar, fosfatazlar ve tau gibi histon ve histon olmayan substratları da deasetiller. SIRT1 üzerine en çok çalışmalar yapılarak, özellikleri en iyi bilinen sirtüindir. SIRT1 deasetilaz nükleusta bulunan Histon 3 (H3)' ü lizin 9 ve

lizin 14 rezidüsünden, H4' ü lizin 16 rezidüsünden deasetilleyerek gen ifadesini baskılar böylece protein sentezini ve enerji tüketimini azaltır. (Şekil.4.2.1) [33], [35]



Şekil.4.2.1.Gen ifadesinin SIRT1 tarafından baskılanması A)SIRT1 'in aktif olmadığı zaman B)SIRT1 aktifleştiği zaman histonları deasetiller. C) Tamamen deasetillenmiş histonlar [33] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

4.2.2.SIRT1' in Moleküler Mekanizması

SIRT1, kromatinin katlanmasını, histon hipoasetilasyonu ve heterokromatin oluşumunu sağlamak gibi genom regülasyonunda çeşitli etkiler gösterir.

SIRT1, sınırlayıcı bir transkripsiyonel kofaktör olan histon asetiltransferaz p300' ün aktivitesini metabolizma ve hücrel farklılaşmanın kontrolünde negatif olarak düzenlediği düşünülmektedir.

SIRT1' in en çok dikkat çeken moleküler hedeflerinden biri de tümör baskılayıcı p53' tür. SIRT1 p53' ü birçok lizin rezidüsünden deasetilleyerek oksidatif stres ve DNA hasarlarına karşı apoptozu baskılar ve hücre sağ kalımını uzatır.

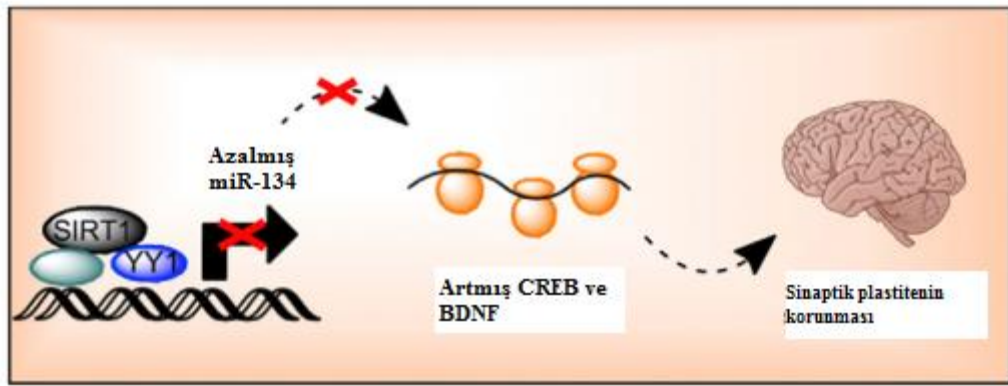
SIRT1' in hücre sağ kalımını arttırdığı başka bir alternatif yol ise FOXO (Forkhead Box O) transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesidir. Dört FOXO vardır ve şu ana kadar SIRT1' in üç izoformu deasetila ettiği gösterilmiştir: Foxo1, Foxo3a ve Foxo4. SIRT1 ayrıca, nöronlar ve fibroblastlarda Foxo3a fonksiyonunu etkiler, stres uyaranlarına yanıt olarak apoptosisi azaltır, ancak DNA onarımı ve hücre döngüsü kontrol noktası genlerinin ekspresyonunda artışa neden olur. [36]

SIRT1 aktivasyonunun veya aşırı ifadesinin mitokondriyal biyogenezi, insülin duyarlılığını, glukoz ve lipid metabolizmasını modüle ettiği gösterilmiştir. [37], [38] SIRT1 proteini adipöz doku, karaciğer ve özellikle glukoz homeostasisi ve yağ metabolizmasında önemli koruyucu fonksiyonları vardır. SIRT1 ifadesi ayrıca insülin direncine sahip olan hücrelerde pankreatik beta hücreleri etkileyerek insülin duyarlılığını artırır. SIRT1 adipöz dokuda glukoz ve yağ asidi depolanmasında önemli bir rolü olan proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) ' yı baskılar. SIRT1 ekspresyonu, uzun süreli açlık sırasında peroksizom proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α) deasetile ve aktive eder. Ek olarak SIRT1, karaciğer X reseptörü (LXR) ve farnesoid X reseptörünü (FXR) deasetile eder ve böylelikle safra asit üretimini ve ters kolesterol taşınmasını artırır. [39]

NF- κ B organizmada neredeyse bütün hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Sitoplazmada inaktif biçimde bulunan protein hücre dışından gelen uyaranlar ile aktive olmaktadır. NF- κ B sinyal yolağı merkezi sinir sisteminde önemli bir yere sahiptir. İnflamatuvar yanıt oluşumunda, nöronların sağkalımında, plastisitenin oluşumunda, uzun dönemli hafıza oluşturulmasında, dentrit ve aksonların büyüme ve gelişmesinde etkili olduğu söylenebilir. SIRT1, NF- κ B' yi p65 alt ünitesinden deasetilleyerek transkripsiyonel aktivitesini azaltır ve hücreleri apoptozdan korur. [33], [40]

SIRT1, retinoik asit reseptör betayı (RAR β) deasetiller ve α -sekretaz ADAM metallopeptidaz domain 10 (ADAM10) 'u aktive eder. ADAM10 protein seviyelerinin yükselmesi nöronlarda APP işlenmesinin α -sekretaz tarafından yapılmasını sağlar. [41]

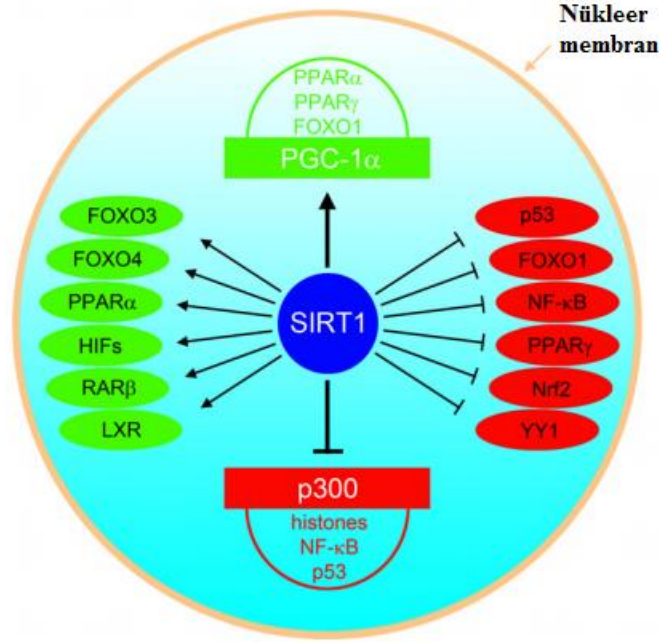
SIRT1 baskılayıcı kompleks içeren transkripsiyon faktörü Yin Yang 1 (YY1) ile etkileşime girer. YY1, miR-134' ü düzenler ve bu beyine özgü mikroRNA cAMP yanıt bağlanma proteini (CREB) ve beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ifadesini düzenler. [42]



Şekil.4.2.2.1.SIRT 1 tarafından öğrenme ve hafızanın düzenlenmesi. SIRT1, hipokampüste mikroRNA-134 düzenleyen YY1' i aracılığıyla sinaptik plastisiteyi etkiler. mikroRNA-134 cAMP ve BDNF transkripsiyonunu düzenler. Bu proteinler sinaps oluşumu ve uzun süre bunu sağlayabilmek için önemlidir. [42] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Hipoksi indüklenebilir faktörler (HIFs) oksijen sensörü olarak fonksiyon gören transkripsiyon faktörüdür. SIRT1 aktivasyonu, hipoksi indüklenebilir faktörleri 2' nin asetilasyonunu tersine çevirerek transkripsiyonunu ve eritropoetini artırır. [33]

Ksenobiyotik toksik madde ve oksidanların önemli bir sensör proteini olan Nükleer faktör-E2 ilişkili faktör 2 (Nrf2), oksidatif stres ile başa çıkmak için önemli bir hücrel savunma mekanizmasıdır. 2013 yılında yapılan bir çalışmaya göre Sirt1 Nrf2'nin nükleer birikimini, DNA'yı bağlamayı ve transkripsiyonel aktivitelerini desteklediği ve Nrf2 aşağı akım genlerinin ifadelerini arttırdığı görüldü. [43]



Şekil.4.2.2.2. SIRT1 gen transkripsiyonlarını subgenomik seviyede düzenler. [33] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

4.2.3. Alzheimer Hastalığında SIRT1 'in Rolü

Alzheimer hastalığındaki etkileri en yaygın olarak çalışılmış sirtuin, SIRT1 'dir. Yapılan çalışmalarda SIRT1' in AH' na karşı koruyucu etkisi ilk olarak kalori kısıtlaması çalışmalarında gözlemlenmiştir. Kalori kısıtlamasına (CR) adaptif yanıtların SIRT1' in aracılık ettiği gösterilmiştir. Kalori kısıtlaması, transgenik AH farelerinin beyinlerinde A β ve plak oluşumunu azaltmıştır. [44] [45] SIRT1 aktivatörleri ve SIRT1'in aşırı ifadesinin in vitro çalışmalarda hücre ölümünü ve in vivo çalışmalarda nörodejenerasyonu azalttığı gösterilmiştir. [35] [46] Bu çalışmalar SIRT1 aktivasyonunun Alzheimer Hastalığında beyin atrofisini ve nöron ölümünü azalttığını göstermektedir ve SIRT1' in nöroprotektif etkisini ortaya koymaktadır. [47][48][49] SIRT1 eksikliği, AH' na sahip bireylerin beyinlerinde artmış fosforile-tau (p-tau) seviyeleri ve nörofibriler yumakların miktarı ile ilişkilidir. [50]

SIRT1 AH' nin iki patolojik işareti olan tau ve A β ' yı hedef alır. Farelerde p-tau' nun degradasyonu bilişsel fonksiyonları artırır ve nöronal hücre ölümünü azaltır ancak tau p300 histon asetiltransferazı tarafından asetillendiğinde tau' nun yıkımı

inhibe edilir. SIRT1 asetillenmiş tau' yu deasetiller ve sonuç olarak tau' nun seviyesini azaltır. Ters olarak SIRT1' in inhibisyonu tau seviyesini ve patojenik p-tau' nun birikimini artırır. [49] [51]

SIRT1'in aşırı ifadesi fare nöronlarında α - sekretaz üretimini retinoic acid aktivasyonu (RAR) ve Rho-kinaz enziminin (ROCK1) inhibisyonu olmak üzere iki yolla uyarır. SIRT1, ROCK1 'i baskılayarak APP'nin amiloidojenik olmayan yolda işlenmesini sağlar. [52] [36]

Ayrıca, SIRT1 mikroglialarda NF- κ B yolağını inhibe ederek A β seviyesini azaltır. [47]

4.3.Eksozomlar

Ekstrasellüler veziküller (EV) ilk olarak 50 yıl önce Peter Wolf tarafından plazmada gözlemlenmiş ve bunlara “trombosit tozu” adı verilmiştir. [53] Başlangıçta, bu EV' lerin doğrudan plazma membranından tomurcuklandığı düşünülmüştür. Bununla birlikte, 1980' lerde, retikülosit olgunlaşmasını inceleyen iki grup küçük veziküllerin hücre içine doğru tomurcuklanma ile oluşturulduğunu göstermişlerdir. 1987 yılında, Rose Johnstone tarafından endozomal orijinli bu EV' ler için “eksozom” kelimesi önerilmiştir. [54]

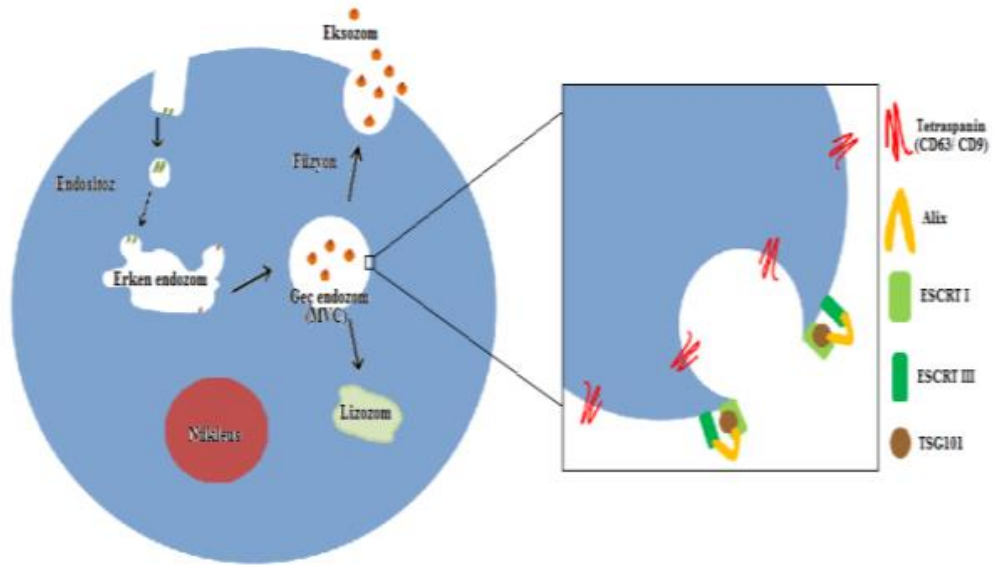
Salınım mekanizmalarına ve boyutlarına bağlı olarak eksozomlar, mikrovезiküller ve apoptotik cisimcikler olmak üzere üç ana EV türü tanımlanmıştır. Eksozom olarak da bilinen mikrovезiküller 200-1000 nanometre boyutlarında hücre membranından tomurcuklanan veziküllerdir. Apoptotik cisimcikler, apoptoz sonucu ölmekte olan hücrelerin, hücre içeriği membrana yakın bölgelerde yoğunlaşarak tomurcuklanır ve 1000-5000 nm arasında değişen çaplarda veziküller meydana getirirler. Eksozomlar çeşitli vücut sıvılarında ve ekstrasellüler alanda bulunabilen, çapları 50-150 nm arasında değişen ve bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan küçük membran vezikülleridir. [55]–[58]

Eksozomlar taşıdıkları kargo içerikleri ile diğer ekstrasellüler veziküllerden ayrılırlar. Eksozom içeriği köken aldığı hücreye göre ve hücrenin o anki durumuna göre farklılık göstermektedir. Eksozomlar protein, lipid ve nükleik asitleri salgılandığı hücreden alıcı hücrelere taşırlar. Bu nedenle merkezi sinir sisteminde

hücreler arası iletişimde, nöronal tamir ve büyümede, antijen sunumu ve immün yanıt regülasyonunda önemli roller alırlar. [59][60]

Eksozom biyogenezi endozomal sistemde başlar. Plazma membranının içe doğru kıvrılması ile erken endozomlar oluşur. Erken endozomlar da kendi içlerine doğru kıvrılarak intraluminal vezikülleri (ILV) oluştururlar. Böylece erken endozomlar olgunlaşarak geç endozomu oluşturur. Geç endozomlar içerisinde lümenlerinde vezikül bulundurmaları ile karakterize edilirler ve multi veziküler cisimcik (MVC) olarak adlandırılırlar. MVC 'ler trans-golgi ağı üzerinden lizozoma gönderilip sindirilerek ortadan kaldırılabilir veya plazma membranından ekzositozla hücre dışına salınarak eksozomları oluştururlar. [57], [58]

ILV'lerin oluşumunda yer alan Taşınım için gerekli endozomal ayırma kompleks proteinleri (*Endosomal sorting complexes required for transport- ESCRT*) tanımı 2000'li yılların başında başlamıştır. ESCRT 0, I, II, III olmak üzere 4 protein kompleksinden oluşmaktadır. ESCRT-0, ubiquitin bağımlı bir şekilde kargo kümelenmesinden sorumludur. ESCRT-I ve ESCRT-II membran tomurcuk oluşumunu uyarır. ESCRT- III tomurcuklanan membranın hücreden ayrılmasını sağlar. Bu mekanizma İLV membranında bulunan ESCRT-1, Tsg101, ALIX ve ESCRT-3 kompleksinin oluşmasıyla sağlanır. [54], [58]



Şekil.4.3.Eksozomların oluşumu ve hücreden salınımı [58]

4.3.1 Alzheimer Hastalığı' nda Eksozomların Rolü

Merkezi sinir sisteminde nöron, astrosit, oligodndrosit ve mikroglia gibi hücrelerin birçoğunda eksozom salınabilmektedir ve nöronal gelişim, rejenerasyon ve sinaptik fonksiyonların düzenlenmesi gibi önemli işlevlere katılırlar. Eksozomların ana işlevleri arasında hücreden atıkları uzaklaştırmak, immun yanıtı düzenlemek ve nöronlar arasında iletişimi sağlamaktır. Eksozomlar hücrelere reseptör-ligand etkileşimi, endositoz ve fagositoz gibi yollarla alınarak hücreler arası iletişimi sağlar. [61]

Alzheimer hastalığında görülen patojenik A β ve tau proteinlerinin eksozomlar tarafından taşındığı ve bu proteinlerin beyinde yayılmasına katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Eksozomların AH' nda astrositlerin apoptozunu uyardığı ve bu nedenle hastalığın ilerlemesi sırasında nöronal fonksiyonları bozduğu düşünülmektedir. Öte yandan, eksozomların AH' nın tanı ve tedavisinde faydalanılmasından, hücre dışı amiloid yükünü azaltmadan, hastalığın erken biyo belirteçleri olarak kullanılmasına kadar birçok yoldan yararlı olabileceğini belirten çalışmalar da vardır. [4]

Tablo.4.3.Alzheimer Hastalığında eksozomların farklı rolleri [55]

AH'nda Eksozomların Pozitif Roller	<ul style="list-style-type: none">• Toksik Aβ oligomerlerini ayırarak uzun süreli hafızayı korur.• İn vivo olarak Aβ seviyelerinin ve birikimini azaltır.• Nörotoksik Aβ oligomerlerine bağlanarak nötralize eder ve nöroprotektif etki gösterir.	<ul style="list-style-type: none">• An ve arkadaşları (2013) [62]• Yuyama ve Arkadaşları (2014) [63]• Falke ve arkadaşları (2016) [64]
AH'nda Eksozomların Negatif Roller	<ul style="list-style-type: none">• Eksozom yüzeyinde bulunan lipidlerin ilk Aβ birikimleri için bağlanma bölgesi içermesi.• AH olan bireylerin beyinlerinde plaklarla ilişkili eksozomal proteinlerin bulunması.	<ul style="list-style-type: none">• Rajendran ve arkadaşları (2006) [65]

5.MATERYAL VE METOT

5.1.Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal malzemeler, ticari kit ve araç-gereçler tablolarda sunulmuştur.

Tablo 5.1.1.Deneylerde kullanılan cihazların listesi

Su banyosu

Thermo Fischer Scientific Soğutmalı Santrifüj

İnkübatör

Zeiss Axio Mikroskop

Thermo Maxisafe 2020 Sınıf II Biyolojik
Güvenlik Kabini

Bio-Rad ChemiDoc XRS+ system and Image
Lab

Hassas Terazi

-80 °C buzdolabı

-20 °C buzdolabı

+4 °C buzdolabı

Thermo Scientific Hera Term Fırın

Hemositometre

Mikrosantrifüj

Invitrogen Novex Mini-Cell Elektroforez Jel
Sistemi

İnvitrogen iBlot™ Kuru Transfer Sistemi

Mikropipet - Serolojik Pipet

Implen Spektrofotometre

Çalkalayıcı ROCKER 3D Digital

Vorteks

Ultra Saf Su Cihazı

Masaüstü pH metre

Otoklav

Tablo 5.1.2.Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kit Listesi

Kimyasallar ve Kitler	Markası
High Glucose DMEM	Gibco, ThermoFisher Scientific
Fetal Bovine Serum	Gibco, ThermoFisher Scientific
Fetal Bovine Serum, exosome depleted	Gibco, ThermoFisher Scientific
PBS	Biosera (Molgen Biotechnology)
Tripsin	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
Penisilin/Streptomisin	Biosera (Molgen Biotechnology)
Amyloid β Peptide (1-42)	Abcam
NuPAGE™ %4-12 Bis-Tris Protein Jel, 1.0 mm, 15-kuyucuklu	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
NuPAGE™ %4-12 Bis-Tris Protein Jel, 1.0 mm, 10-kuyucuklu	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
SIRT1 Aktivatörü II (CAY10602)	Merck Millipore
NuPAGE™ Antioxidant	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling Technology, Inc.

SIRT1 Activator II	Calbiochem, Merck KGaA
Pierce™ LDH Sitotoksisite Kiti	ThermoFisher Scientific
β-Mercaptoethanol	Merck
DMSO	Santa Cruz
SDS	Merck
NH ₄ OH	Merck
Tris Base	Merck
NaCl	Merck
HCl	Merck
Tween 20	Merck
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad
Advansta -Western Bright Sirius	Biocompare
Süt Tozu	Santa Cruz
Total Antioxidant Status Deneş Kiti	Rel Assay Diagnostic
Total Oxidant Status Deneş Kiti	Rel Assay Diagnostic
Triton X-100	Merck
Poly-L-Lysine	Merck
Eksozom İzolasyon Kiti	Norgen Biotek

Tablo 5.1.3.Deneylerde kullanılan antikorlar

Antikorlar	Markası
β -Aktin (8H10D10) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.
Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
GSK-3 α/β (D75D3) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
Phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9) (D17D2) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
Phospho-Akt (Ser473) (587F11) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
PTEN (138G6) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
Phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-AKT1 + AKT2 + AKT3 Antibody	Life Science Biotechnology, Inc.
mTOR (2972) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.
Tsg 101	Santa Cruz

Tablo 5.1.4.Deneylerde kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Markası
Invitrogen™ Novex™ iBlot™ 2 Nitrocellulose Transfer Stacks	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
iBlot™ Transfer Stack, PVDF membran	Invitrogen, ThermoFisher Scientific
15 ve 50 ml'lik falcon tüp	Capp
25 ve 75 cm ² 'lik flask	Santa Cruz
2 ml'lik cryo tüpler	Corning
96 kuyucuklu mikrolaka	Corning
6 kuyucuklu plaka	Corning
1,5 ml -0,5 ml'lik mikrotüp	Capp
5-10-25 ml'lik serolojik pipet uçları	Capp

5.2. Metot

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı ATCC'den alınmıştır. SH-SY5Y hücre hattı DMEM besiyeri (%10 FBS, %1 Penisilin/ Streptomisin içeren High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium) ile kültüre edildi.

5.2.1. CAY10602 LDH Analizi

Laktat Dehidrogenaz (LDH) hemen hemen her hücrede bulunan sitozolik bir enzimdir. Hücre membran bütünlüğünün bozulduğu durumlarda hücre dışı ortama salınır. SH-SY5Y hücrelerinin canlılık testi için LDH sitotoksitesite test kiti üreticinin (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit- Thermo Scientific) protokolüne göre uygulandı. SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakaya ekildi ve hücre ekiminden 24 saat sonra sırası ile üç tekrarlı olarak 5 μ M - 10 μ M - 20 μ M - 40 μ M - 60 μ M - 80 μ M konsantrasyonlarında SIRT1 Aktivatör II 'ye (Kimyasal isimlendirmesi: CAY 10602 veya 3-(Benzenesulfonyl)-1-(4-fluorophenyl)pyrrolo [4,5-b]quinoxalin-2 amine 'dir.) maruz bırakıldı. Maksimum LDH aktivitesini ölçmek için üç kuyuya sadece hücre ekildi ve spontan LDH aktivitesini ölçmek için 3 kuyuya 10 μ l steril, ultra saf H₂O eklendi. 96 'lık plaka 37°C, %5 CO₂ şartlarında 24 saat inkübe edildi. Maksimum LDH aktivitesini ölçmek için sadece hücre ekilmiş olan ve madde uygulanmamış 3 kuyuya, kite ait 10 μ l lizis tamponu eklendi ve 37°C'de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra örneklerden sırası ile 50 μ l alınarak yeni bir 96'lık plakaya aktarıldı. Yeni plakadaki her bir kuyuya 50 μ l kite ait reaksiyon karışımı eklenir ve ışıktan korunarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. 30 dakikanın sonunda kite ait 50 μ l durdurucu solüsyon eklenerek 630 nm' de CHROMATE reader cihazında okutuldu.

5.2.2. A β ₁₋₄₂ Toksikite Modeli Oluşturma

Hücreler her bir kuyucukta 10000 hücre olacak şekilde 96'lık plakaya ekildi. A β ₁₋₄₂ 'nin etkin dozunu bulmak için 24 saat sonra dört farklı konsantrasyonda (1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M) A β ₁₋₄₂ uygulandı. A β ₁₋₄₂ %1' lik NH₄OH 'da çözdürüldü. Hücre canlılığını ölçmek için Laktat dehidrojenez (Roche, Cat

No:11644793001) deneyi yapıldı. LDH analizinin çalışma solüsyonu üreticinin talimatlarına göre hazırlandı ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca tam karanlıkta inkübe edildi. Hücrelerimizin kültürlendiği ortam, orijinal plakanın tam olarak aynı sırasıyla yeni 96 kuyucuklu bir plakaya alındı. Hücre kültürü ortamını içeren her bir kuyucuğa son hacmi 200 µl'ye tamamlamak için 100 µl LDH çalışma solüsyonu eklenmiştir. 96'lık plaka 492 nm' de CHROMATE cihazında okutuldu.

5.2.3.SH-SY5Y Hücre Kültürü

5.2.3.1.SH-SY5Y Hücre Hattının Çözdürülmesi ve Ekimi

-80 °C dolapta muhafaza edilen hücreler alınarak 37°C su banyosunda dikkatlice eritildi ve 37°C ' de önceden ısıtılmış 8 ml High Glucose DMEM besiyeri (%10 FBS, %1 Penisilin/ Streptomisin içeren High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium) içeren 15 ml'lik falcon tüpe aktarıldı. Hücreler 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve 37°C su banyosunda önceden ısıtılmış 5 ml besiyeri ile pipetaj yapılarak pelletin çözülmesi sağlandı. Oluşturulan 5 ml hücre süspansiyonu 25 cm² flaska ekildi ve flask 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ şartlarındaki inkübatöre kaldırıldı. İki gün sonra hücrelerin tutunduğu gözlemlendi ve flastdaki besiyeri uzaklaştırılarak 37°C' de ısıtılmış 4 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 37°C'de ısıtılmış 5 ml besiyeri flaska eklenerek besiyeri tazeleme işlemi yapıldı.

5.2.3.2.SH-SY5Y Hücre Hattının Pasajlanması

Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında yeni bir flaska pasajlandı. Flastdaki besiyeri serolojik pipetle uzaklaştırıldı. Hücreleri yıkamak için 3 ml PBS flastın kenarından dikkatlice flaska aktarıldı. PBS serolojik pipet kullanılarak uzaklaştırıldı. Flaska tutunan hücreleri yerinden kaldırmak için 500 µl Tripsin eklendi. Tripsinin etkin çalışması için flask 37 °C inkübatörde iki dakika inkübe edildi. İki dakika sonunda tripsini etkisiz kılmak için flaska 5 ml besiyeri eklendi. Hücreleri flasttan ayırmak için flask içerisinde pipetle al-ver yapılır. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik falcona alınarak 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve 5 ml besiyeri eklenerek bir kaç defa pipetle al-ver yapıldı. Bu hücre süspansiyonundan 650 µl alınarak daha önce 10 ml besiyeri eklenmiş T75 cm² flaska ekim yapıldı. Hücreler %5 CO₂ ve 37 °C' de inkübe edildi.

5.2.3.3.SH-SY5Y Hücre Hattının Dondurulması

Pasajlama protokolündeki hücre ekimi yapıldıktan sonra kalan hücre süspansiyonu 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj devam ederken hücre dondurmak için 1035 µl DMEM, 300 µl FBS, 150µl DMSO ve 15 µl penisilin/streptomisin içeren dondurucu besiyeri hazırlandı. Santrifüjden sonra üst faz uzaklaştırıldı ve hazırlanılan dondurucu besiyeri hücrelerin üzerine eklenerek al-ver yapıldı ve cryo vialer aktararak -20°C dolapta donana kadar bekledikten sonra -80 °C dolaba kaldırıldı.

5.2.3.4.SH-SY5Y Hücre Hattının Altı Kuyucuklu Plakaya Aktarılması

Polilizin, l-lizin veya d-lizin aminoasitlerinin pozitif yüklü bir sentetik polimeridir. Poli-L-Lizin herhangi bir biyolojik aktiviteyi uyardıktan sonra flask yüzeyinin yükünün değişmesini sağlayarak hücre adezyonunu, gelişimini ve yayılmasını kolaylaştırır. Hücreler 6 kuyucuklu plakaya aktarılmadan önce kuyucukların tabanı Poli-L-Lizin ile kaplandı. 1.2 ml PLL, 10,8 dH₂O ile dilue edildi ve her bir kuyuya 1 ml dilue edilmiş PLL aktararak 2 saat beklendi. Daha sonra her bir kuyu 750 µl ddH₂O ile üç defa yıkanarak 6 kuyucuklu plaka ekime hazırlandı. Daha önce T75 cm² flaska ekilmiş olan hücreler inkübatörden laminar kabine alındı ve besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 5 ml PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. 1300 µl tripsin eklenerek 37°C inkübatörde iki dakika inkübe edildi. Tripsinin etkinliğini ortadan kaldırmak için 11,7 ml High Glucose DMEM eklendi. Hücre süspansiyonu 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Sonra üst faz uzaklaştırıldı ve 5 ml High Glucose DMEM eklenerek falconda al-ver yapılarak pelletin ayrışması sağlandı. Bu süspansiyondan 10 µl alınarak hemositometrede hücre sayımı yapıldı. İki adet altı kuyucuklu plaka olmak üzere her bir kuyucuğa 20x10⁴ hücre ekimi yapıldı.

5.4.3.SH-SY5Y Hücrelerinin Aβ ve SIRT 1 Aktivatör II ile Muamelesi

Madde uygulaması yapılmadan önce inkübatörde bulunan 6' lı plakalar laminar kabine alındı ve besi ortamları uzaklaştırıldı.750 µl PBS ile kuyular yıkandı, bu aşamada kuyuların kurumamasına dikkat edildi. Daha önce hazırlanmış, 37°C' de ısıtılmış ve içerisinde eksozom olmayan DMEM (%10 exosome-depleted FBS, %1

Penisilin/ Streptomisin içeren High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium) ile besi ortamları yenilendi. Bu aşama eksozom izolasyonu için önem taşır.

A β (1- 42), 1 ml %1' lik NH₄OH içerisinde çözdürülerek 37°C ısıtıcıda 48 saat boyunca inkübe edilerek hazırlandı. Stok A β çözeltisi 221,5 μ M olarak hazırlandı. Uygulamada istenen konsantrasyona göre besi ortamı içinde seyreltilerek kullanıldı. A β ' nin kuyudaki son konsantrasyonu 10 μ M olarak kullanılmıştır ve madde eklendikten sonra 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

SIRT 1 Aktivatör II uygulaması için, 59,75 mM konsantrasyona sahip olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlandı ve -20 °C buzdolabında alikotlanarak muhafaza edildi. Uygulamada istenen konsantrasyona göre besi ortamı içinde seyreltilerek kullanıldı. SIRT 1 Aktivatör II' nin kuyudaki son konsantrasyonu 20 μ M olarak kullanıldı ve madde eklendikten sonra 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

Bağımsız değişkeni uygulamak üzere çözücülerin (DMSO ve NH₄OH) etkisini de değerlendirmek için vehikül kontrol grupları oluşturuldu.

Tablo 5.2.4.1. Madde Uygulamaları ve Gruplar

Gruplar	0.Saat	48.Saat	72.Saat	96.Saat
Kontrol Grubu	H Ü C R E E K İ M İ	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	H Ü C R E L E R İ N T O P L A N M A S I
CAY10602 Vehikülü		DMSO	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	
A β Vehikülü		%1'lik NH ₄ OH	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	
Sadece CAY10602		CAY10602	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	
Sadece A β		A β	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	
(CAY10602+A β)		(CAY10602+A β)	Herhangi bir madde uygulanmamıştır	
A β +CAY10602		A β	CAY10602	
CAY10602+A β		CAY10602	A β	

5.2.4.Total Protein İzolasyonu

Hücreler 96. Saate ulaştığında plakalar inkübatörden laminar kabine alınarak besi ortamı eksozom izolasyonunda kullanılmak üzere 2 ml' lik mikrotüplere aktarıldı ve muhafaza edilmek üzere -20 °C buzdolabına konuldu.

Protein izole etmek için lizis tampon kullanıldı. Bu lizis solüsyonu 150 mM NaCl, %1 Triton-X-100, 50 mM Tris (pH:8) ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak hazırlandı. Kuyucuklar iki defa 1 ml PBS ile yıkandı ve 15 ml'lik falcon tüplere aktarıldı. 200 g' de 5 dakika +4 °C' de santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve 100 µl lizis tampon eklendi. Falconlarda al- ver yapılarak pelletin ayrılması sağlandı ve mikrotüplere aktarıldı. 25 dakika buzda inkübasyona bırakılan mikrotüpler inkübasyon süresi boyunca 5x10 saniye vortekslendi. Örnekler, +4 °C' de 1400 g' de 15 dakika mikro santrifüjde santrifüj edildi. Üst fazlar, 500µl' lik mikro tüplere aktarılarak kullanılana kadar -20 °C buzdolabına kaldırıldı ve muhafaza edildi.

5.2.4.1. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini yapmak için örnekler 1:50 oranında distile su ile dilue edildi. Protein miktar tayininde Implen Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Her bir örnek üç defa ölçüldü ve ortalaması alındı. Ortalaması alınan değer 50 ile çarpıldı 1 ml hücre lizatındaki asıl protein miktarı elde edildi. Örneklerin protein miktarları µgr/µl cinsinden hesaplandı.

5.2.5.Protein Jel Elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi proteinleri, moleküler ağırlığına bağlı olarak elektroforetik hareketliliklerine göre tanımlamak ve ayırmak için kullanılan moleküler bir tekniktir. SDS, proteinlerin tersiyer yapısını tahrip eden anyonik bir deterjandır. Proteinlerdeki disülfid bağları, bu yöntemde ditiyotritol (DTT) kullanımı ile yok edildi. SDS-PAGE, western blotlama deneylerinden önce gerçekleştirildi. 1.0 mm, 15-kuyucuklu NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Jel, dikey elektroferez sistemine saf sudan geçirilerek yerleştirildi.

50 ml NuPAGE™ MES SDS yürütme tamponunun üzerine (20X) , 950 ml distile su eklenerek dilue edilerek hazırlandı ve jel elektroforez sistemine yüklendi. Yükleme yapılacak her bir örnek 40 µgr/ml olacak şekilde LDS örnek tamponu, indirgeyici ajan ve ddH₂O ile karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler 70 °C ısıtıcıda 10 dakika denatüre edildi. Proteinlerin ayrıştırılması için hazırlanan %4-12'lik SDS-PAGE jelin ilk kuyusuna boyalı işaretleyici, devamında protein örnekleri yüklenerek önce 110 V' ta 15 dakika daha sonra 150V'ta 1 saat süreyle yürütüldü. Proteinlerin iyi ayrıştığı belirlenmesinin ardından Western Blot çalışmalarındaki ikinci basamak olan transfer aşamasına geçildi.

5.2.5.1.Transfer

Transfer aşamasında kullanılan tamponlar aşağıdaki sunulmuştur.

Tablo 5.2.6.1.1.Transfer basamağı için kullanılan tamponun hazırlanışı

Transfer Tamponu	Hazırlanışı
20X TBS	48.8gr Tris Baz + 160gr NaCl + 800ml Distile su, Ph 7,6' ya ayarlandıktan sonra tampon 1L' ye tamamlandı.
1X TBS-T	50ml 20X TBS + 950ml distile su + %0,2 Tween-20

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel kasetinden çıkarılarak 1XTBS-T' den geçirildi ve nitrosellüloz alt transfer yığını üzerine alındı. Filtre kâğıdı TBS-T 'den geçirilerek jelin üzerine yerleştirildi. Filtre kâğıdının üzerine nitrosellüloz üst transfer yığını yerleştirildi. Transfer süngeri transfer cihazının kapağına yerleştirildi ve jel yığını transfer cihazına yerleştirilerek 7 dakika kuru transfer yapıldı.

Transfer tamamlandıktan sonra membran spesifik olmayan reaksiyon odaklarının bloke edilmesi amacıyla 1X TBST ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde bir saat bekletildi.

5.2.5.2.Primer/sekonder antikor ile muamele ve kemilüminesan reaksiyonu

Primer ve sekonder antikorlar 1X TBST ile %5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde aşağıdaki Tablo 5.2.5.2.1’de gösterilen oranlarda hazırlandı.

Tablo 5.2.5.6.1.Kullanılan antikorlar ve son konsantrasyonları

Antikor	Konsantrasyon
β -Aktin	1:2500
SIRT1	1:2500
p-GSK 3 α/β	1:1000
t-GSK 3 α/β	1:1000
p-PTEN	1:500
t-PTEN	1:1000
p-AKT	1:500
t-AKT	1:1000
p-mTOR	1:500
t-mTOR	1:1000
Anti- Mouse IgG	1:2500
Anti-Rabbit IgG	1:2500
Tsg101	1:500

Primer antikor inkübasyon +4°C’de bir gece uygulandı ve sonrasında membran 1XTBST ile 3 defa 5dk 20 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Ardından sekonder antikorinkübasyonu oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı ve membran 1X TBST ile 3defa 5dk 20 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Görüntüleme işlemine geçildi. Kemilüminesan görüntüleme için ECL kiti içerisindeki substratlar 1:1 oranında karıştırılarak, asetat kağıdı üzerine alınan membrana eklendi. 2 dakika inkübe edildikten sonra membran büyüklüğünde kesilmiş asetat kâğıdı ile membran hava kalmayacak şekilde kapatılarak Bio-Rad ChemiDoc XRS+ görüntüleme cihazında görüntülendi. Western blotlama sonucunda elde edilen bantların derecelendirilmesi ImageJ programı ile belirlendi.

5.2.5.3.Membran Stripleme

Önceden elektroforez sisteminde yürütülmüş ve görüntüleri alınmış olan p-AKT, p-PTEN, p-mTOR, p-GSK 3 α/β membranlarına strip yapılarak sırası ile t-AKT, t-PTEN, t-mTOR, t-GSK 3 α/β proteinleri için tekrar tayin yapıldı. Bunun için önce membranlar 2x5 dakika TBS-T ile yıkandı. Strip tamponu (Tris Hcl - 1 M, pH 6,8- , SDS, ddH₂O, β -mercaptoethanol) hazırlanarak 10 ml strip solüsyonunda 55 °C fırında birinci stripte 12 dakika, ikinci striplerde 7 dakika bekletildi. Fırınlamadan sonra 4x5 dakika ve 1x10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. TBS-T ile hazırlanmış %5 ' lik yağsız süt tozu ile 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Primer antikor ile bir gece +4 °C'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından sekonder antikor inkübasyonu oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı ve membran 1X TBST ile 3 defa 5dk 20 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Görüntüleme işlemine geçildi. Kemilüminesan görüntüleme için ECL kiti içerisindeki substratlar 1:1 oranında karıştırılarak, asetat kağıdı üzerine alınan membrana eklendi. 2 dakika inkübe edildikten sonra membran büyüklüğünde kesilmiş asetat kâğıdı ile membran hava kalmayacak şekilde kapatılarak Bio-Rad ChemiDoc XRS+ görüntüleme cihazında görüntülendi. Western blotlama sonucunda elde edilen bantların derecelendirilmesi ImageJ programı ile belirlendi.

5.2.6.Toplam Antioksidan Statü ve Toplam Oksidatif Durum Analizi

Toplam Antioksidan Statü (TAS) ve Toplam Oksidatif Statü (TOS) tahlilleri, kit kullanılarak imalatçının tarifine göre (Rel Assay Diagnostics ®, Gaziantep, Türkiye) gerçekleştirildi. Numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemektedir. 660 nm'de absorbans değişikliği, numunenin toplam antioksidan seviyesiyle ilişkilidir. Test geleneksel olarak bir vitamin E analogu olan Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan 55 dengeli bir antioksidan standart solüsyon ile kalibre edildi. Numunede bulunan oksidanlar demirli iyon çelatlayıcı kompleksini ferrik iyonu oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bolca bulunan arttırıcı moleküller tarafından uzatılır. Demir iyonu, asitli bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilgilidir. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edildi

ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edildi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşit / L).

5.2.7.Eksozom İzolasyonu

Eksozom izolasyonu için Tablo 5.2.4.1' de sunulan deney gruplarının besiyerlerinden Norgen Biotek Hücre Kültürü Besiyeri Eksozom Saflaştırma Kit' i kullanılarak eksozom izolasyonu yapılmıştır. $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekleyen besiyerleri buza alınarak erimesi beklendi. Mediumlar eridikten sonra 15 dakika 200 g 'de santrifüj edildi. Supernatantlar eppendorflara aktarıldı ve ticari kitin tarifine göre kitte bulunan reaktifler kullanılarak eksozomların saflaştırılması sağlandı.

5.2.8.Eksozom İmmuno Çökeltme

İzolasyonları yapılmış olan eksozomlar eppendorflara aktarıldı ve üzerlerine eksozom yüzey belirteci olan 2' şer μl Alix eklenerek $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcıda 16 saat inkübe edildi. Böylece eksozomların işaretlenmesi sağlandı.

Eksozomların immuno çökeltme için Pure Proteome Protein G Manyetik boncuklar kullanılmıştır. Başlangıçta manyetik boncuklar %0,1 Tween-20 içeren 1XPBS ile yıkandı. 16 saat Alix ile inkübe edilmiş olan eksozom örnekleri manyetik boncukların üzerine eklendi ve manyetik raka alındı. Manyetik raka alınan örnekler üç defa $500\text{ }\mu\text{l}$ %0,1 Tween-20 içeren 1XPBS ile yıkandı. İmmuno çökeltme yaptıktan sonra örneklere indirgeyici ajan, lityum dodesil sülfat ve saf su eklenerek $70\text{ }^\circ\text{C}$ ısıtıcıda 10 dakika denatüre edildi. Hazırlanan örneklerden western blot deneyi yapıldı.

5.2.10. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler one way ANOVA ile SPSS programında yapıldı. $P\leq 0.05$ olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

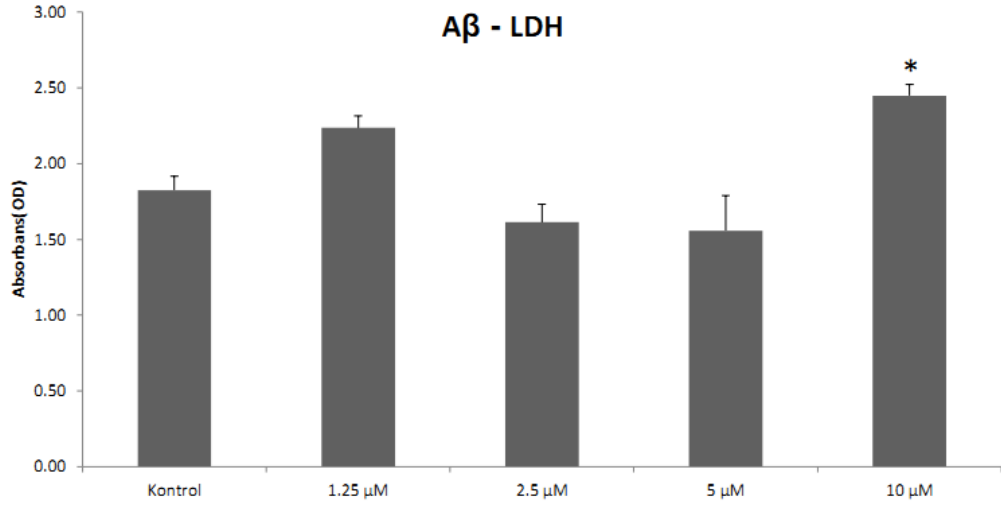
6.BULGULAR

Bu çalışmada SH-SY5Y hücre hattında A β toksisitesi oluşturularak ve SIRT1 aktivatörü uygulanarak sekiz farklı grup oluşturulmuştur. Çalışma grupları aşağıda sunulmuştur.

1. Kontrol Grubu
2. CAY10602 Vehikülü - 48.saatte SIRT1 'in çözücüsü olan DMSO uygulanmıştır.
3. A β Vehikülü -48.saatte A β 'nin çözücüsü olan %1'lik NH₄OH uygulanmıştır.
4. Sadece CAY10602 - 48.saatte uygulanmıştır.
5. Sadece A β - 48.saatte uygulanmıştır.
6. (A β +CAY10602) – 48.Saatte hem CAY10602 hem de A β uygulanmıştır.
7. A β + CAY10602 – 48.saatte A β , 72.saatte CAY10602 uygulanmıştır.
8. CAY10602 + A β – 48.saatte CAY10602, 72.saatte A β uygulanmıştır.

6.1. A β (1-42) Toksikite Modeli

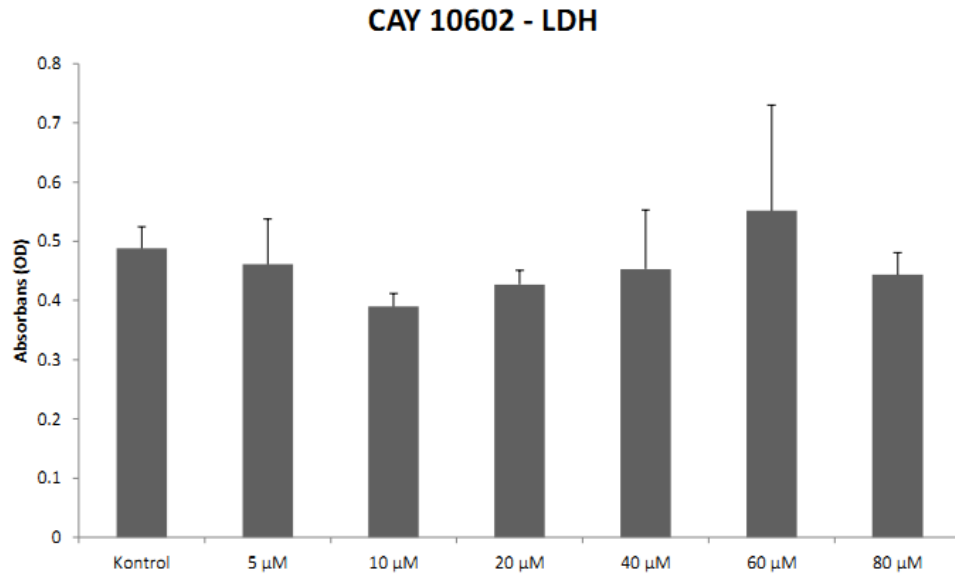
SH-SY5Y hücre hattında A β toksisitesi oluşturmak için 4 farklı konsantrasyon (1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M) ile LDH testi yapılmıştır ve hücre toksisitesi için en etkin doz 10 μ M A β (1-42) olarak bulunmuştur.



Şekil 6.1.492 nm' de ölçülmüş A β konsantrasyonları

6.2.CAY10602 LDH Analizi

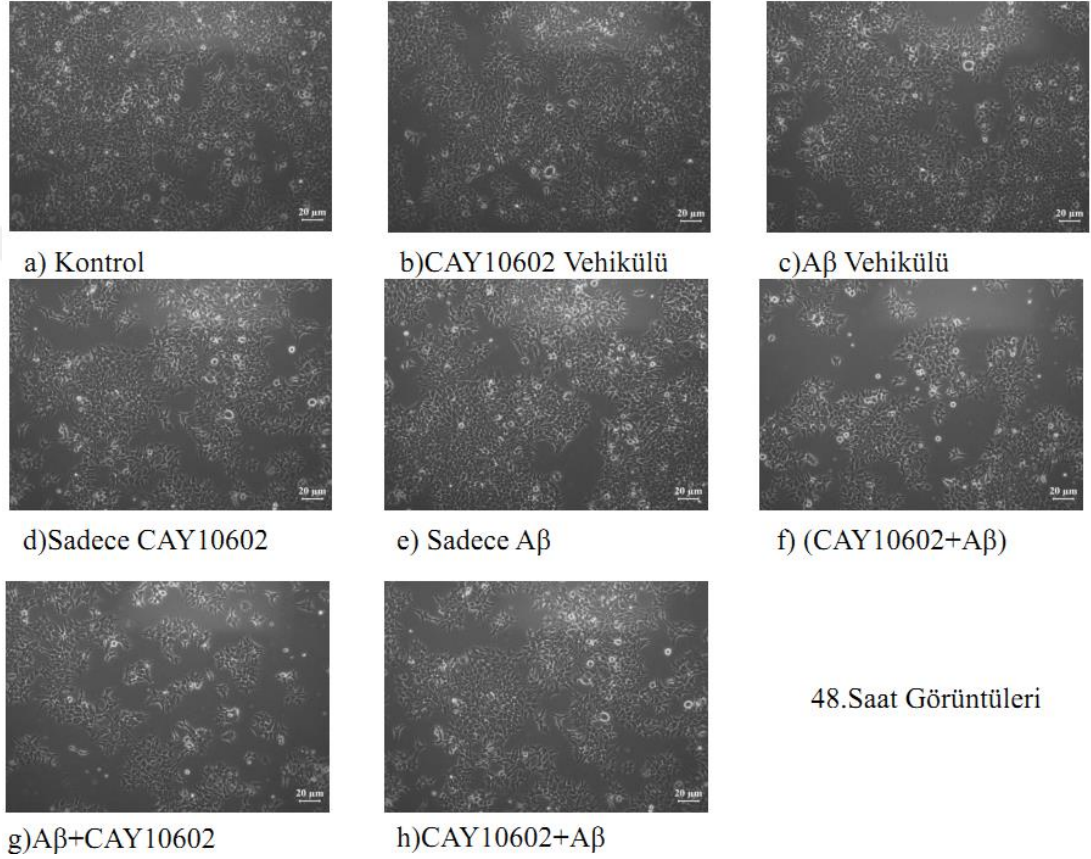
SH-SY5Y hücre hattında SIRT1' i aktive eden en uygun dozu bulmak için altı farklı konsantrasyonda (5 μ M – 10 μ M – 20 μ M – 40 μ M – 60 μ M - 80 μ M) CAY10602 uygulanmıştır. Yapılan istatistiksel analize göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



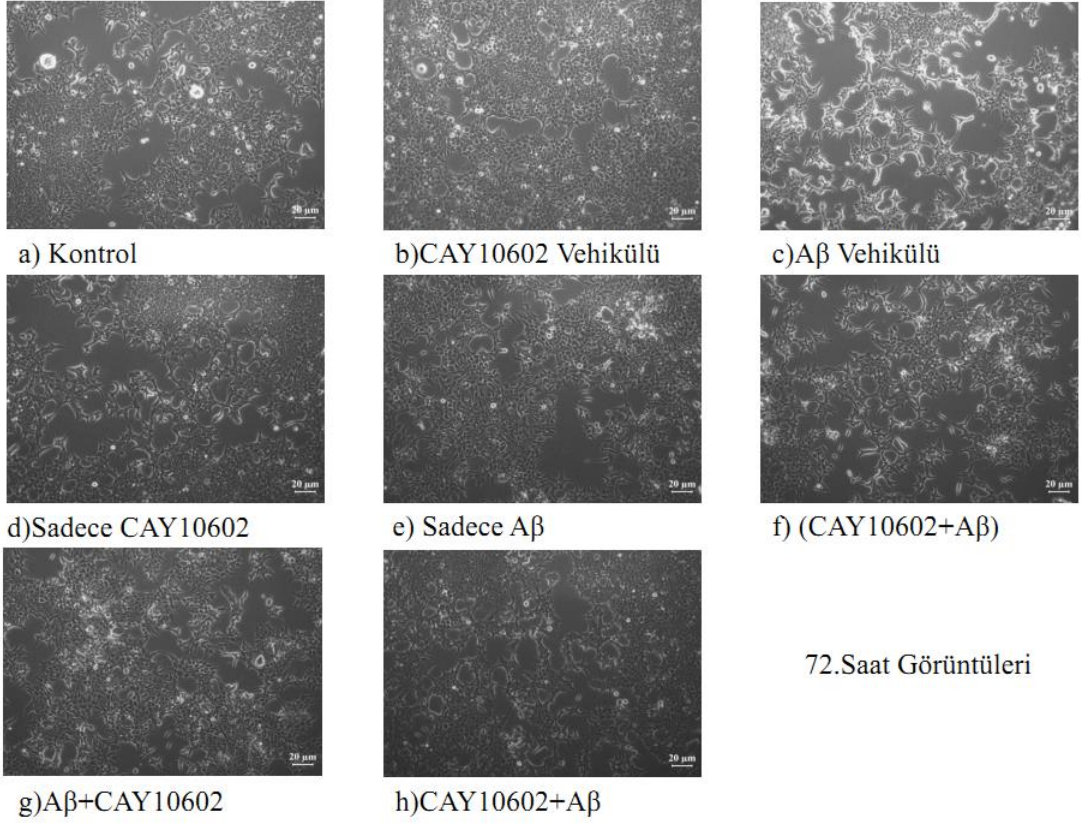
Şekil.6.2.1.SIRT1 aktivatörü olan CAY10602' ye ait LDH deneyi.

6.3.Hücre Mikroskop Görüntüleri

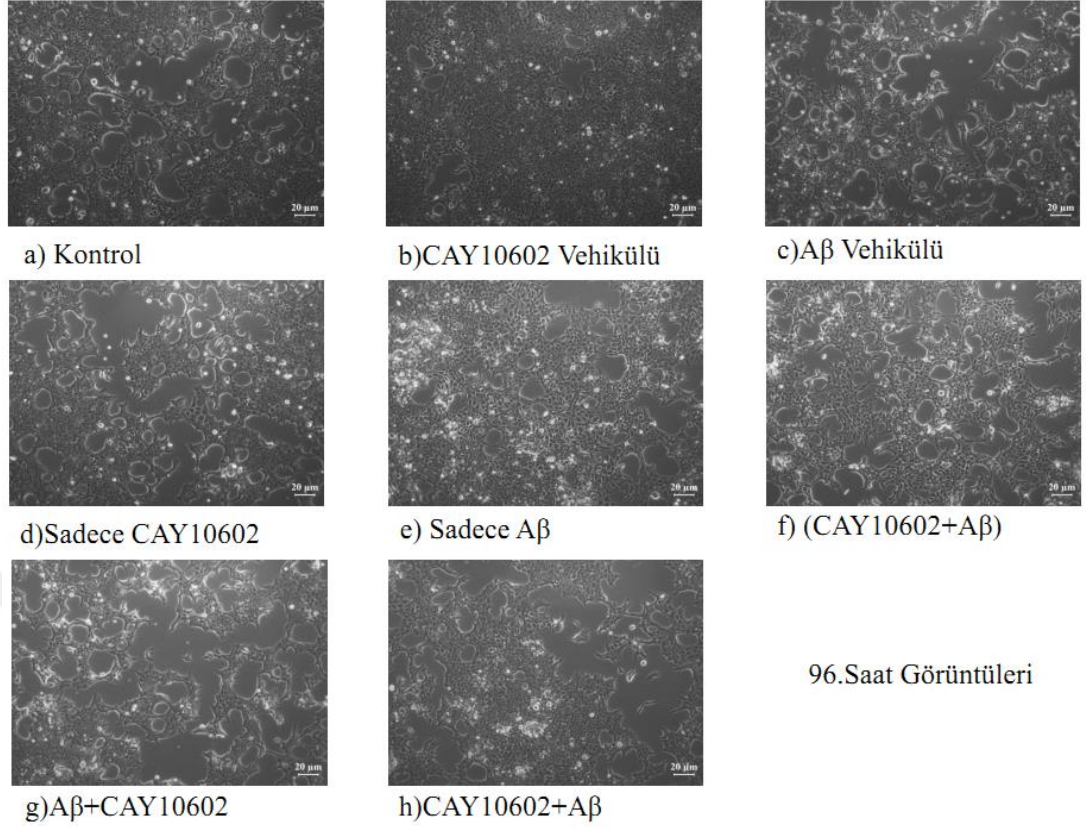
SH-SY5Y hücrelerinin madde uygulamalarının ilk yapıldığı saat olan hücre ekimden sonraki 48.saat, ikinci madde uygulamalarının yapıldığı 72.saat ve hücreler toplanmadan önceki 96.saat görüntüleri alınmıştır. 96 saatlik sürede hücrelerin morfolojilerinin değiştiği ve hücre yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir.



Şekil.6.4.1.Hücre ekiminden 48 saat sonra **a)** Kontrol **b)** CAY10602 Vehikülü; **c)** Aβ vehikülü **d)** Sadece CAY10602(48.saat) **e)** Sadece Aβ (48.saat) **f)** (Aβ + CAY10602) 48.saat **g)** Aβ (48.saat) +CAY10602(72.saat) **h)** CAY10602(48.saat)+ Aβ (72.saat) (Zeiss Primovert inverted microscope, ABD; 10x objektif)



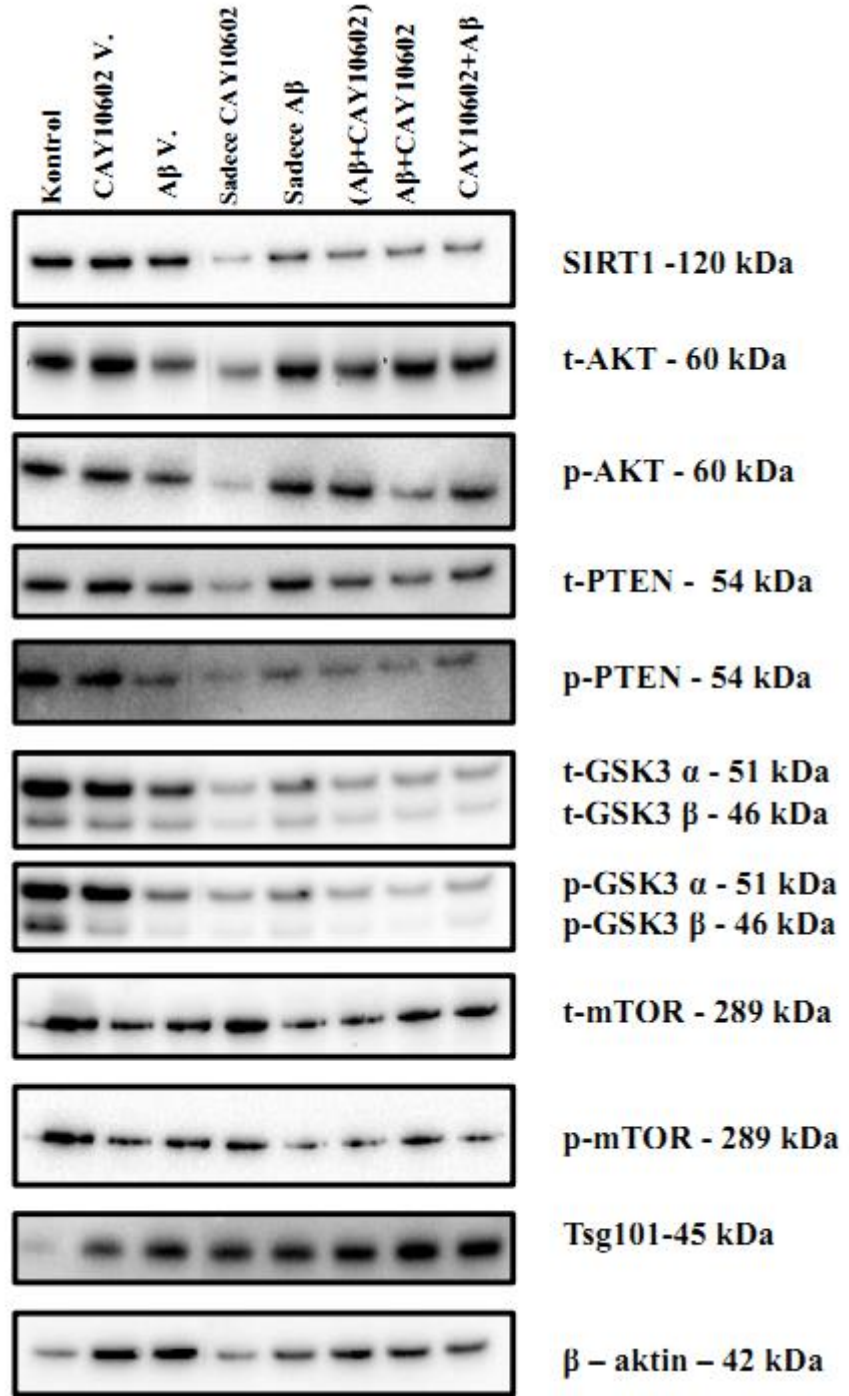
Şekil.6.4.2.Hücre ekiminden 72 saat sonra **a)** kontrol **b)** CAY10602 Vehikülü; **c)** A β vehikülü **d)** Sadece CAY10602 (48.saat) **e)** Sadece A β (48.saat) **f)** (A β + CAY10602) 48.saat **g)** A β (48.saat) +CAY10602(72.saat) **h)** CAY10602(48.saat)+ A β (72.saat) (Zeiss Primovert inverted microscope, ABD; 10x objektif)



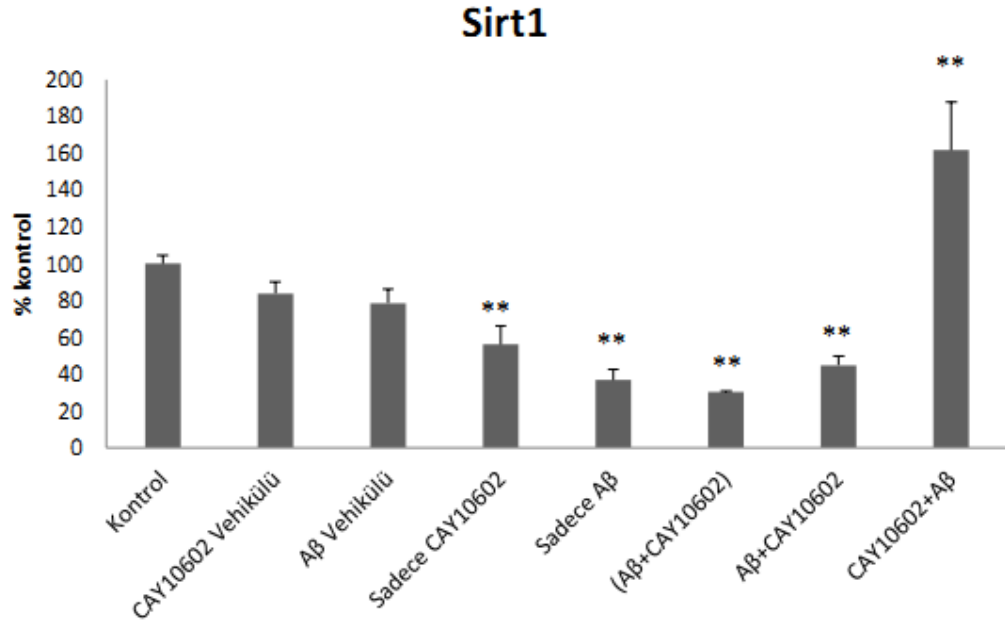
Şekil.6.4.3.Hücre ekiminden 96 saat sonra **a)** kontrol **b)** CAY10602 Vehikülü; **c)** A β vehikülü **d)** Sadece CAY10602(48.saat) **e)** Sadece A β (48.saat) **f)** (A β + CAY10602) 48.saat **g)** A β (48.saat) +CAY10602(72.saat) **h)** CAY10602(48.saat)+ A β (72.saat) (Zeiss Primovert inverted microscope, ABD; 10x objektif)

6.4.Protein Ekspresyonları

A $\beta_{(1-42)}$ toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattına bir SIRT1 aktivatörü olan CAY10602 (20 μ M) uygulanarak SIRT1, p-AKT, t-AKT, p-PTEN , t-PTEN, p-GSK3 α , t- GSK3 α , p-GSK3 β , t-GSK3 β , p- mTOR , t-mTOR CAY10602' nin protein düzeylerine etkisi incelenmiştir.

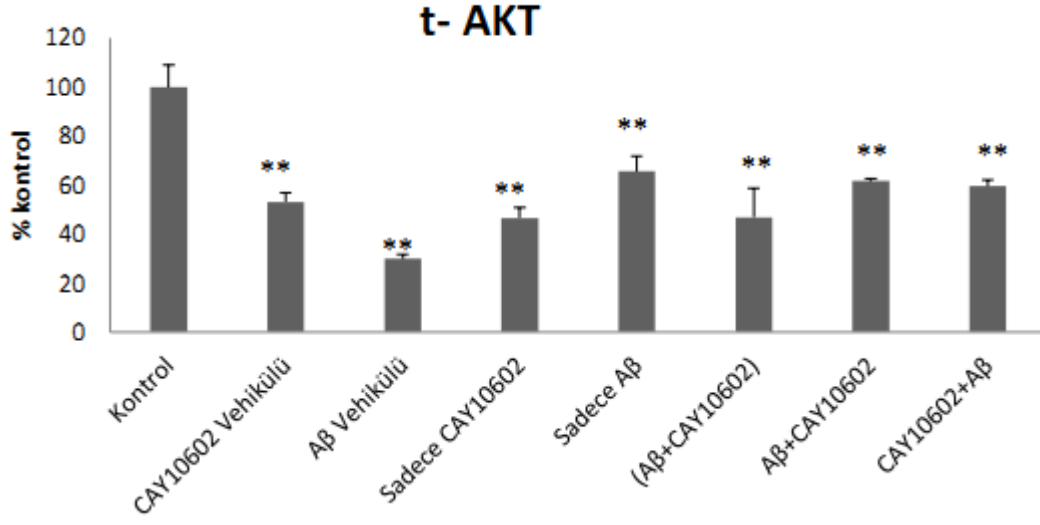


Şekil.6.5. Western Yöntemi ile tayin edilmiş proteinlerin bant görüntüleri



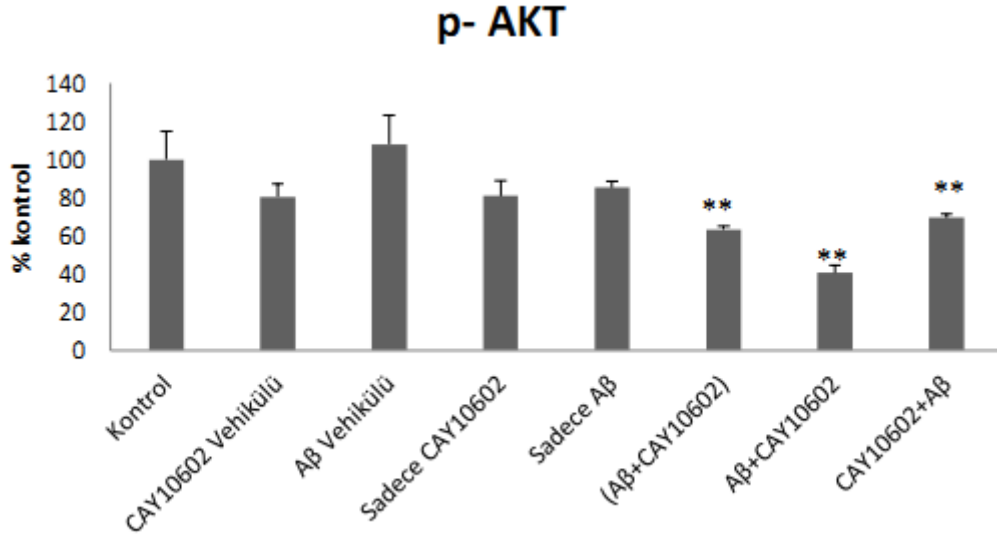
Şekil.6.5.1. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre SIRT1 ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında sadece CAY10602 uygulanan grup, sadece A β , (A β +CAY10602) uygulanan grup ve A β +CAY10602 uygulanan grupta SIRT1 protein seviyesinde anlamlı azalmalar gözlenirken CAY10602+A β grubunda kontrol grubuna göre anlamlı seviyede SIRT1 artışı gözlemlenmiştir.



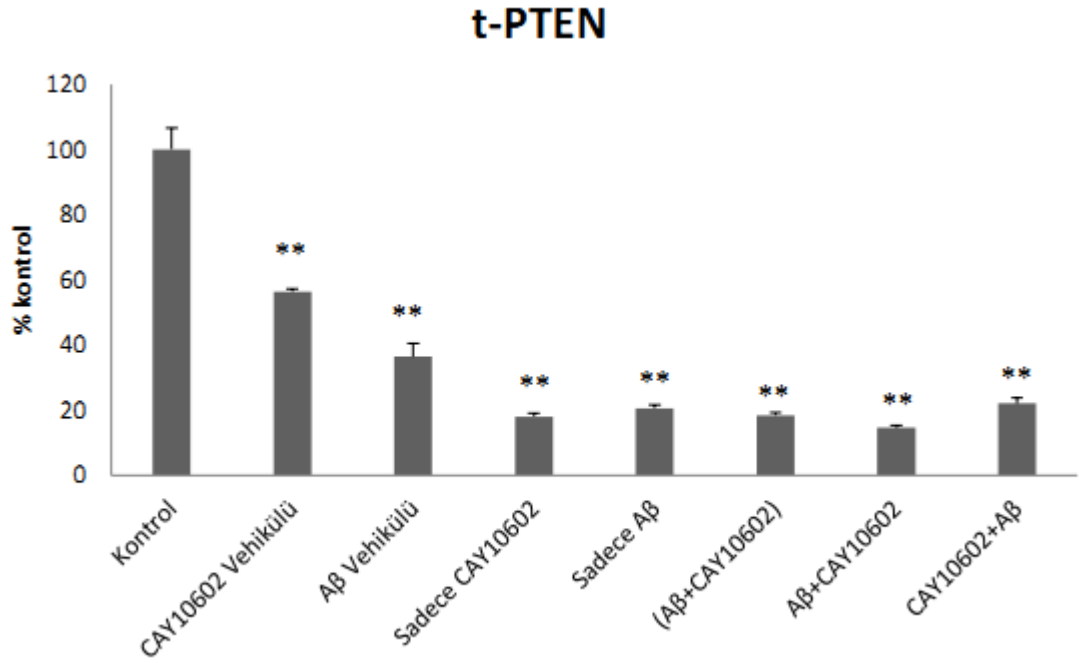
Şekil.6.5.2. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-AKT ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında, CAY10602 vehikülü, A β vehikülü, sadece CAY10602, sadece A β , (A β +CAY10602), A β +CAY10602, CAY10602+ A β uygulanan gruplarda t-AKT proteini kontrol grubuna göre anlamlı seviyede azalmalar göstererek ifade edilmiştir.



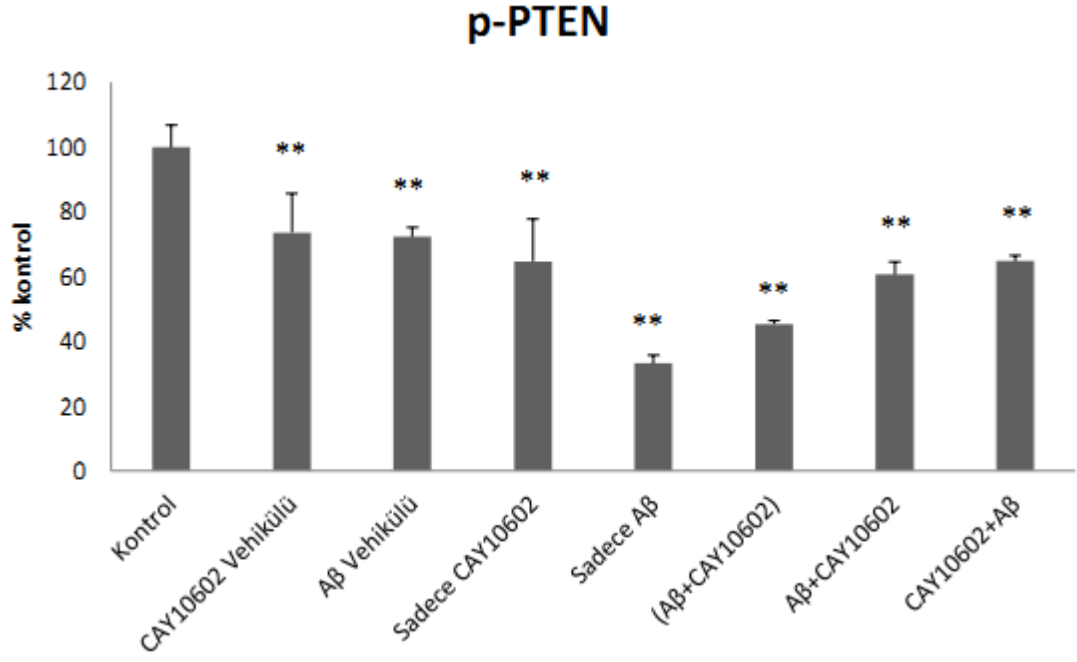
Şekil.6.5.3. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-AKT ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında (A β +CAY10602), A β +CAY10602 ve CAY10602+A β gruplarında kontrol grubuna göre p-AKT proteini anlamlı seviyede azalmalar göstermiştir.



Şekil.6.5.4. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-PTEN ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

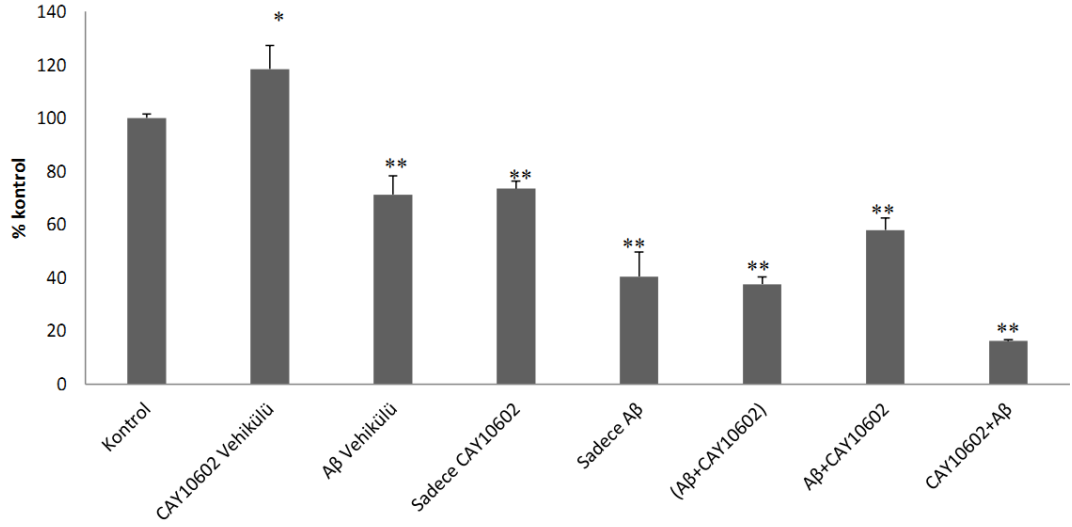
A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında bütün gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı seviyede t-PTEN proteinin azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil.6.5.5. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-PTEN ekspresyonunun değişimi. (*: p<0.05, **: p<0.01)

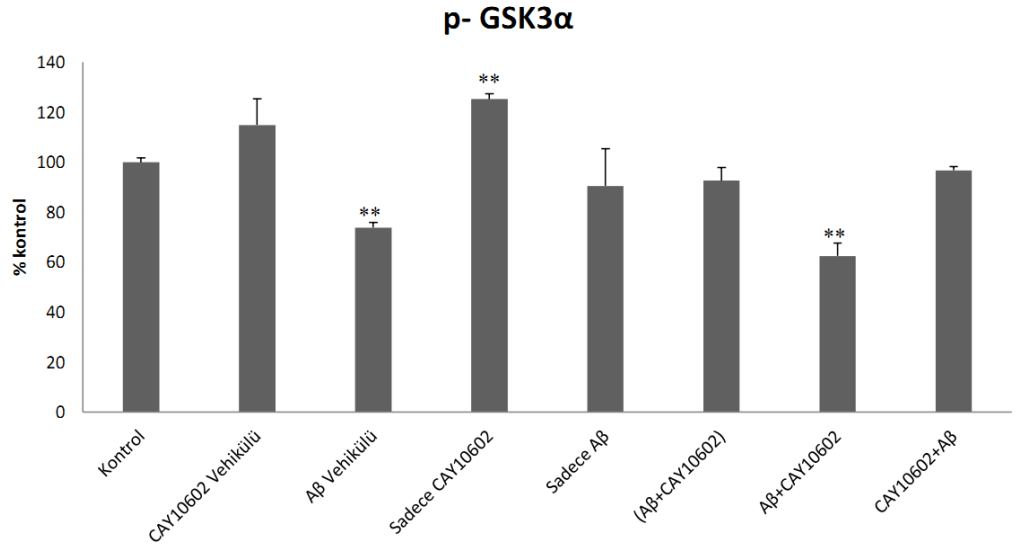
A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında CAY10602 vehikülü, A β vehikülü, sadece CAY10602, sadece A β , (A β +CAY10602), A β +CAY10602, CAY10602+A β gruplarında kontrol grubuna göre p-PTEN protein ekspresyonlarında anlamlı seviyede azalma gözlemlenmektedir.

t- GSK3 α



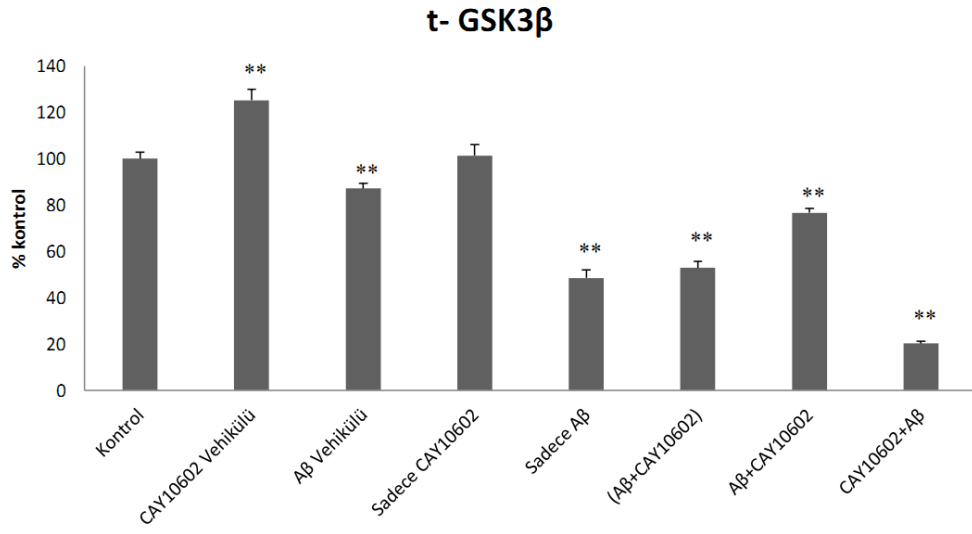
Şekil.6.5.6. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-GSK3 α ekspresyonunun değişimi. (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında CAY10602 vehikülünde kontrole göre anlamlı seviyede artış gözlemlenmişken A β vehikülü, sadece CAY10602, sadece A β , (A β +CAY10602), A β +CAY10602, CAY10602+A β gruplarında t-GSK3 α protein seviyelerinde anlamlı seviyede azalmalar görülmüştür.



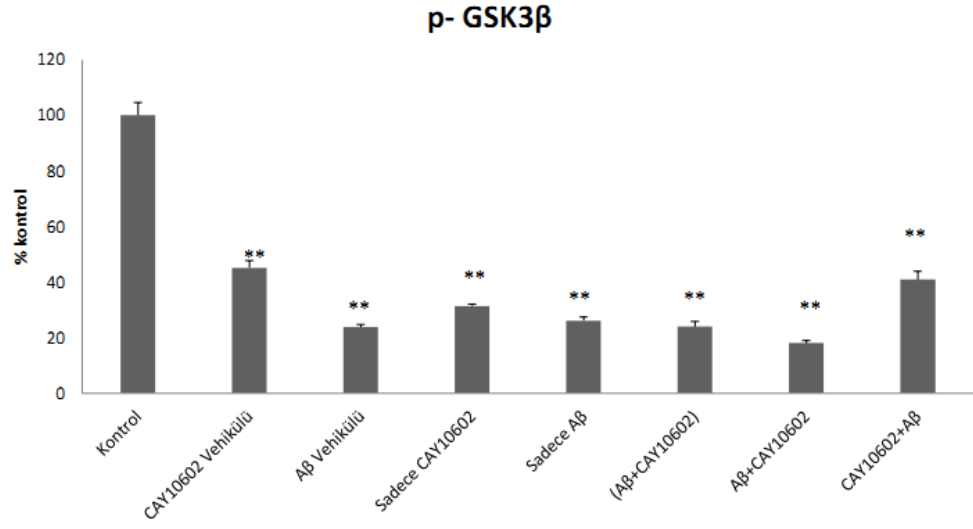
Şekil.6.5.7. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-GSK3 α ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında A β vehikülü, A β +CAY10602 gruplarında kontrole göre anlamlı seviyede p-GSK3 α ' nın azaldığı görülmüştür. Sadece CAY10602 grubunda kontrol grubuna göre p-GSK3 α ' nın anlamlı seviyede arttığı görülmüştür.



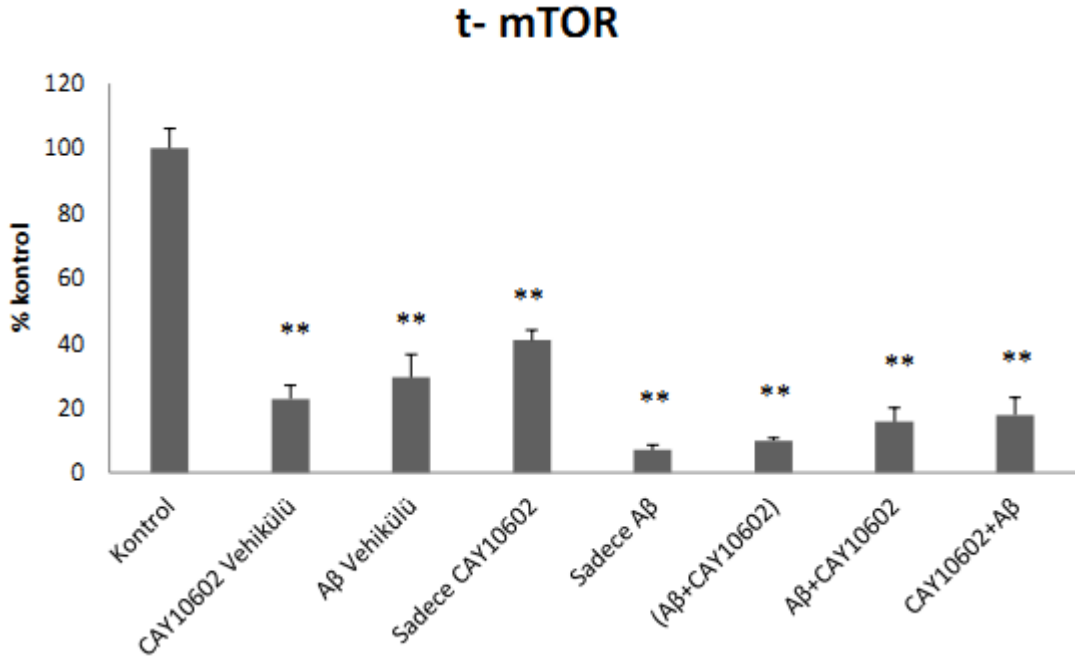
Şekil.6.5.8. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-GSK3 β ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında A β vehikülü, sadece A β , (A β +CAY10602), A β +CAY10602, CAY10602+A β deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı seviyede t-GSK3 β ' nin azaldığı görülmektedir. CAY10602 vehikül deney grubunda ise kontrol grubuna göre t-GSK3 β ' nin anlamlı seviyede arttığı gözlemlenmiştir.



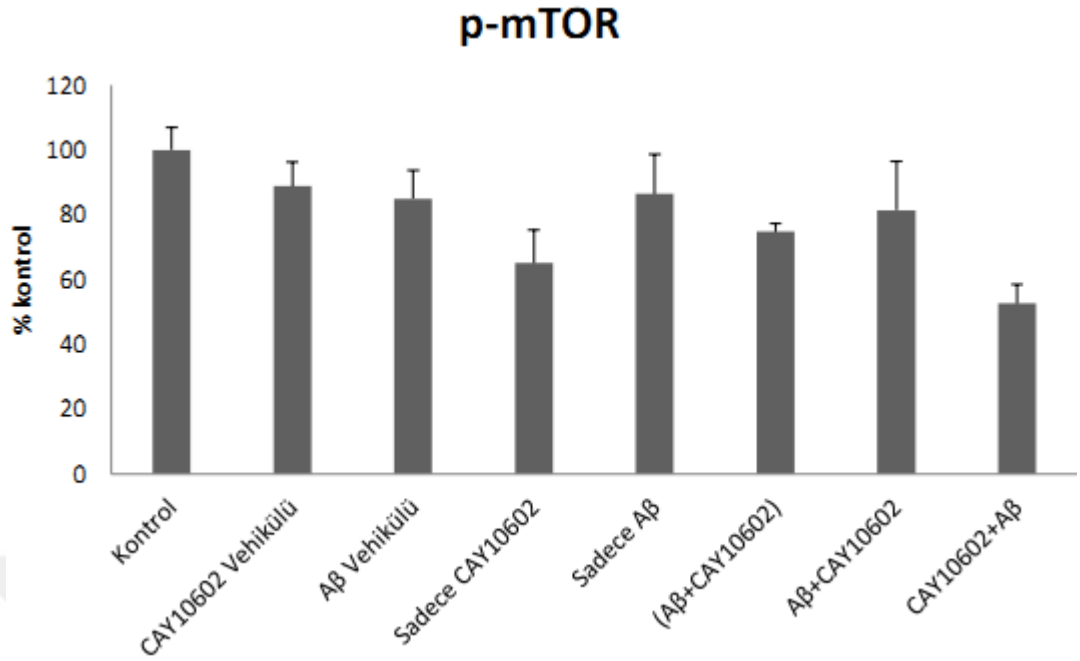
Şekil.6.5.9. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-GSK3 β ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında p-GSK3 β ' nın kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı seviyede azaldığı gözlemlenmiştir.



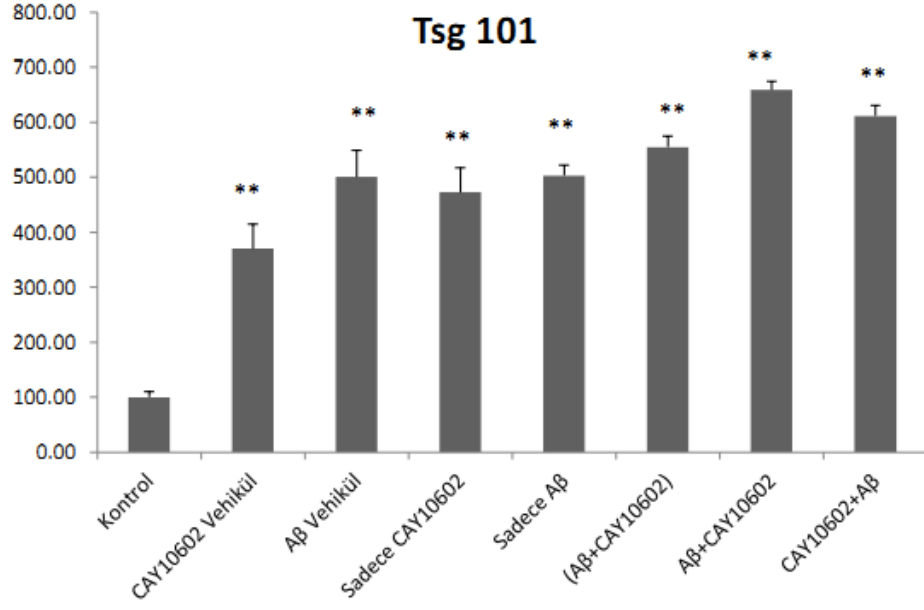
Şekil.6.5.9. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre t-mTOR ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında t-mTOR' un ekspresyonu kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı seviyede azalmıştır.



Şekil.6.5.10. A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre p-mTOR ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

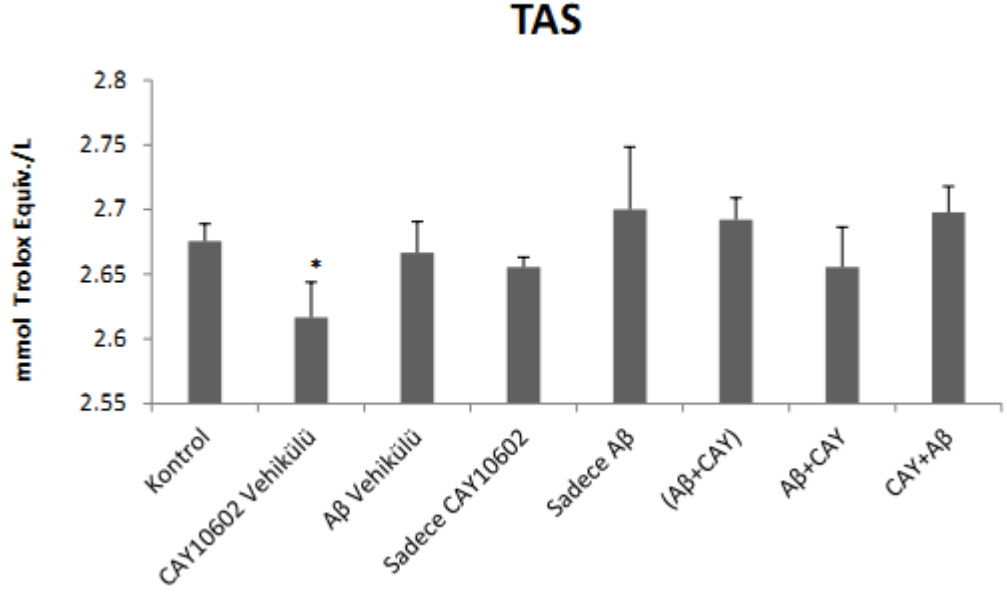
A β (1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında p-mTOR ekspresyon düzeylerinde kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı seviyede bir farklılık görülmemiştir.



Şekil.6.5.11. Aβ(1-42) toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında deney gruplarına göre Tsg101 ekspresyonunun değişimi (*: p<0.05, **: p<0.01)

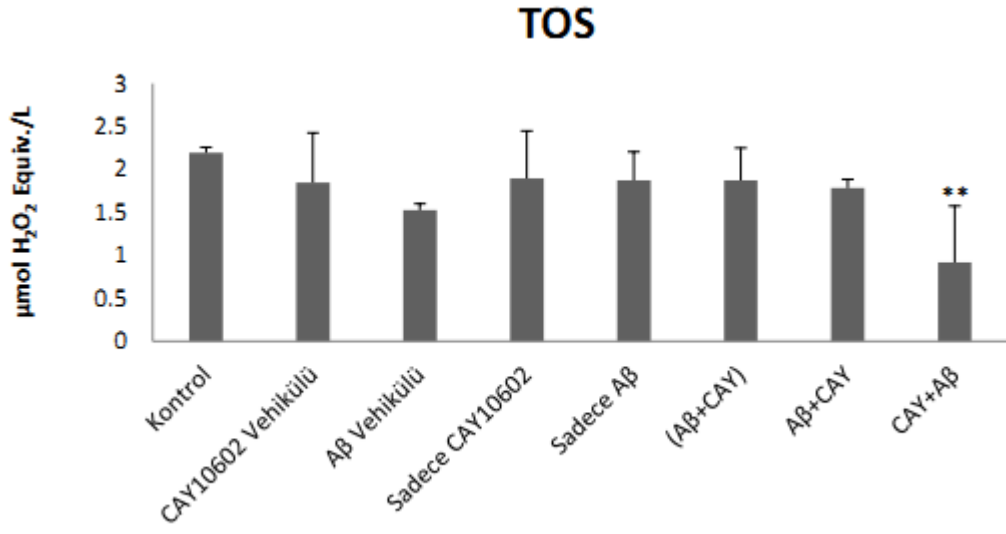
Hücre besiyerinden izole edilen eksozomların immuno çöktürme yapılmasıyla eksozom yüzey belirteci olan Tsg101 proteininin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldığında bütün gruplarda anlamlı seviyede Tsg101 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir.

6.5.TAS/ TOS / OSI



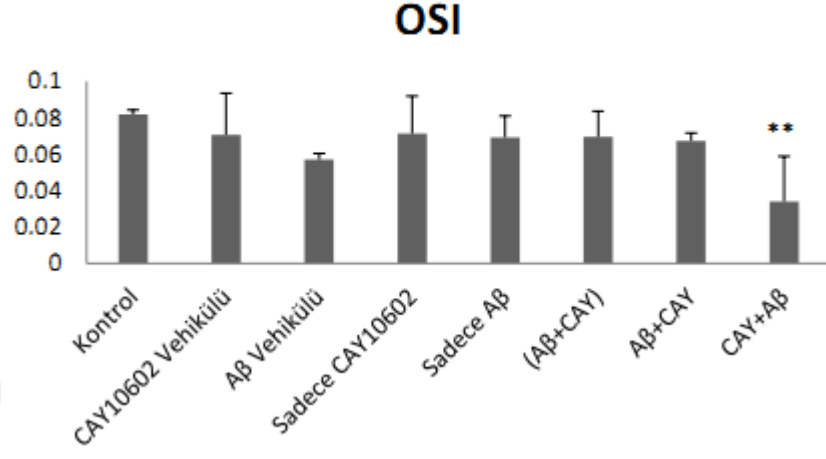
Şekil.6.6.1.Toplam Antioksidan Statü Düzeyleri

CAY10602 Vehikül grubunun TAS (Toplam Antioksidan Statü) düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. (*: $p < 0.05$)



Şekil.6.6.2.Toplam Oksidatif Durum Düzeyleri

Aβ grubu ve CAY10602+Aβ grubunun TOS düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)



Şekil.6.6.3.Oksidatif Stres İndeksi Düzeyleri (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)

A β vehikül ve CAY10602+A β grubunun OSI düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır.

7.TARTIŞMA ve SONUÇ

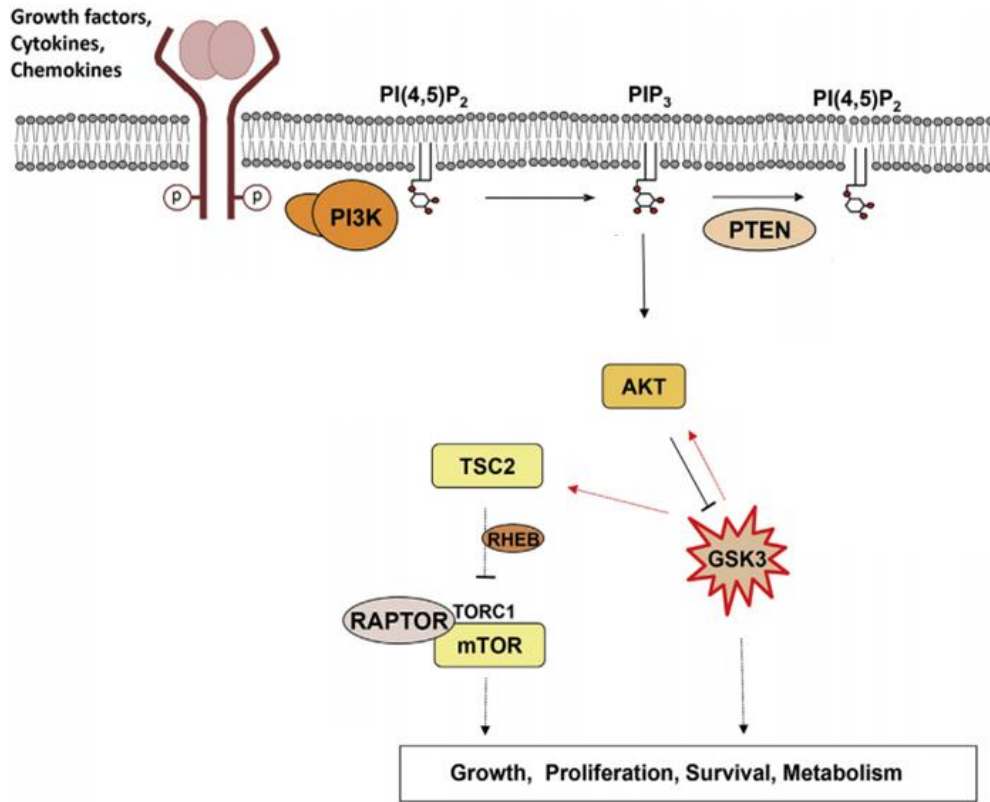
Dünyada en yaygın demans tipi olan AH, nöronal ölüme sebep olan ilerleyici ve geri dönüşü olmayan hafıza zayıflığı, yer-zaman oryantasyonu bozukluğu ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. AH, A β ve tau olmak üzere iki proteinin beyinde anormal seviyede agrege olması ile kalıcı hafıza kaybına sebep olur. A β peptidlerinin beyinde oligomerleşerek oluşturduğu plaklar ve mikrotübüllerin stabilize olmasını sağlayan tau proteininin hiperfosforile olması ile nörofibriler yumakların oluşumunun hastalığın patogenizini oluşturduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada SIRT1 proteininin eksozomal protein içeriğine etkilerini incelemek için SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde A β ₍₁₋₄₂₎ toksisitesi oluşturuldu. A β ₍₁₋₄₂₎ toksisite modeli oluşturmak için yapılan deneyden elde edilen veriler 10 μ M' ın en etkin doz olduğunu göstermektedir. (Şekil 6.1)

SIRT1 proteininin nöroprotektif etkisi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda en çok, bir polifenol olan ve kırmızı şarap, üzümde bulunan resvaretrol etken maddesi kullanılmaktadır. Ancak, bu çalışmada etkinliği az olan resvaratrole alternatif olarak Nayagam ve arkadaşları tarafından *High Throughput Screening* ile keşfedilmiş etkinliği resvarotrolden daha fazla ve SIRT1 aktivatörü olan CAY10602 kullanılmıştır. CAY10602' nin etkin dozunu belirlemek için yapılan LDH deneyinde altı farklı konsantrasyon denendi ancak gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığından Nayagam ve arkadaşlarının kullandığı 20 μ M dozunu kullanıldı. (Şekil.6.2.1.) [66]

Hücre büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden hücre düzenleyici mekanizmaların bir anahtar bileşeni, PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz) - AKT(Protein kinaz B) - mTOR (Rapamisin Mekanizması Hedefi) sinyal yolağıdır. Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) yolağı epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi pek çok büyüme faktörleri ile aktive edilebilmekte ve PI3K-AKT-mTOR gibi çok sayıda önemli sinyal yolağı bileşenlerinin aktive edilmesini sağlamaktadır. PI3K tarafından aktive edilmiş AKT, hücre metabolizmasının, proliferasyonunun ve sağ kalımının merkezi bir düzenleyicisi olan mTOR fosforilasyonunu uyarır. mTOR aktivasyonu sonucunda hücre bölünmesine öncülük eden moleküllerin zincirleme aktivasyonu

gerçekleşir ve böylece mTOR hücre içi ve hücre dışı sinyalleri birleştirerek büyüme, çoğalma ve hücre metabolizmasının düzenlenmesinde ve hayatta kalmanın merkezi fonksiyonlarında görev alır. PTEN (fosfataz ve tensin homolog) ise AKT sinyalizasyonunun negatif regülatörüdür. PTEN fosforillendiği zaman PI3K/AKT üzerindeki inhibitör etkisi azalır. Bir serin/treonin kinaz olan GSK3'ün GSK-3 α ve GSK-3 β olmak üzere iki izoformu vardır. GSK -3 hücrel çoğalma, göç, iltihap ve bağışıklık gibi olaylarda pro-inflamatuar sitokin ve interlökin üretimi de dâhil olmak üzere, çeşitli protein kinazlar aracılığıyla adaptif değişiklikler, hücre çoğalması ve hücre içi sinyal yollarını etkileyerek glukoz regülasyonu ve apoptoz başta olmak üzere hem periferde hem de santral sinir sisteminde etkilidir PI3K tarafından aktive edilen AKT, uyarılmamış hücrede defosforile halde bulunan GSK3' ü fosforilleyerek inhibe eder. [67][68] [69][70]



Şekil.7.1.GSK3 ve PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı [68]

AH' de A β oligomerleri, insülin antagonisti gibi davranarak hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve PI3K'nin dolayısı ile GSK-3 α ve GSK-3 β ' yi fosforilleyen AKT'nin inhibisyonuna sebep olurlar. Aktif AKT'nin yokluğunda GSK3' ün aktivitesi artar. GSK-3 β aynı zamanda tau kinaz 1 olarak da bilinir ve tau proteinini fosforiller. Aktivitesi artmış olan GSK3 daha fazla tau proteini fosforilleyerek nörofibriler yumakların oluşumuna katkıda bulunur. [71]

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının AH ile yakından ilişkili olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. AH tanılı kişilerde mTOR sinyali artmıştır. A β , mTOR' un aşağı yönde hedefi olan ve nöronlarda aşırı eksprese edilerek nörofibriler yumakların oluşumuna katkıda bulunan p70S6K' yi artırır. mTOR sinyalizasyonu AH tanılı bireylerde yüksektir. Otofajinin bir inhibitörü olan mTOR, anormal proteinlerin temizlenmesini açıklayan otofaji / lizozom sisteminde A β klerensini azaltır. Artan kanıtlar, mTOR'un aktivasyonunun A β jenerasyonu ve birikiminin artırıcı olduğunu vurgulamaktadır. [72][73]

Bu bilgiler ışığında yapmış olduğumuz çalışmada SIRT1 aktivasyonunun PI3K/AKT/mTOR ve PI3K/AKT/GSK3 sinyal yolağında nöroprotektif etkisi incelenmiştir. Deney gruplarında CAY10602 uygulanmış olmasına rağmen kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde SIRT1 protein ekspresyon düzeylerinde (CAY10602+A β) grubu hariç diğer gruplarda anlamlı seviyede azalma görülmesi SIRT1' in enzimatik aktivitesinin arttırarak aktive olduğunu göstermektedir. [74]

AKT ' nin negatif regülatörü olan PTEN proteininin p-PTEN formunun ifade düzeyleri kontrole göre karşılaştırıldığında bütün deney gruplarında azalmıştır. p-PTEN' nin azalmış olması AKT' nin negatif regülasyonunu azaltır. AKT' nin aktif hali olan p-AKT' nin 48.saatte (A β +CAY10602) uygulanan grupta, 48.saatte A β ve 72.saatte CAY10602 uygulanan grupta, 48.saatte CAY10602 ve 72.saatte A β uygulanan grupta azalmış olması AKT' nin aşağı yönde olan sinyallerini de azaltır.

Fosforile formu azalan AKT, GSK3' ü daha az fosforiller. Ancak AKT' nin fosforile formu azalmasına rağmen p-GSK-3 α ifade düzeylerinde, sadece CAY10602 uygulanan grupta kontrole göre anlamlı seviyede artış görülmüştür. Aynı grubun t-GSK-3 α ekspresyon seviyesine bakıldığında ise anlamlı seviyede azalma görülmüştür. Uygulanan SIRT1 'in p-GSK-3 α seviyesini etkilediği görülmektedir.

48.saatte A β ve 72.saatte CAY10602 uygulanan grupta kontrole göre p-GSK-3 α anlamlı seviyede azalmıştır.

Tau kinaz 1 olarak da bilinen GSK-3 β ' nin total formu 48.saatte sadece CAY10602 uygulanan grupta kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı seviyede farklılık göstermezken p-GSK-3 β seviyesinde anlamlı seviyede azalma göstermiştir. Yani, CAY10602 GSK3' ün aktivitesini azaltmıştır. Ancak, A β toksisitesi oluşturulmuş diğer gruplara baktığımızda kontrole göre p- GSK3- β seviyelerinin azalmış olması, GSK3 β 'nın daha az fosforillendiğini ve SIRT1 aktivasyonunun bu noktada nöroprotektif etkisi gözlenmediğini gösterir.

Diğer çalışmalara göre AH' lerde mTOR seviyelerinde artış gözlemlenmektedir ancak bu çalışmada t-mTOR' un ifade düzeyleri kontrole göre diğer gruplarda azalmış olması ve p-mTOR' un kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlılık göstermemesi PI3K/AKT/mTOR yolunun aktive olmadığını göstermektedir. AH' lerde hiperaktif olan mTOR sinyalleri tau fosforilasyonunu artırır ve A β klirensini azaltır. Aktif formu p-mTOR olan mTOR sinyallerinin azalmış olması SIRT1 aktivasyonunun nöroprotektif etkisini ortaya koymaktadır. [72]

AH' lığında eksozomların A β peptidlerini ve tau proteinini beyinde yaydıkları konusunda çalışmalar bulunmaktadır. [75], [76] Ekzosom biyobelirteci olan Tsg101 ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilginç bir şekilde tüm gruplarda anlamlı seviyede artış göstermiştir. Bu da eksozomların AH'nda önemli rolleri olduğunu vurgulamaktadır.

SIRT1 hücreleri oksidatif strese karşı korur, glikoz / lipid metabolizmasını düzenler ve birçok substratı deasetile ederek DNA stabilitesini destekler. [77] 48.saatte CAY10602 ve 72.saatte A β uygulanan grupta toplam oksidatif durum ve oksidatif stres indeksi kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu da SIRT1 'in hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu desteklemektedir. Ancak diğer gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir veri elde edilememiştir.

Kesin mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulmamış olsa da, merkezi sinir sisteminde SIRT1' in aktivasyonu PI3K / AKT / GSK-3 β sinyal disregülasyonunun sağlanması, AH için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabilir.

Sinyal iletim yollarında yer alan moleküllerin modülasyonu, bir dizi hastalık için yeni ortaya çıkan bir tedavi seçeneğidir. PI3K / AKT / mTOR sinyal yolu, hücre metabolizmasında, hücre büyümesinde, hücre hareketinde ve hücre sağkalımında değişikliklere yol açan çeşitli karmaşık olayları koordine eder. Bu yolla ilgili ileri çalışmalar, nörodejenerasyonda rol oynayan PI3K izoformlarının yeni küçük moleküllü modülatörlerinin tasarımına yönelik olabilir.

Ekzosomlar, AH olan kişilerde ciddi bir artış göstermektedir. (Bkz.Şekil.6.5.11) Taşıdıkları kargo içeriği ile diğer veziküllerden ayrılan ekzosomlar kan beyin bariyerini geçebildiği için AH' de tanı ve tedavide kullanılabilirler.

8.KAYNAKLAR

- [1] L. Zhang *vd.*, “Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells”, *Neurochem. Int.*, c. 57, sayı 5, ss. 547–555, 2010.
- [2] D. J. Bonda *vd.*, “The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: Mechanistic and therapeutic considerations”, *Lancet Neurol.*, c. 10, sayı 3, ss. 275–279, 2011.
- [3] H. Asai *vd.*, “Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation”, *Nat. Neurosci.*, c. 18, sayı 11, ss. 1584–1593, 2015.
- [4] T. Malm, S. Loppi, ve K. M. Kanninen, “Exosomes in Alzheimer’s disease”, *Neurochem. Int.*, c. 97, ss. 193–199, 2016.
- [5] G. R. Grøntvedt, T. N. Schröder, S. B. Sando, L. White, G. Bråthen, ve C. F. Doeller, “Alzheimer’s disease”, *Curr. Biol.*, c. 28, sayı 11, ss. R645–R649, 2018.
- [6] Ü. D. Özkay, Y. Öztürk, ve Ö. D. Can, “Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı”, *SDÜ Tıp Fakültesi Derg.*, c. 18, sayı 1, ss. 35–42, 2011.
- [7] T. Trotta, M. A. Panaro, A. Cianciulli, G. Mori, A. Di Benedetto, ve C. Porro, “Microglia-derived extracellular vesicles in Alzheimer’s Disease: A double-edged sword”, *Biochem. Pharmacol.*, c. 148, ss. 184–192, 2018.
- [8] J. C. Meyer, P. Harirari, ve N. Schellack, “Overview of Alzheimer ’ s disease and its management”, *South African Pharm. J.*, c. 83, sayı 9, ss. 48–56, 2016.
- [9] K. Selekler, “ALOIS ALZHEIMER ve ALZHEIMER HASTALIĞI”, *Türk Geriatr. Derg.*, c. 13, sayı 3, ss. 9–14, 2010.
- [10] K. Yuyama ve Y. Igarashi, “Exosomes as Carriers of Alzheimer ’ s”, c. 11, sayı April, ss. 1–5, 2017.
- [11] G. M. McKhann *vd.*, “The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease”, *Alzheimer’s Dement.*, c. 7, sayı 3, ss. 263–269, 2011.
- [12] E. J. Mufson *vd.*, “Molecular and cellular pathophysiology of preclinical Alzheimer’s disease”, *Behav. Brain Res.*, c. 311, sayı May, ss. 54–69, 2016.

- [13] S. Hostiuc, E. Drima, ve O. Buda, “Shake the Disease. Georges Marinesco, Paul Blocq and the Pathogenesis of Parkinsonism, 1893”, *Front. Neuroanat.*, c. 10, sayı June, ss. 1–5, 2016.
- [14] O. Buda, D. Arsene, M. Ceausu, D. Dermengiu, ve G. C. Curca, “Georges Marinesco and the early research in neuropathology”, *Neurology*, c. 72, sayı 1, ss. 88–91, 2009.
- [15] M. Goedert, “Oskar Fischer and the study of dementia”, *Brain*, c. 132, sayı 4, ss. 1102–1111, 2009.
- [16] P. H. Reddy vd., “Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer’s disease”, *J. Investig. Med.*, c. 64, sayı 8, ss. 1220–1234, 2016.
- [17] A. Association, “2018 Alzheimer’s disease facts and figures”, *Alzheimer’s Dement.*, c. 14, sayı 3, ss. 367–429, 2018.
- [18] M. R. Köse vd., *T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2016*. 2017.
- [19] G. B. Öztürk ve M. A. Karan, “Alzheimer Hastalığının Fizyopatolojisi”, *Klin. Gelişim*, c. 22, sayı 3, ss. 36–44, 2009.
- [20] F. Kamenetz vd., “APP Processing and Synaptic Function State University of New York at Stony Brook”, c. 37, ss. 925–937, 2003.
- [21] Y. C. Chen, “Impact of a discordant helix on β -amyloid structure, aggregation ability and toxicity”, *Eur. Biophys. J.*, c. 46, sayı 7, ss. 681–687, 2017.
- [22] K. Rajasekhar, M. Chakrabarti, ve T. Govindaraju, “Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer’s disease”, *Chem. Commun.*, c. 51, sayı 70, ss. 13434–13450, 2015.
- [23] J. C. Polanco, C. Li, L. G. Bodea, R. Martinez-Marmol, F. A. Meunier, ve J. Götz, “Amyloid- β and tau complexity - Towards improved biomarkers and targeted therapies”, *Nat. Rev. Neurol.*, c. 14, sayı 1, ss. 22–40, 2018.
- [24] R. H. Takahashi, T. Nagao, ve G. K. Gouras, “Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer’s disease”, *Pathol. Int.*, c. 67, sayı 4, ss. 185–193, 2017.
- [25] A. Kowalska, “Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer’s disease.”, *Pol J Pharmacol*, c. 56, ss. 171–178, 2004.
- [26] M. G. Spillantini ve M. Goedert, “Tau pathology and neurodegeneration”,

- Lancet Neurol.*, c. 12, sayı 6, ss. 609–622, 2013.
- [27] F. Clavaguera, F. Grueninger, ve M. Tolnay, “Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies”, *Neuropharmacology*, c. 76, sayı PART A, ss. 9–15, 2014.
- [28] Á. Sebastián-Serrano, L. De Diego-García, ve M. Díaz-Hernández, “The neurotoxic role of extracellular tau protein”, *Int. J. Mol. Sci.*, c. 19, sayı 4, ss. 1–13, 2018.
- [29] T. L. Platt, V. L. Reeves, ve M. P. Murphy, “Transgenic models of Alzheimer’s disease: Better utilization of existing models through viral transgenesis”, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, c. 1832, sayı 9, ss. 1437–1448, 2013.
- [30] C. Reitz ve R. Mayeux, “Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers”, *Biochem. Pharmacol.*, c. 88, sayı 4, ss. 640–651, 2014.
- [31] R. Lalla ve G. Donmez, “The role of sirtuins in Alzheimer’s disease”, *Front. Aging Neurosci.*, c. 5, sayı APR, ss. 1–4, 2013.
- [32] A. Bayram ve M. İ. Ğ. C. İ, “Sirtuin Genleri ve İşlevleri”, c. 18, sayı 3, ss. 136–140, 2013.
- [33] F. Zhang *vd.*, “Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system”, *Prog. Neurobiol.*, c. 95, sayı 3, ss. 373–395, 2011.
- [34] G. Donmez, “The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration”, *Trends Pharmacol. Sci.*, c. 33, sayı 9, ss. 494–501, 2012.
- [35] S. Lavu, O. Boss, P. J. Elliott, ve P. D. Lambert, “Sirtuins - Novel therapeutic targets to treat age-associated diseases”, *Nat. Rev. Drug Discov.*, c. 7, sayı 10, ss. 841–853, 2008.
- [36] W. Qin *vd.*, “Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction”, *J. Biol. Chem.*, c. 281, sayı 31, ss. 21745–21754, 2006.
- [37] J. C. Milne *vd.*, “Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes”, *Nature*, c. 450, sayı 7170, ss. 712–716, 2007.
- [38] M. Lagouge *vd.*, “Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α ”, *Cell*, c. 127,

sayı 6, ss. 1109–1122, 2006.

- [39] U. Kilic *vd.*, “SIRT1 gene variants are related to risk of childhood obesity”, *Eur. J. Pediatr.*, c. 174, sayı 4, ss. 473–479, 2015.
- [40] B. Femir, “NÖRONAL PLASTISITE VE NÖRODEJENERATIF HASTALIKLARDA NF- κ B ’ NIN ROLÜ THE ROLE OF NF- κ B IN NEURONAL PLASTICITY AND NEURODEGENERATIVE”, 2017.
- [41] G. Donmez, “The effects of SIRT1 on Alzheimer’s disease models”, *Int. J. Alzheimers. Dis.*, c. 2012, ss. 4–7, 2012.
- [42] A. Z. Herskovits ve L. Guarente, “SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence”, *Neuron*, c. 81, sayı 3, ss. 471–483, 2014.
- [43] K. Huang *vd.*, “Sirt1 resists advanced glycation end products-induced expressions of fibronectin and TGF- β 1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells”, *Free Radic. Biol. Med.*, c. 65, ss. 528–540, 2013.
- [44] S. I. Imai ve L. Guarente, “Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: Implications for metabolic diseases”, *Trends Pharmacol. Sci.*, c. 31, sayı 5, ss. 212–220, 2010.
- [45] N. V. Patel *vd.*, “Caloric restriction attenuates A β -deposition in Alzheimer transgenic models”, *Neurobiol. Aging*, c. 26, sayı 7, ss. 995–1000, 2005.
- [46] W. Qin *vd.*, “Calorie restriction attenuates Alzheimer’s disease type brain amyloidosis in Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*).”, *J. Alzheimers. Dis.*, c. 10, sayı 4, ss. 417–422, 2006.
- [47] J. Chen *vd.*, “SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- β toxicity through inhibiting NF- κ B signaling”, *J. Biol. Chem.*, c. 280, sayı 48, ss. 40364–40374, 2005.
- [48] D. Kim *vd.*, “SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer’s disease and amyotrophic lateral sclerosis”, *EMBO J.*, c. 26, sayı 13, ss. 3169–3179, 2007.
- [49] S. W. Min *vd.*, “Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy”, *Neuron*, c. 67, sayı 6, ss. 953–966, 2010.
- [50] C. Julien *vd.*, “Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in alzheimer disease”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, c. 68, sayı 1, ss. 48–58, 2009.

- [51] A. Sydow *vd.*, “Tau-Induced Defects in Synaptic Plasticity, Learning, and Memory Are Reversible in Transgenic Mice after Switching Off the Toxic Tau Mutant”, *J. Neurosci.*, c. 31, sayı 7, ss. 2511–2525, 2011.
- [52] T. S. Anekonda ve P. H. Reddy, “Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer’s disease”, *J. Neurochem.*, c. 96, sayı 2, ss. 305–313, 2006.
- [53] P. Wolf, “The nature and significance of platelet products in human plasma.”, *Br. J. Haematol.*, c. 13, sayı 3, ss. 269–288, 1967.
- [54] J. Kowal, M. Tkach, ve C. Théry, “Biogenesis and secretion of exosomes”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, c. 29, sayı 1, ss. 116–125, 2014.
- [55] A. Hartmann, C. Muth, O. Dabrowski, S. Krasemann, ve M. Glatzel, “Exosomes and the prion protein: More than one truth”, *Front. Neurosci.*, c. 11, sayı APR, ss. 1–7, 2017.
- [56] A. A. Farooqi *vd.*, “Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds”, *Biotechnol. Adv.*, c. 36, sayı 1, ss. 328–334, 2018.
- [57] N. P. Hessvik ve A. Llorente, “Current knowledge on exosome biogenesis and release”, *Cell. Mol. Life Sci.*, c. 75, sayı 2, ss. 193–208, 2018.
- [58] E. Ersöz, O. B. Can, ve S. Uzunoğlu, “Eksozomların Kanserdeki Rolü”, c. 2, sayı 5, ss. 144–152, 2016.
- [59] A. Hartmann, C. Muth, O. Dabrowski, ve S. Krasemann, “Exosomes and the Prion Protein : More than One Truth”, c. 11, sayı April, ss. 1–7, 2017.
- [60] T. Kahraman, “Exosomes: Natural Nanovesicle Candidates Used in the Diagnosis and Treatment”, *Turkish J. Immunol.*, c. 2, sayı 2, ss. 34–40, 2014.
- [61] T. Xiao, W. Zhang, B. Jiao, C. Pan, X. Liu, ve L. Shen, “The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer ’ disease”, *Transl. Neurodegener.*, ss. 1–6, 2017.
- [62] K. An *vd.*, “Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β assemblies in vivo”, *Mol. Brain*, c. 6, sayı 1, ss. 1–13, 2013.
- [63] K. Yuyama *vd.*, “Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice”, *J. Biol. Chem.*, c. 289, sayı 35, ss. 24488–24498, 2014.
- [64] C. Falker *vd.*, “Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid

- beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity”, *J. Neurochem.*, c. 137, sayı 1, ss. 88–100, 2016.
- [65] L. Rajendran *vd.*, “Alzheimer’s disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, c. 103, sayı 30, ss. 11172–11177, 2006.
- [66] V. M. Nayagam *vd.*, “SIRT1 modulating compounds from high-throughput screening as anti-inflammatory and insulin-sensitizing agents”, *J. Biomol. Screen.*, c. 11, sayı 8, ss. 959–967, 2006.
- [67] Ö. Özcan ve M. Dikmen, “Kanser tedavisinde mTOR inhibitörleri”, *Marmara Pharm. J.*, c. 19, sayı 3, ss. 290–297, 2015.
- [68] M. A. Hermida, J. Dinesh Kumar, ve N. R. Leslie, “GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network”, *Adv. Biol. Regul.*, c. 65, ss. 5–15, 2017.
- [69] U. Kilic *vd.*, “Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin’s neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice”, *Redox Biol.*, c. 12, sayı April, ss. 657–665, 2017.
- [70] C. Sahin, G. nal, ve F. Aricioglu, “The involvement of Akt and GSK-3: Two pathways, two pathology”, *J. Marmara Univ. Inst. Heal. Sci.*, c. 4, sayı 1, s. 1, 2014.
- [71] F. Hernández, E. Gómez de Barreda, A. Fuster-Matanzo, J. J. Lucas, ve J. Avila, “GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein”, *Exp. Neurol.*, c. 223, sayı 2, ss. 322–325, 2010.
- [72] Z. Cai, “Activation of mTOR : a culprit of Alzheimer ’ s disease ?”, ss. 1015–1030, 2015.
- [73] H. Yu ve S. Koh, “The role of PI3K / AKT pathway and its therapeutic possibility in Alzheimer ’ s disease”, *Hanyang Med. Rev.*, c. 37, sayı 1, ss. 18–24, 2017.
- [74] D. Beher, J. Wu, K. W. Kim, S. Lu, L. Atangan, ve M. Wang, “Resveratrol is Not a Direct Activator of SIRT1 Enzyme Activity”, sayı 10, ss. 619–624, 2009.
- [75] T. Zheng *vd.*, “Plasma exosomes spread and cluster around β -amyloid plaques in an animal model of Alzheimer’s disease”, *Front. Aging Neurosci.*, c. 9, sayı

FEB, ss. 1–12, 2017.

- [76] J. C. Polanco, C. Li, N. Durisic, R. Sullivan, ve J. Götz, “Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons”, *Acta Neuropathol. Commun.*, c. 6, sayı 1, s. 10, 2018.
- [77] U. Kilic *vd.*, “A Remarkable Age-Related Increase in SIRT1 Protein Expression against Oxidative Stress in Elderly : SIRT1 Gene Variants and Longevity in”, ss. 1–19, 2015.



9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Bahar	Soyadı	SARİKAMIŞ
Doğum Yeri	Gevaş	Doğum Tarihi	18.02.1988
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	
E-mail	baharsarikamis@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi	2011
Lise	İzzet Ünver Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.Sekreter	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2015-2018
2.Biyolog	Genetik Tanı Merkezi	2012-2013

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

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu [□]								
YÖK-DİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
75								
				Sayısal	Eşit Ağırlık		Sözel	
ALES Puanı				75				
(Diğer) Puanı								

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ms Office Programları	Çok İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer