T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UZUN KODLAMAYAN RNA (LNCRNA) LINC00968 'İN ALZHEIMER HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELLERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SERAP KURT

ORCID: 0000-0002-0186-7541

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR

AĞUSTOS 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2018970138

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UZUN KODLAMAYAN RNA (LNCRNA) LINC00968 'İN ALZHEIMER HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELLERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Serap KURT

ORCID: 0000-0002-0186-7541

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Moleküler Biyoloji ve Genetik YÖK 100/2000

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ORCID: 0000-0001-7939-5153

Bu araştırma, DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2020.KB.SAG.012 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

AĞUSTOS 2024

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi Serap Kurt tarafından hazırlanan **"Uzun Kodlamayan RNA (LncRNA) Linc00968 'in Alzheimer Hücre Kültürü Modellerinde Apoptoz Üzerine Etkisinin Araştırılması"** başlıklı tez çalışması 23.08.2024 günü, 13.30/15.30 saatleri arasında yapılan tez savuna sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Zeynep YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum / onaylamıyorum
ORCID: 0000-0002-2762-0942
İmza

Üye: Prof. Dr. Hakkı Ogün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum / onaylamıyorum
ORCID: 000-0002-2449-1794
İmza

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz OKTAY
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum / onaylamıyorum
ORCID: 0000-0003-4423-4821
İmza

Üye: Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum / onaylamıyorum
ORCID: 0000-0002-0972-8896
İmza

Üye: Prof. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR
Pamukkale Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum / onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-9251-9632
İmza

Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman, oy kullanmıyor
ORCID: 0000-0001-7939-5153
İmza

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Uzun Kodlamayan RNA (lncRNA) Linc00968 'in Alzheimer hücre kültürü modellerinde apoptoz üzerine etkisinin araştırılması" başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgesel akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Serap KURT
25.07.2024

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım andan itibaren akademik yolculuğumun yanısıra kişisel gelişimime katkıda bulunan; anlayışı ve güveni ile her daim yanımda olan, insani yönünü örnek aldığım değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Sefa Kızıldağ'a,

Tez çalışmam boyunca gerçekleştirdiğimiz toplantılarda bilimsel katkıları ile tezime yön veren sayın Tez İzleme Komisyonu üyeleri Prof. Dr. Zeynep Yüce ve Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Oktay'a,

Doktora tez sürecimi kolaylaştıran, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Fethi Sırrı Çam'a,

Doktora tez çalışmamın gerçekleşmesini maddi yönden destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimine,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora tez sürecimde de koşulsuz sevgi ve destekleri ile her zaman yanımda olup bana güç veren canım aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ ..... *i*

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... *ii*

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... *v*

ÖZET ..... *vii*

ABSTRACT ..... *ix*

1. GİRİŞ VE AMAÇ *1*

2. GENEL BİLGİLER *3*

2.1 Alzheimer Hastalığı 3

2.2 Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi 4

2.3 Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi 4

2.3.1 Amiloid Beta Plaklar 5

2.3.2 Nörofibriler Yumaklar 6

2.4 Alzheimer Hastalığında Risk Oluşturucu Faktörler 8

2.5 Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNAs) 11

2.6. Uzun Kodlamayan Intergenik RNA 00968 (linc00968) 14

2.7 Apoptoz 14

2.7.1 Ekstrinsik Apoptoz Yolağı 15

2.7.2 İntrinsik Apoptoz Yolağı 16

3. GEREÇ VE YÖNTEM *19*

3.1 Araştırmanın Tipi 19

3.2 Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı 19

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi 19

3.4 Çalışma Materyali 19

3.4 Araştırmanın Değişkenleri 20

3.5 Veri Toplama Araçları 20

3.5.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller 20
3.5.2 Çalışmada Kullanılan Metod 24
3.5.2.1 Hücre Kültürü 24
3.5.2.1.1. Hücrelerin Üretimi ve Pasajlanması 24
3.5.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi 24
3.5.2.1.3. Hücrelerin Sayılması 25
3.5.2.1.4. Aβ Stok Çözeltisinin Hazırlanması 25
3.5.2.2 MTT Assay 25
3.5.2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması 27
3.5.2.3 Amiloid 25-35 peptidinin Kongo kırmızısı ile boyanarak gösterilmesi 28
3.5.2.3.1. Kongo kırmızısı ile boyamada kullanılan kimyasallar 28
3.5.2.3.2. Kongo kırmızısı ile boyama protokolü 29
3.5.2.4 Transfeksiyon 29
3.5.2.5 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi 32
3.5.2.6 qRT-PCR 33
3.5.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi 35
3.5.2.8 Western Blot 35
3.5.2.8.1. Protein Eldesi 35
3.5.2.8.2. Protein Miktar Tayini 36
3.5.2.8.3. SDS-PAGE jelin hazırlanması ve Western Blot analizi 36
3.5.2.8.4. PVDF membrana ıslak transfer 39
3.5.2.7.5. İmmunoblotlama ve görüntüleme 40
3.5.2.9 Flow Sitometri 41
3.5.2.9 İstatistiksel Analiz 43
3.6 Etik Kurul Onayı 43

4. BULGULAR *45*

4.1 SH-SY5Y Hücrelerine Amiloid Beta 25-35 uygulaması **45**

4.2 Kongo Kırmızısı ile Amiloid Beta 25-35 Fibrillerinin Gösterimi **45**

4.3 MTT Analizinin Değerlendirilmesi **46**

4.4 SH-SY5Y Hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ Uygulaması Öncesi ve Sonrası linc00968 İfadesinin qRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi **48**

4.5 SH-SY5Y Hücrelerinde siRNA Aracılı Transfeksiyon Verimliliğinin qRT-PCR Yöntemi ile belirlenmesi **48**

4.6 SH-SY5Y Hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ Uygulaması Sonrası Apoptotik Gen İfadelerinin Belirlenmesi **49**

4.7 Agaroz Jel Elektroforezi **51**

4.8 Apoptotik Protein Düzeylerinin Western Blot ile Değerlendirilmesi **52**

4.9 Gruplardaki Apoptoz Oranının Flow Sitometri ile Değerlendirilmesi **54**

5. TARTIŞMA **57**

6. SONUÇ VE ÖNERİLER **63**

7. KAYNAKLAR **65**

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. AH için Risk Oluşturucu Faktörler 8

Tablo 2. Araştırma Planı 19

Tablo 3. Çalışmada kullanılan malzemeler ve markaları 20

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları 23

Tablo 5. siRNA ile Transfeksiyon Protokolü 31

Tablo 6. cDNA Çevrimi 33

Tablo 7. cDNA Çevrimi Koşulları 33

Tablo 8. Primer Dizileri..... 34

Tablo 9. Western Blot Jel Hazırlama Tablosu..... 37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yolak ile APP'nin kesimi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 6

Şekil 2. AH'de nörofibriler yumakların mikrotübüle etkisi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 7

Şekil 3. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolakları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 17

Şekil 4. MTT Tuzunun mitokondriyal reduktaz ile formazan kristallerine dönüşümü (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 26

Şekil 5. MTT Testi deney düzeneğinin şematize edilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 27

Şekil 6. RNAi mekanizması (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 30

Şekil 7. Transfeksiyon deney düzeneğinin şematize edilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 32

Şekil 8. Protein standart eğrisi (BCA) 36

Şekil 9. Flow Sitometri deneyinin aşamaları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur). 42

Şekil 10. Flow sitometri deneyinde kullanılan grupların şematize edilmesi 43

Şekil 11. $A\beta_{25-35}$ peptidi uygulanmamış (solda) ve uygulanmış (sağda) SH-SY5Y hücrelerinin 10x büyütmede mikroskobik görüntüsü 45

Şekil 12. Kongo kırmızısı ile boyanan SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskobundaki görüntüleri. Hiçbir madde uygulanmayan kontrol grubu (sağda), 40 µM $A\beta_{25-35}$ uygulanan grup (solda)..... 46

Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan $A\beta_{25-35}$ maruziyetinin hücre canlılığı üzerine etkisi 47

Şekil 14. SH-SY5Y Hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ uygulaması öncesi ve sonrası linc00968 ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001. 48

Şekil 15. SH-SY5Y Hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ uygulaması sonrası si-NC ve si-linc00968 ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001. 49

Şekil 16. $A\beta_{25-35}$ uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde BCL-2 gen ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001. 50

Şekil 17. $A\beta_{25-35}$ uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde BAX gen ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001. 51

Şekil 18. $A\beta_{25-35}$ uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde CYT-C gen ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001. 51

Şekil 19. PCR Ürünlerinin agaroz jelde gösterilmesi (M: 500 bp marker, 1: Kontrol grubu, 2: $Aß_{25-35}$ grubu, 3: $Aß_{25-35}$ si-linc00968 grubu, 4: $Aß_{25-35}$ si-NC grubu)..... 52

Şekil 20. Gruplarda Bcl-2 protein seviyesinin western blot ile belirlenmesi (sağda) grupların Bcl-2 protein düzeylerinin dansitometrik görüntüleri (solda). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ***p<0.0001. 53

Şekil 21. Gruplarda Bax protein seviyesinin western blot ile belirlenmesi (sağda) grupların Bax protein düzeylerinin dansitometrik görüntüleri (solda). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ****p<0.0001. 54

Şekil 22. Gruplarda Cyt-c protein seviyesinin western blot ile belirlenmesi (sağda), grupların Cyt-c protein düzeylerinin dansitometrik görüntüleri (solda). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. 54

Şekil 23. Gruplarda apoptoz oranlarının flow sitometri ile değerlendirilmesi. (A1-A2: Kontrol grubu, B1-B2: $Aß_{25-35}$ grubu, C1-C2: $Aß_{25-35}$ si-NC grubu D1-D2: $Aß_{25-35}$ si-linc00968 grubu dağılım grafikleri % hücre canlılığını temsil etmektedir. 55

Şekil 24. Gruplarda apoptoz oranlarının flow sitometri ile histogram grafiği (solda) ve yüzde (sağda) şeklinde gösterimi. $A\beta_{25-35}$ grubu kontrol ile kıyaslandığında **p<0.01, $A\beta_{25-35}$ si-linc00968 grubu $A\beta_{25-35}$ si-NC grubu ile kıyaslandığında ***p<0.001. 55

Şekil 25. Linc00968'in susturumunun $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerini apoptozdan nasıl kurtardığını gösteren şematik model..... 62

SİMGELER VE KISALTMALAR

$A\beta_{25-35}$	Amiloid beta 25-35
linc00968	Long intergenic non-coding RNA 00968
AH	Alzheimer Hastalığı
ncRNA	non-coding RNA
lncRNA	Long non-coding RNA
siRNA	Small interfering RNA
NFT	Nörofibriler yumak
ROS	Reaktif oksijen türleri
APP	Amiloid prekürsör proteini
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
mRNA	Mesajcı RNA
m7G	7-metil guanozin
cDNA	Komplementer DNA
eRNA	Enhansır RNA
ORF	Açık okuma çerçevesi
BDNF	Beyin-türevli nötrofik faktör
BACE1	Amyloid β-prekürsör proteini-kesici enzim
NDM29	Nöroblastoma farklılaşma markörü 29
EBF	Erken B hücre faktörü 3
TNF	Tümor nekroz faktörü
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
FADD	Fas İlişkili Ölüm Alanı
MOMP	Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği
CYT-C	Sitokrom C
PBS	Fosfat içeren tuz solüsyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
BCA	Bisinkoninik Asit
APS	Amonyum persülfat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
FBS	Fötal Bovin Serum

MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
RISC	RNA-aracılı ile indüklenen susturma kompleksi
PVDF	Poliviniliden Florür
PI	Propidyum İyodur
FITC	Floresan-5-izotiyosiyanat

UZUN KODLAMAYAN RNA (LNCRNA) LINC00968 'İN ALZHEIMER HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELLERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Serap KURT

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Alzheimer hastalığı, kognitif bozukluk ile karakterize nörodejeneratif ve heterojen bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinde rol oynayan amiloid beta plakları beyinde hücre dışı amiloid birikintileri oluştururken, nörofibriler yumaklar hiperfosforile tau proteininin anormal filamentlerinin birikmesiyle karakterizedir. Bu çalışmanın amacı, Amiloid beta 25-35 nörotoksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde uzun kodlamayan RNA (lncRNA) linc00968'in apoptotik rolünü araştırmaktır. Alzheimer hastalığı nörotoksisitesini taklit etmek için SH-SY5Y hücrelerinde Amiloid beta 25-35 fragmanı kullanıldı. Hücre canlılığı MTT assay ile belirlendi ve uygun Amiloid beta 25-35 inhibisyon konsantrasyonu değeri hesaplandı. 40 µM Amiloid beta 25-35 uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) hücrelerinde linc00968 ifadesi qRT-PCR ile incelendi. Daha sonra linc00968 ifadesi susturulmak amacıyla Amiloid beta 25-35 uygulanmış SH-SY5Y hücrelerine siRNA ile transfekte edildi ve qRT-PCR ile doğrulandı. Apoptotik yolaklardaki etkisinin incelenmesi amacıyla *BCL-2, BAX*, *CYT-C* ve internal kontrol *GAPDH* gen ifadeleri qRT-PCR ile incelendi. Post transkripsiyonel etkileri değerlendirmek amacı ile western blot ile Bcl-2, Bax, Cyt-c ve Beta aktin düzeyleri incelendi. Sonuçlar, linc00968'in Aβ toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde ifadesinin artmış olduğu saptandı. SH-SY5Y hücrelerinde, Amiloid beta 25-35 kaynaklı toksisitenin antiapoptotik *BCL-2* gen ifadesini azalttığı, proapoptotic *BAX* ve *CYT-C* gen ifadesini arttırdığı saptandı. Aβ toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde, Linc00968'in baskılanmasının apoptozu tersine çevirdiği belirlendi. Protein düzeyinde bakıldığında siRNA ile linc00968'in baskılanması anti-apoptotik Bcl-2 düzeyini azalttı, proapoptotic Bax ve

Cyt-c düzeyinde azalışa neden oldu. Bulgularımız, linc00968'in Amiloid beta 25-35 ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiğini göstermektedir. Linc00968'nin baskılanmasının, apoptoz ile ilişkili bazı belirteçleri düzenleyerek SH-SY5Y hücrelerini Amiloid beta 25-35 kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruyabildiği gösterilmiştir. Linc00968'in ifadesinin düzenlenmesi Amiloid beta 25-35 fragmanları ile AH nörotoksisitesini taklit eden hücrelerde nöronal apoptozun önlenmesinde yeni belirteç olarak önerilebilir.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer's, amiloid beta, apoptoz, linc00968, lncRNA

Sayfa Numarası: 96

Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF LONG NON-CODING RNA (LNCRNA) LINC00968 ON APOPTOSIS IN ALZHEIMER CELL CULTURE MODELS

Doctoral Thesis

Serap KURT

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTES OF HEALTH SCIENCES

Department of Medical Biology

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative and heterogeneous disease characterized by cognitive impairment. In the brain, aberrant filaments of hyperphosphorylated tau protein accumulate to create neurofibrillary tangles, whereas extracellular amyloid deposits are formed by amyloid beta plaques. Here we aimed that to examine the involvement of long non-coding RNA (lncRNA) linc00968 in apoptosis in SH-SY5Y cells that exhibit neurotoxicity from amyloid beta 25–35. In SH-SY5Y cells, the amyloid beta 25–35 fragment was employed to simulate the neurotoxicity of AD.Cell viability was determined by cytotoxicity assay and the appropriate Amyloid beta 25-35 inhibition concentration value was calculated. Quantitative simultaneous polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to assess linc00968 expression in treated and untreated (control) cells with 40 μM Amyloid beta 25-35. Subsequently, linc00968 expression was transfected with siRNA into Amyloid beta 25-35-treated SH-SY5Y cells to silence expression and confirmed by qRT-PCR. *BCL-2*, *BAX*, *CYT-C* and internal control *GAPDH* gene expressions were analyzed by qRT-PCR in order to examine their effects on apoptotic pathways. To evaluate the post-transcriptional effects on the levels of beta actin, Bcl-2, Bax, and Cyt-c, Western blot analysis was employed. Results showed that the expression of linc00968 was increased in SH-SY5Y cells with Aβ toxicity. Amyloid beta 25–35 toxicity reduced antiapoptotic BCL-2 gene expression and elevated proapoptotic BAX and CYT-C gene expression in SH-SY5Y cells. It has been found that inhibiting Linc00968 can stop apoptosis in SH-SY5Y cells that have been stimulated by amyloid beta 25–35. Proapoptotic Bax and Cyt-c as well as anti-apoptotic Bcl-2 were also reduced in the

protein level upon linc00968 knockdown using siRNA. According to our research, SH-SY5Y cells generated by amyloid beta 25–35 exhibit high levels of linc00968 expression. It has been demonstrated that by controlling a few apoptosis-related indicators, inhibition of Linc00968 can shield SH-SY5Y cells from the neurotoxicity caused by amyloid beta 25–35. In cells that imitate the neurotoxicity of AD, Linc00968 expression regulation in combination with Amyloid beta 25–35 fragments may be a novel marker for the prevention of neuronal death.

Keywords: Alzheimer's, amyloid beta, apoptosis, linc00968, lncRNA

Thesis page number: 96

Supervisior: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), demansın başlıca nedenidir ve yaşlı bireylerde davranış, düşünme, öğrenme ve hafızayı etkileyen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (1). AH'nin etiyolojisi altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında çok az bilgi sahibi olunmasına rağmen, araştırmalar AH'ye neden olan genleri ortaya çıkarmış ve hastalığın patofizyolojisinde birçok faktörün rol oynadığını göstermiştir. Son zamanlarda, AH üzerine multidisipliner araştırmalar büyük ilgi görmektedir. Örneğin, AH'de sinir ağı anormallikleriyle ilişkili moleküler temelli çalışmalar önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır (2). Ancak, halihazırda etkili bir prognostik biyobelirteç bulunmamaktadır. Bu nedenle, sadece hastalıktaki yaşam kalitesini artırmak için potansiyel biyobelirteçlere değil, aynı zamanda prognoz için yeni hedefler belirlemeye de önem verilmelidir (3).

İnsan Genom Projesi'ne göre, insan genomunun %80'inden fazlası, biyolojik süreçlerin çoğunu kontrol edebilen, kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak transkribe edilir. (4). Kodlamayan RNA'lar, tanım gereği proteinlere çevrilmeyen heterojen bir transkript grubunu kapsar. Keşfedilmelerinden bu yana, kodlamayan RNA'ların (ncRNA'lar), çeşitli hücre tipleri ve dokularda biyolojik süreçlerin önemli düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir. Bu RNA'ların disregulasyonları ise çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (5). Bilim ve teknolojideki son gelişmeler sayesinde, ncRNA'ların epigenetik düzenleme, kromatin yeniden modelleme, transkripsiyon kontrolü ve post-transkripsiyonel modifikasyonlara katılma gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynadığı gösterilmiştir (6). Nörodejeneratif bozuklukların patogenezinde de ncRNA'ların önemli rolleri bulunmaktadır. ncRNA'lar, gen ifadesini çeşitli mekanizmalarla kontrol ederek hücresel fonksiyonları düzenler (7), yapı ve özgüllükleri aracılığıyla DNA, RNA ve proteinleri modüle edebilirler (8) ve böylece gen transkripsiyonu, RNA yıkımı, mRNA translasyonu ve protein üretimi gibi birçok işlemi düzenleyebilirler (9). Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200 nükleotitten fazla uzunluğa sahip olan kodlamayan transkriptler olarak tanımlanır (10). Bu lncRNA'lar, kanser gelişimi, bağışıklık tepkileri, gelişimsel süreçler ve diğer biyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadırlar (11–13). LncRNA'ların biyogenezi ve işlevleri, transkripsiyon öncesi, transkripsiyon sırası ve sonrasında meydana gelen özel olaylarla şekillenir ve bu özelliklerini belirlemek zordur. LncRNA'lar üzerindeki

araştırmalar artmış olmasına rağmen, bu lncRNA'ların çoğu hala karakterize edilmemiş ve işlevleri tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, birçok hastalığın patogenezinde önemli olabilecekleri keşfedilmeye başlanmıştır (14,15). LncRNA'ların klinik uygulamaları ve terapötik potansiyeli, biyolojik rolleri hakkında eksik bilgi nedeniyle sınırlıdır (16). LncRNA'ların karmaşık mekanizmalarını ve fizyolojik-patolojik etkilerini daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu doktora tezinin amacı, Alzheimer hastalığı patofizyolojisinde önemli rol üstlenen amiloid beta (Aβ) plakların ana bileşeni olan Aβ peptidleri ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde, linc00968'in apoptotik yolaklardaki etkisinin belirlenmesidir.

Bu tez çalışması şu aşamalardan oluşmaktadır:

- İnsan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri, Aβ peptidleri ile muamele edilerek in-vitro Alzheimer nörotoksisite modeli oluşturuldu.
- Bu hücrelerde Aβ peptidlerinin hücre canlılığına olan etkisi belirlendi.
- İleri aşamada linc00968 geninin ifadesi incelendi.
- siRNA transfeksiyonu kullanılarak linc00968 geninin ifadesi baskılandı.
- Bu baskılamanın Aβ peptidleri uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde apoptotik yolaklardaki etkisi araştırıldı.

Bu çalışma, lncRNA linc00968'in Alzheimer hastalığının patogenezinde nöronal apoptoz ile ilişkilendirildiği bilinen ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı ilk olarak 1906'da Alois Alzheimer tarafından tanımlandı ve bu hastalık, demansın yaygın bir nedeni ve 70 yıl sonra da önemli bir ölüm nedeni olarak kabul edilmiştir (17). Alzheimer hastalığının klinik tanı kriterleri 1984 yılında güncellenmiş ve 2011 ile 2018 yıllarında biyobelirteçlerin kullanımı ve hastalığın preklinik aşamalarının tanımlanması için yeni yöntemler geliştirilmiştir. 1906 yılında Alzheimer hastalığı niteliksel olarak tanımlanmış olsa da hastalığın iki temel patolojisi olan plaklardaki amiloid beta peptidi ve nörofibriler yumaklardaki (NFT'ler) hiperfosforile tau proteini, 1980'li yıllara kadar tespit edilememiştir. Bu erken keşiflerle birlikte, Alzheimer hastalığının nöropatolojik değerlendirmesi, klinik demansa daha fazla katkıda bulunan çeşitli komorbid nöropatolojileri tanımak için daha da geliştirilmiştir (18).

Alzheimer hastalığının gelişimine ve ilerlemesine önemli katkıda bulunduğu bildirilen, öğrenme ve hafıza ile ilişkili özel beyin bölgelerindeki asetilkolin (ACh) eksikliği ve kolinerjik nöron kaybı, AH'yi tetikleyen faktörler arasında yer almaktadır (19). Bu nedenle, asetilkolin seviyelerini artırmak amacıyla kolin ve kolin türevleri kullanılmaktadır. Kolin esteraz inhibitörleri dışında alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptör agonistleri de kullanılır. Bu ilaçlar, alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptörlerini uyararak sinaptik plastisiteyi ve hafızayı iyileştirmeyi hedefler. Ancak, bu ilaçların etkinliği bireyden bireye değişebilir ve hastalığın ilerleyici doğası göz önüne alındığında tam bir tedavi sağlamazlar. Ayrıca, bu ilaçların kullanımı bazı yan etkilere (örneğin, bulantı, ishal, baş ağrısı gibi) neden olabilir ve her hasta için uygunluk değerlendirmesi yapılmalıdır. Alzheimer hastalığının belirtileri belirgin hale geldiğinde hastalık genellikle ileri aşamalara gelmiş olabilir. Ancak, gen terapisi gibi yeni tedavi yöntemleri, hastalığın belirtileri ortaya çıkmadan önce erken aşamalarda bile etkili olabilir, böylece daha etkin bir tedavi sağlanabileceği düşünülmektedir (20).

2.2 Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi

Demans, günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek kadar ilerleyici bilişsel bozukluktur ve ciddi bir ölüm nedenidir. Küresel tahminlere göre, şu anda dünya genelinde 44 milyon insan demansla yaşamaktadır. Son araştırmalar, özellikle batı ülkelerinde erkeklerde demans insidansının azalma eğiliminde olduğunu göstermektedir; bu azalmanın hangi demans türlerine bağlı olduğu belirsizdir, ancak vasküler risklerin daha iyi yönetilmesinin bu trende destek sağladığı düşünülmektedir. (21). Bugün, demansın en yaygın biçimi Alzheimer Hastalığı olarak bilinmektedir ve 2050 yılına kadar dünya genelinde yaklaşık 100 milyon insanı etkilemesi beklenmektedir (22). AH'nin prevalansı 65 yaşından sonra her beş yılda bir yaklaşık olarak iki katına çıkmaktadır (23).

Alzheimer hastalığının epidemiyolojisi; hastalığın yaygınlığı, belirleyicileri ve müdahale stratejileri üzerine odaklanmıştır (24). Hastalığın kadınlarda daha fazla görülme eğilimi gösterdiği ve bu durumun patogenezde östrojen gibi cinsiyet hormonlarının rolünü sorgulamaya yönlendirdiği belirtilmektedir (25). Ayrıca, Alzheimer hastalığının genetik kökenli olduğu ve lipid metabolizmasındaki bozuklukların uzun yaşam süresi ile ilişkili hastalıklar arasında yer aldığı da vurgulanmaktadır (26,27).

2.3 Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

Alzheimer hastalığının patofizyolojisi, bu hastalığın temel karakteristiklerini anlamak için önemlidir, zira bu hastalık karmaşık bir nörodejeneratif süreçtir. Hastalık, ilerleyici ve klinik olarak çeşitlilik gösteren bir bilişsel gerileme ile karakterizedir (28). Alzheimer hastalığı, erken dönemde sinaptik işlev bozukluğu ve dejenerasyon gibi temel patofizyolojik özelliklere sahiptir (29). Ayrıca, hastalığın nöronal kayıp ve yaşa bağlı bilişsel bozukluklarla ilişkili bir nörodejeneratif bozukluk olduğu ifade edilmektedir (30).

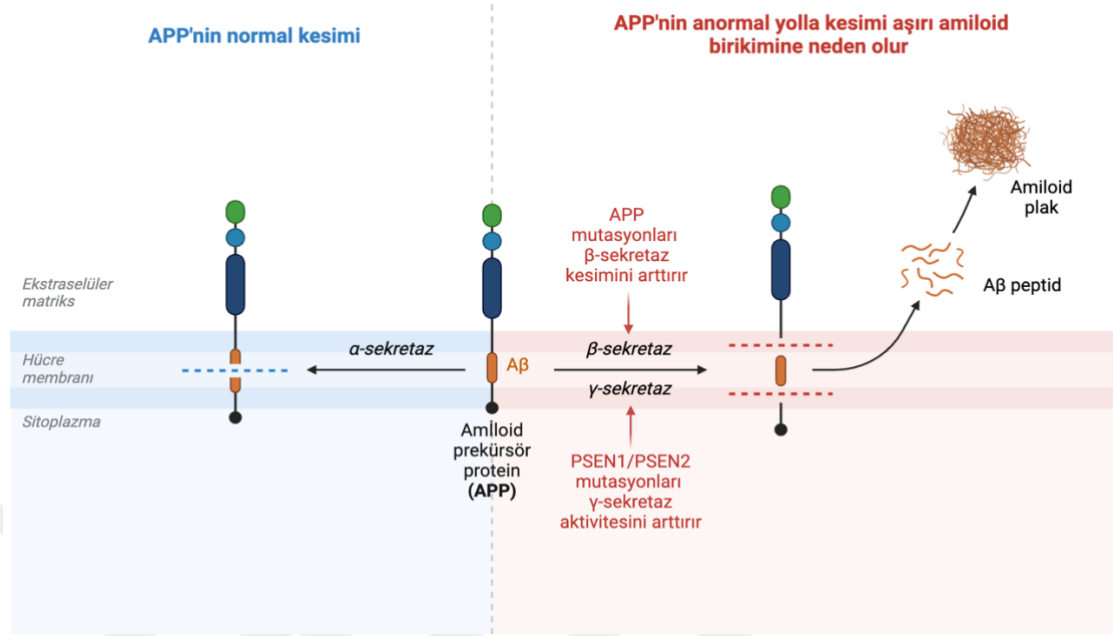
Alzheimer hastalığı, erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olmak üzere iki temel formda ortaya çıkar. PS1, PS2 ve APP genlerindeki genetik mutasyonlar, erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığına neden olabilirken; yaşam tarzı, çevresel faktörler ve genetik etkileşimlerin kombinasyonu, hastalığın geç başlangıçlı sporadik

formuna yol açabilir. (31,32). Ana patolojik belirtiler, Alzheimer hastalığında Aβ plaklarının aşırı birikmesi, nörofibriler yumakların oluşumu ve nöron kaybıdır. Genetik yatkınlığa rağmen, artan kanıtlar gliozis, inflamasyon, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengedeki bozukluklar, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve metal iyonlarının aşırı birikiminin Alzheimer hastalığının patogenezi ile ilişkilendirildiğini göstermektedir (33).

2.3.1 Amiloid Beta Plaklar

Amiloid beta peptidleri, amiloid prekürsör proteininden (APP) beta (β-) ve gama (γ-) sekretaz enzimlerinin proteolitik ayrışması sonucu oluşur. APP, nöronal homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayan bir glikoproteindir; sinyalizasyon, nöronal gelişim ve hücre içi taşıma gibi işlevleri vardır. Aβ peptidinin nöronlarda hangi enzimin kesim yaptığına bağlı olarak hem koruyucu hem de toksik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. (34).

Alzheimer hastalığının bir belirtisi olan Aβ plaklarının oluşumu, APP tarafından türetilen Aβ peptidleriyle karmaşık bir şekilde ilişkilidir. APP, memelilerde yüksek derecede korunan ve ifade edilen bir gen olup, Aβ peptidlerinin oluşumunda β- ve γ-sekretaz enzimleri tarafından proteolitik olarak parçalanır (35). Bu peptitler beta tabaka yapılarına sahip oldukları için bir araya gelerek beyinde amiloid plaklarının birikmesine yol açar (35). Amiloidojenik olmayan yolakta, APP α-sekretaz tarafından kesilerek hücre dışına çözünür APP'nin salınmasını sağlar. α-sekretaz tarafından salınan Aβ peptidleri genellikle koruyucu özelliklere sahiptir. Amiloidojenik yolakta ise, APP öncelikle β-sekretaz tarafından kesilir, ardından membran içindeki γ-sekretaz tarafından işlenir. Bu süreç, Aβ peptidlerinin hücre dışına salınmasına yol açar. Enzimler tarafından kesilen bu Aβ peptidleri, bir araya gelme eğilimindedir ve sitotoksik oligomerlerin ve çözünmeyen Aβ fibrillerinin oluşumuna neden olabilir. (Şekil 1), (36).



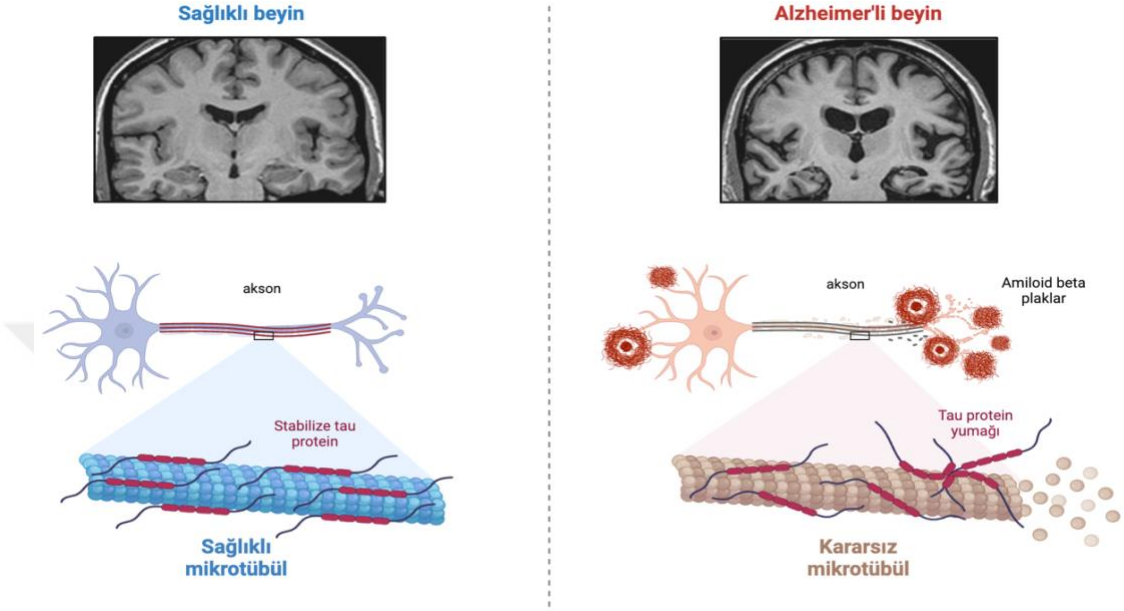
Şekil 1. Amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yolak ile APP'nin kesimi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

2.3.2 Nörofibriler Yumaklar

AH patogenezinde rol oynayan bir başka faktör tau fibrilasyonudur. Sağlıklı nöronlarda, tau proteini nöronal aksonlardaki mikrotübüller için dengeleyici bir rol oynar. Ancak anormal durumlarda, tau proteini hiperfosforile olur, bu da mikrotübüllerin kararsızlaşmasına ve nöron gövdesinde bulunan nörofibriler yumakların oluşumuna öncelikli olarak neden olur (Şekil 2).

Nörofibriler yumakların (NFT) oluşumu, çeşitli faktörlerin karmaşık etkileşimleri ile meydana gelir. Araştırmalar, NFT'lerin yaygın gelişimi için amiloid plakların varlığının önemli olduğunu göstermiştir; bu durum amiloid birikiminin yaşla ilişkili olarak NFT oluşumunu hızlandırdığını öne sürmektedir. Ancak tau patolojisinin Aβ birikimiyle paralel hareket edip birbirlerinin toksik etkilerini artırıp artırmadığı, hatta Aβ birikimine karşı bir düzenleyici etkisi olup olmadığı konusunda tartışmalar devam etmektedir. (37). Tau proteininin normalde mikrotübüllere bağlı olduğu ve bu bağlantının bozulması durumunda tau proteininin hiperfosforile olduğu ve nörofibriller yumakları oluşturduğu bilinmektedir (38). Araştırmalar, tau

proteininin mikrotübüllere bağlı olmadığında hiperfosforile olduğunu ve tipik olarak tau ile ilişkilendirilen nörodejeneratif hastalıkların (tauopatilerin) belirleyici özelliği olan tau birikimlerini oluşturan değişikliklere duyarlı hale geldiğini göstermektedir (39).



Şekil 2. AH'de nörofibriler yumakların mikrotübüle etkisi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Alzheimer hastalığında Aβ ve tau patolojilerinin karmaşık etkileşimleri vardır ve bunlar reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açarak oksidatif hasara neden olabilir. Bunun sonucunda beyinde demir düzensizliği ve demir birikimi oluşabilir. Bu durum, nörodejenerasyonu teşvik edebilir (40,41). Eksozomların, Aβ plakların ve tau fibrillerinin 'prionoid' taşınmasında rol oynadığı ve bu sayede diğer beyin bölgelerine yayıldığına dair biriken kanıtlar bulunmaktadır. Bu patojenik proteinlerin ve serbest radikallerin birikimi, mikroglial aktivasyonu, mitokondriyal hasar, iltihaplanma, ROS birikimi, asetilkolin gibi nörotransmitter defektleri, sinaptik işlev bozuklukları ve sonuçta nöronal ölüm gibi etkiler yaratabilir (42).

Biyobelirteçlerdeki erken değişiklikler, azalmış beyin omurilik sıvısı Aβ düzeyleri ve amiloid birikiminin amiloid pozitron emisyon tomografisi ile gösterilmesi gibi belirtiler, klinik semptomların başlamasından on yıllar önce ortaya çıkar. Bu değişiklikler, bilişsel belirtiler ve işlevsel gerileme başlamadan önce işlevsel

görüntüleme yöntemleri ile daha sonra yapısal görüntüleme tekniklerinde görülebilir (43).

2.4 Alzheimer Hastalığında Risk Oluşturucu Faktörler

Alzheimer hastalığı tiplerinin çoğu, özellikle geç başlangıçlı ve sporadik vakalarda, poligenik risk faktörleri (özellikle apolipoprotein E), çevresel ve yaşam tarzı faktörleri ile ilişkilidir ve çok faktörlü olabilmektedir (44) (Tablo 1).

Tablo 1. AH için Risk Oluşturucu Faktörler

Risk Faktörü	Açıklama
Yaş	Alzheimer hastalığı riski yaşla birlikte önemli ölçüde artar. 65 yaşından büyük popülasyonda hastalığın yaygınlığı %10-30 arasında değişmektedir. 60 yaşından sonra her 10 yılda bir bu prevalans en az iki katına çıkmaktadır ve genel ortalama %1-3 seviyelerindedir.
Cinsiyet	Cinsiyetle doğrudan ilişkili olmamakla birlikte, Alzheimer hastalığı kadınlarda özellikle 80 yaşın üzerinde daha yaygın görülmektedir.
	Daha genç kadınlarda riskin arttığına dair bazı kanıtlar vardır (örn. APOE E3/E4 ile 65-75 yaş arası kadınlar).
Travmatik beyin hasarı	Retrospektif ve deneysel çalışmalar, travmatik beyin hasarının Alzheimer hastalığı riskini artırdığını düşündürmektedir (özellikle demans sendromundan ziyade). Ancak, prospektif çalışmalar bu konuda tutarsız sonuçlar vermektedir.
Yaşam tarzı ve diğer değiştirilebilir faktörler	Yaşam tarzı faktörleri, sigara içme, hipertansiyon, obezite, diyabet, fiziksel ve zihinsel hareketsizlik gibi değiştirilebilir faktörlerin yanı sıra düşük eğitim, depresyon ve diyet gibi diğer faktörlerin demans gelişiminde karmaşık bir rol oynadığına dair artan kanıtlar bulunmaktadır.

	Bu faktörlerle ilişkili altta yatan mekanizmalar, birçoğu aterosklerotik serebrovasküler hastalıkta da rol oynayan mekanizmaları içerir. Ancak, bu faktörlerin Alzheimer hastalığının patolojik sürecini başlatma, şiddetini hafifletme veya ilerlemesini etkileme konusunda kesin olmayan durumlar bulunmaktadır.
	Bu belirsizliklere rağmen, dünya çapında Alzheimer hastalığının yaklaşık üçte birinin potansiyel olarak değiştirilebilir risk faktörlerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle, bu risk faktörleri üzerinde çalışma ve müdahalelerin önemi büyüktür.
Genetik	
Ailesel /monojenik nedenler	Alzheimer hastalığının tüm vakalarının %5'ten azında monogenik mutasyonlar rapor edilmiştir.
Amiloid Prekürsör Protein (APP)	Alzheimer hastalığı otozomal dominant nedenlerden biridir ve %100 penetrasyon gösterir.
	Daha genç bireylerde ailesel başlangıçlı Alzheimer hastalığının prevalansı %15–20 arasındadır.
Presenilin 1 (PSEN1)	Alzheimer hastalığı otozomal dominant nedenlerden biridir ve %100 penetrasyon gösterir.
	Daha genç bireylerde ailesel başlangıçlı Alzheimer hastalığının prevalansı %50-60 arasındadır.
	Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı eğilimindedir ve daha geniş bir fenotipe sahip olabilir.
Presenilin 2 (PSEN2)	Ailesel Alzheimer hastalığının en nadir nedenlerinden biridir.
	Başlangıçta daha geniş bir yaş aralığına sahip olabilir. PSEN1'e kıyasla daha az agresif seyir gösterir.
	%95 penetrasyon gösterir; mutasyonla ilişkili olarak 80 yaş üzerindeki insanlarda bazı penetrasyonlar gözlenmiştir.
Trizomi 21 (Down Sendromu)	APP geni, Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan bir gen olup, 21. kromozomda bulunur. Down sendromu gibi

	durumlarda, bireylerin 21. kromozomun üç kopyası vardır (trizomi 21). Bu durumda, APP geni de bu ekstra kopyadan etkilenebilir ve Alzheimer hastalığı riskinde artışa yol açabilir.
	Artan Aβ üretimi nedeniyle, tüm insanlar 30'lu yaşların ortalarında Alzheimer hastalığına benzeyen plaklar ve düğümler geliştirirler, ancak sadece yaklaşık %50'si demans semptomları geliştirir.
Genetik Yatkınlık Faktörleri	
Apolipoprotein (APO E)	Özellikle Geç yaş Alzheimer hastalığı için, ancak tüm Alzheimer hastalığı tipleri için en güçlü genetik risk değiştirici faktördür.
	APOE E4 aleli, Alzheimer hastalığının daha erken başlangıç yaşı ve artan riski ile ilişkilidir. Bir alel taşıyanlar (heterozigotlar) için risk üç kat artabilirken, iki alel taşıyanlar (homozigotlar) için risk 8 ila 12 kat artabilir.
	APOE E2 aleli nadirdir, Alzheimer hastalığı riskini azaltabilir.
	APOE E4 aleli Alzheimer hastalığı için risk faktörüdür ancak ne yeterli ne de gereklidir. Bu nedenle, klinik uygulamada genotiplemenin sınırlı klinik faydası ve öngörü değeri bulunmaktadır ve şu anda genel olarak önerilmemektedir.
Diğer	Alzheimer hastalığının yüksek oranda kalıtsal olduğu düşünülse de (bazı tahminlere göre sporadik ve geç başlangıçlı vakalarda bile %58-79), genetik temel daha karmaşık ve poligeniktir ve henüz tam olarak belirlenememiştir. Hastalığın duyarlılığı daha yaygın olup, penetransta daha az belirgindir ve çevresel ile epigenetik etkilerle etkileşime giren çoklu genetik risk faktörleri ve APOE alelleri gibi faktörler mevcuttur.

2.5 Uzun Kodlamayan RNA’lar (lncRNAs)

Modern hücreler 4 milyar yılda önemli ölçüde değişmiş olmalarına rağmen, RNA hücre biyolojisinde merkezi bir rol oynamaya devam etmiştir. DNA'nın keşfi olan 19. yüzyılın sonlarından itibaren RNA kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Housekeeping RNA'ların keşfi de dahil olmak üzere birçok bulgu, moleküler biyolojinin temel dogmasını oluşturan haberci RNA (mRNA) modelini destekleyen 1950'lerin sonlarına doğru tasarlanmıştır. Otuz yıl sonra, ilk olarak bakterilerde ve ardından çoğu ökaryotik organizmada tanımlanan düzenleyici, kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar) ortaya çıkmıştır. (4,45). H19 ve Xist gibi bazı uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), genomik çağ öncesi dönemde karakterize edilmiş olsalar da 2000'lerin başına kadar istisnai durumlar olarak kalmışlardır. İnsan genomunun dizisi 2001 yılında yayınlandığında, araştırmalar sadece genomun yaklaşık %1-2'sinin protein kodladığını ve geri kalanının "kodlamayan" olarak kabul edildiğini göstermiştir. Daha sonra genomun birçok kodlamayan RNA'ya geniş ölçüde kopyalandığı gösterilmiş, ancak bu RNA'ların işlevsellikleri tartışmalı kalmıştır. O zamandan beri, düzenleyici lncRNA'lar birçok türde karakterize edilmiş ve ökaryot hücrelerde gelişim ve patoloji gibi süreçlerde yeni bir düzenleme katmanı olarak rol aldıkları gösterilmiştir. (46). 1980'lerde dokuya özgü ve zamansal ifade modelleriyle genlerin klonlanması ve incelenmesi için cDNA kitaplıklarının diferansiyel hibridizasyon ekranları kullanılmıştır. Başlangıçta, çabalar bilinen proteinleri üreten genlere odaklanmıştı; ancak daha sonra RNA'nın kodlama potansiyeline bakmaksızın bir a posteriori yaklaşım benimsenmiştir. Bu yaklaşım, o zamanlar ilk olarak bir mRNA olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen, ilk kodlayıcı olmayan gen olarak H19'un keşfedilmesine olanak sağlamıştır (47).

LncRNA'ların biyosentezi, lncRNA'lara özgü birkaç ayırt edici özellikle mRNA'lara oldukça benzer. LncRNA'lar, daha az evrimsel olarak korunmuş olup, yalnızca birkaç ancak daha uzun ekzon dizileri içerirler. mRNA’lar gibi, lncRNA'lar da RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen lineer protein kodlamayan transkriptlerdir. Genellikle 200 nükleotidin üzerinde uzunluktadırlar ve özel işlemlerden geçerler; bu işlemler arasında 5' başlıkta 7-metil guanozin (m7G)

takılması ve 3' uçlarının poliadenilasyonu bulunur. LncRNA ifade modelleri hem cis hem de trans olarak mRNA'larla birlikte düzenlenir.

Transkripsiyonel işlemler, temel olarak promotör bölgesindeki histon değişikliklerine, Pol II enziminin karboksil-terminal bölgesindeki fosforilasyon durumuna ve/veya lncRNA'ların içinde gömülü sekans motiflerinin varlığına bağlıdır. Ancak, lncRNA'ların dinamik nükleer lokalizasyon modelinde yer alan moleküler mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamıştır (48). LncRNA'lar, sentezleri için seçilen şablon diziye bağlı olarak ya sens ya da anti-sens olarak sınıflandırılır. Konumlarına göre en yakın protein kodlayan transkriptlere bağlı olarak ise lncRNA'lar ya -intergenik ya da -genik olarak tanımlanır. İntergenik lncRNA'lar, özel kodlamayan diziler içerir ve genellikle uzun genler arası kodlamayan RNA'lar (lincRNA'lar) olarak bilinirler. LncRNA'ların gen sınıfı, protein kodlayan genlerle örtüşür ve ayrıca ekzonik, intronik ve örtüşen (overlap) olarak kategorilere ayrılır. Ekzonik lncRNA'lar, ekzon dizileri arasında yer alırken, intronik tipler intronları içerir ve örtüşen olanlar ise tam bir gen dizisi boyunca yayılanlardır. LncRNA'ların transkripsiyonel sentezi açısından, bunlar ayrıca güçlendirici (enhancer) ile ilişkili lncRNA'lar (eRNA'lar) veya güçlendirici bölgelerden veya promotörle ilişkili lncRNA'lar (PROMPT'ler) olarak adlandırılır; bu RNA'lar bir genom dizisinin promotör bölgelerinden sentezlenir. LncRNA'ların belirgin biyokimyasal farkı, genellikle mRNA'larda bulunan çevrilmemiş açık okuma çerçevelerinin (ORF'ler) olmamasıdır. (49,50).

LncRNA'ların insan beyninin organizasyonu ve gelişiminde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Bu RNA'lar hem beyin homeostazını sağlamada hem de hastalık durumlarında regülatör olarak işlev görürler. Beyin, karmaşık işlevleri yerine getirmek için karmaşık bir gen ifadesi ve düzenleme ağına ihtiyaç duyar. Beyindeki LncRNA'ların ifadesi yüksek oranda korunur ve aktiviteye bağlıdır. Sinir sisteminin gelişimsel ve transkripsiyonel aktivitelerinde belirli genlerle birlikte ifade edilirler. Ayrıca, beyin içinde kodlama ve kodlamayan gen ifadesi arasındaki koordineli etkileşim ağını takip ederler; bu süreçte C-FOS, ARC, NRD4A-2 ve Beyinden Türetilmiş Nörotrofik Faktör (BDNF) gibi genlerle birlikte ifade edilirler (15). Anormal lncRNA ifadesi, birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, amyloid β-prekürsör proteini (APP) kesici enzim 1-antisens (BACE1-AS), BACE1 mRNA'sını stabilize ederek Alzheimer hastalığının patogenezinde aktif bir rol

oynar (51). LncRNA HOTAIR'in beyin tümörlerinde upregüle edildiği ve tümör metastazını desteklediği, ayrıca meme, mide, kolorektal ve rahim ağzı kanseri hücreleri gibi çeşitli kanser hücrelerinde onkojenik bir rol oynadığı bildirilmiştir (52). Memeli genomlarının on binlerce lncRNA'yı kodladığı ve bu lncRNA'ların % 40'a kadarının spesifik olarak beyinde ifade edildiği bilinmektedir (53).

Alzheimer Hastalığı ile ilgili yakın zamanda yapılan bir çalışma, lncRNA'lar NEAT1 ve BC200'ün plazma seviyelerinin, AH'nin gelişimi ve ilerlemesi için potansiyel kan bazlı biyobelirteçler olarak kabul edilebileceğini bildirmiştir (54). İnsanlarda nöroblastoma farklılaşma markörü 29 (NDM29), nöroblastoma hücrelerinde farklılaşma sürecini malign olmayan nöron benzeri bir fenotipe doğru yönlendirir (53). NDM29'un Alzheimer hastalarının serebral korteksinde, kontrollerle karşılaştırıldığında, belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir. NDM29, APP mRNA'sını ve protein seviyelerini önemli ölçüde artırır ve iki ana Aβ izoformu olan $A\beta_{1-42}$ ve $A\beta_{1-40}$'ın üretimini artırır. $A\beta_{1-42}$'nin Alzheimer hastalığının beyinlerindeki amiloid plakların ana bileşeni olduğu bilinmektedir (55). Erken B hücre faktörü 3 (EBF3), koku alıcı nöronlarda ve bu nöronların öncüllerinde ifade edilir ve apoptoz, hücre döngüsü durması ve nörogenezde önemli roller üstlenir. Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuş farelerde yapılan bir çalışmada, hipokampüste EBF3 ifadesinin yüksek olduğu bulunmuştur. EBF3-AS ise, protein kodlayan gen EBF3'ün karşı zincirinden transkribe edilen bir RNA'dır. EBF3-AS lncRNA'sının ifadesinin azaltılmasının, EBF3 gen ifadesini düşürdüğü ve aynı zamanda insan SH-SY5Y hücrelerinde okadaik asit veya Aβ tarafından indüklenen apoptozu inhibe ettiği bulunmuştur (56). Bu kanıtlar, EBF3-AS'nin Alzheimer hastalığı tedavisi için yeni bir terapötik hedef olarak potansiyel sunduğunu göstermektedir. Başka bir lncRNA olan 51A ise, insanlarda SORL1 geninin antisens konfigürasyonundan RNA polimeraz III tarafından intron 1'e kopyalanır. SORL1'in aksine, lncRNA 51A seviyeleri post-mortem Alzheimer hastalığı beyinlerinde upregüle edilir ve SORL1 protein üretiminin azalmasına ve alternatif bir varyantın üretiminin artmasına yol açar. Sonuç olarak, APP işleme ve Aβ üretiminin düzenleyicisi olarak 51A, Aβ sekresyonunu destekler (57). Bütün bu kanıtlar, pek çok lncRNA'nın biyolojik önemini artırmaktadır ve yapılan hassas, yüksek verimli genomik transkriptom çalışmaları AH ile ilişkili birçok lncRNA'nın varlığını keşfetmiştir.

2.6. Uzun Kodlamayan Intergenik RNA 00968 (linc00968)

Linc00968, uzun kodlamayan bir RNA olarak, akciğer adenokarsinomu, osteosarkom, meme kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) gibi farklı kanser türlerinde yoğun şekilde araştırılmıştır. Araştırmalar, linc00968'in akciğer adenokarsinomunda farklı moleküler yolakları hedefleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe etmede kritik bir rol oynadığını göstermektedir (58). Osteosarkomda ise linc00968, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolaklarını aktive ederek hücre migrasyonunu ve invazyonunu teşvik eden bir onkogen olarak işlev gösterir (59). Bununla birlikte, meme kanserinde linc00968'ün tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev görebileceği, PI3K/Akt ve Ras sinyal yolakları gibi hücresel sinyal yolaklarını etkilediği belirtilmiştir (60). NSCLC'de ise linc00968'ün Wnt sinyal yolaklarını aktive ettiği ve bu nedenle prognostik bir biyobelirteç ve terapotik hedef olarak potansiyel taşıdığı belirtilmiştir (61). Linc00968'ün kanser hücrelerinde miR-9-3p, miR-22-5p, miR-668-3p, miR-3675-3p ve miR-4536-3p gibi çeşitli mikroRNA'ların düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (62). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise, linc00968'ün koroner arter hastalığında düzensiz bir ekspresyon profiline sahip olduğu bildirilmiş, bu da kardiyovasküler sağlık açısından potansiyel rolünü vurgulamaktadır (63). Sonuç olarak, Linc00968 farklı kanser türlerinde çeşitli fonksiyonlar sergilemekte; bağlamına bağlı olarak hem onkogen hem de tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmektedir. Çeşitli sinyal yolaklarındaki karmaşık düzenleyici rolleri ve miRNA'larla olan etkileşimleri, kanser araştırmalarında potansiyel terapotik hedef ve prognostik belirteç olarak önemini vurgular. Ancak, güncel lietaratüre bakıldığında linc00968 hakkında yapılan çalışmalar kısıtlıdır ve linc00968 ile Alzheimer hastalığı patogenezi arasındaki doğrudan bağlantıyı inceleyen bilinen bir çalışma bulunamamıştır.

2.7 Apoptoz

Apoptoz, içsel genetik programlama tarafından düzenlenen bir tür programlı hücre ölümüdür. Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif bozuklukta gözlenen hücre kaybı, apoptoz mekanizmaları ile açıklanabilir (64). Alzheimer hastalığının patogenezinde apoptozun rolü, hastalığın başlangıcından

itibaren önemli bir faktördür. Öğrenme, hafıza ve kognitif fonksiyonlar için kritik olan hipokampüs ve serebral korteks gibi beyin bölgelerinde zamanla biriken nöronların ölümü apoptoz yoluyla gerçekleşir (65). AH'nin başlıca patolojik özellikleri, ekstraselüler Aβ birikimini, NFT'lerin intranöronal agregasyonunu ve nöronal kaybı (nörodejenerasyon) içerir.

Apoptoz, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, protein parçalanması, DNA parçalanması ve fagositoz gibi farklı morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilir. Bu süreçte, hücre özel proteolitik enzimler olan sistein-aspartik proteazlar (kaspazlar) tarafından içeriden parçalanır. Apoptozun başlatılması ve devam ettirilmesi için öncelikle bu kaspazların aktive edilmesi gerekmektedir (66). Etkinleştirici Fas ligand (FasL) seviyeleri, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ekspresyonunu etkileyebilir (67). Ayrıca, mitokondri apoptozun uyarılmasında önemli bir rol oynar. Mitokondri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) merkezidir ve artan ROS konsantrasyonu amyloid beta (Aβ) oluşumunu artırabilir. Bu durum, mitokondriyal solunum zinciri kompleksi IV'ün işlevsiz hale gelmesine neden olabilir. Dolayısıyla, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, apoptoz aracılığıyla nöron ölümünün karakteristik özelliğidir. Ayrıca, presenilin 1 içeren γ-sekretaz kompleksleri, amyloid prekürsör proteinini (APP) dış mitokondriyal membrana taşıyabilir ve burada APP'yi Aβ proteini üretmek üzere parçalayabilirler (68).

Böylece apoptozda rol oynayan kaspazlar, beyin hücrelerinde hücre içi veya hücre dışı olarak oluşturulan Aβ oligomerleri tarafından doğrudan veya dolaylı olarak aktive edilir. Kaspazlar tarafından gerçekleştirilen DNA ve hücresel protein parçalanması sonucunda nöron hücreleri parçalanabilir. Alzheimer hastalığı (AH) olan bireylerde, anti-apoptotik proteinlerden biri olan Bcl-2 gibi proteinlerin ekspresyonu baskılanırken, proapoptotik proteinler (örneğin Bax, Bak) ve kaspaz aktivasyonu, nörofibriler yumaklar ile birlikte yükselir. Yukarıda belirtilen bulgular, Alzheimer hastalığının patogenezinde apoptozun rol oynadığını doğrulamaktadır (67) (68).

2.7.1 Ekstrinsik Apoptoz Yolağı

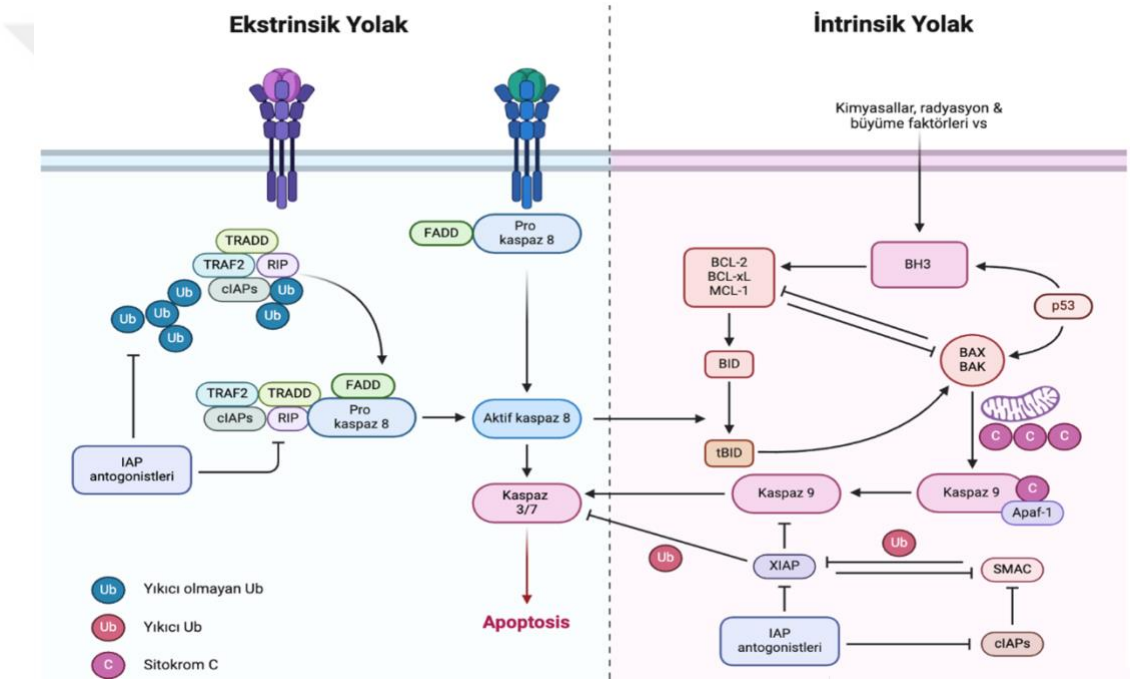
Bu yoldaki en erken sinyaller hücre dışından geldiğinden, bu apoptoz yoluna "ekstrinsik yolak" denir. Bu yol genellikle tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR)

süper ailesinin bir alt ailesi tarafından başlatılır (67,69). Bu apoptotik yolun işlev görmesi için TNF gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörleri gereklidir. Alzheimer hastalığında Fas ve diğer apoptotik sinyal moleküllerinin (Fas-L, FADD, kaspaz-3, 8 ve Bcl-2) ekspresyonunda artış gözlenir. (70). Fas'ın artmış ekspresyon seviyeleri, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ekspresyonunu etkileyebilir. Fas ligandı, hedeflenen hücrelerin yüzeyindeki Fas reseptörleri ile etkileşime girdiğinde ekstrinsik apoptotik yolak aktive olur. "Fas İlişkili Ölüm Alanı" (FADD), apoptoza yol açan bir dizi hücre içi süreci tetikler (71). Hücre dışı bölmede biriken Aβ, hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla kaspazları aktive edebilir (72). Kaspazlar, ekstrinsik yolaktaki son adımlarda "kaspaz şelalesi" olarak bilinen bir süreçte kendi aktivasyonlarını birbirlerine çoğaltırlar (73). Kaspaz-8, efektör kaspazlar olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder; bu aktive edilen kaspazlar ise hücre içinde parçalanma sürecini başlatır (70,73).

2.7.2 İntrinsik Apoptoz Yolağı

İntrinsik veya mitokondriyal yolak, hücre içinden gelen ölüm sinyalleriyle başlatılan, reseptör aracılı olmayan apoptotik yolaktır. Ölüm sinyali, büyüme faktörlerinin eksikliği, sitokinler, hormonların eksikliği, radyasyon, hipoksi, viral enfeksiyonlar, toksinler ve oksidatif stres gibi çeşitli faktörlere maruz kalmayı içerebilir (73). Alzheimer hastalığında apoptotik süreç, endoplazmik retikulumda üretilen hücre içi Aβ veya Aβ'nin mitokondriyal alkol dehidrojenaza gibi proteinlere bağlanmasıyla oluşan stres tarafından tetiklenebilir (73,74). Tüm bu tetiklenmeler sonucunda, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği (mPTP) aktive olabilir. Bu gözeneğin açılması, mitokondriyal membranın geçirgenliğini değiştirir ve buna Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği (MOMP) denir. Mitokondriyal transmembran potansiyelindeki azalma ve proapoptotik proteinlerin salınımı da bu mitokondriyal geçirgenlik değişikliğiyle tetiklenir (67). Ek olarak, yeni çalışmalar ER'nin apoptotik sinyalleri algılama ve iletim yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (68,75,76). Mitokondrideki Bcl-2 ve Bcl-XL gibi pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge, bu süreci kontrol etmek için önemlidir. Antiapoptotik proteinler, sağlıklı hücrelerde proapoptotik proteinlerle etkileşerek apoptozu engelleyebilir. Ancak, Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonu, bir hücre

yaralandığında veya hayatta kalma sinyallerinin bloke edildiği durumlarda azalabilir veya engellenebilir (71). Bak ve Bax, bir hücre apoptoz sürecine girdiğinde mitokondride serbest bırakılır ve burada bir dizi mekanizmayı etkilerler. Bu serbestleşme, mitokondriyal bileşenlerden biri olan sitokrom-c'nin (Cyt-c) sitoplazmaya çıkışına yol açar. Serbest kalan Cyt-c, Apaf-1 proteinine bağlanarak kaspaz kaskadını aktive eder. Bu etkileşim sonucunda Apaf-1 ile birleşen Cyt-c, kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 daha sonra downstream efektör kaspazları olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi etkinleştirir. Bu süreç apoptoz ile sonuçlanır ve hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 3). (68) (77).



Şekil 3. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolakları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Çok sayıda çalışma, apoptozun çeşitli bileşenlerinin, özellikle de Bcl-2 ailesi üyelerinin ifade profillerinin Alzheimer hastalığında sağlıklı beyinlerle karşılaştırıldığında değiştiğini göstermiştir. Bcl-2 ailesinin üyeleri, Bax, Bak, Bad, Bid ve Bim gibi proteinlerle ya pro-apoptotik ya da anti-apoptotik olarak kategorize edilebilir. Örneğin, Bcl-x pro-apoptotik bir protein iken, Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 anti-apoptotik özellik gösterirler (68,78). Aβ yanıtında, pro-apoptotik olan Bim geni ifadesi artar (upregüle), anti-apoptotik Bcl-2 geni ifadesi azalır (downregüle) ve pro-apoptotik

Bax proteinleri aktive olur (79,80). Ayrıca, mikroglia hücrelerinde ifade edilen anti-apoptotik Bcl-xL'nin Aβ birikintileri ile birlikte lokalize olduğu ve astrositleri aktive ettiği gösterilmiştir (81). Ek olarak, Bcl-2 proteinleri hücre içi kalsiyumu kontrol eder ve kalsiyum sinyalizasyonundaki düzensizlikler, apoptotik Bcl-2 proteinleri ile Alzheimer hastalığının ilerlemesi arasında bir bağlantı sağlamıştır. Bcl-2 ailesi üyelerine ek olarak, apoptotik kaspazlar da Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir (82). Kaspaz-3, APP'yi parçalayarak beyinde Aβ plak oluşumunu ve sinaptik kaybı tetikleyebilir. Bu olay ayrıca davranışta gözle görülür değişikliklere neden olabilir (83). Kaspaz-3 aktivasyonu ile birlikte, kaspaz-8 ve kaspaz-9'u aktive etmek Aβ plak oluşumunu indükleyebilir (83,84).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırmamızın tipi deneyseldir.

3.2 Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Araştırmamız, DEÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Tablo 2. Araştırma Planı

Çalışma Süreci	**Çalışmanın aşamaları**
Ocak 2019- Şubat 2019	Tez önerisi hazırlanması
Şubat 2019- Nisan 2019	Etik kurul onayının alınması
Ekim 2020- Ekim 2021	Proje başvurusunun yapılması Deney malzemelerinin satın alınması
Kasım 2021- Ocak 2023	Deneylerin gerçekleştirilmesi/Analizleri
Haziran 2023- Nisan 2024	Tez yazım süreci

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmamızda insan kökenli nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y ve transient transfeksiyon sonucu elde ettiğimiz linc00968 ekspresyonu bakımından suskun SH-SY5Y hücre hattı kullanıldı. Deney gruplarımız $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen SH-SY5Yve linc00968 ekspresyonu baskılanmış SH-SY5Y, kontrol grubumuz ise SH-SY5Y hücre hattıdır.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmamızda insan kaynaklı nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y kullanıldı.

3.4 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken BCL-2, BAX ve CYT-C ekspresyonları; bağımsız değişken ise baskılanmış linc00968 ekspresyonudur.

3.5 Veri Toplama Araçları

Çalışmada kullanılan materyaller ve yöntemler ana hatları ile aşağıdaki gibidir.

3.5.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmamızda kullanılan hücreler; SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı (ATCC CRL-2266, ABD)'dır. Diğer malzemeler detayları ile beraber aşağıdaki gibidir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan malzemeler ve markaları

Çalışmada Kullanılan Malzeme	**Markası**
Penisilin/Streptomisin	Gibco™
Tripsin-EDTA	Capricorn
DMEM-F12 medium	Capricorn
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biological Industries
Filtre Kapaklı T25 ve T75 Hücre Kültürü Flaskları	Thermo Scientific
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
10X Phosphate Buffer Saline (PBS)	Gibco™
96 ve 6 Kuyulu Plakalar	Thermo Scientific
5 ml ,10 ml ve 25 ml Serolojik Pipet	Greiner
15 ml'lik ve 50 ml'lik Santrifüj Tüpleri	Isolab
1,5 ml Mikrosantrifüj tüpü	Nest
0,5 ml Mikrosantrifüj tüpü	Nest
Kryojenik Vial	Biosharp
PCR Tüpü	Qiagen
Trizol Reagent	Applichem

cDNA Sentez Kiti	ThermoFisher
SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix
Linc00968, Bcl-2, Bax, Cyt-c ve β-aktin qRT-PCR primerleri	Eurofins Genomics
MTT	Biotium
BCA Protein Assay Kiti	Takara
RNA-iMAX	Invitrogen
ECL Görüntüleme Solüsyonu	Bio-Rad
PVDF Transfer Membranı	Bio-Rad, Transblot Turbo
Protein Markır	Thermo Scientific PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder
RIPA buffer	Thermo Scientific
Akrilamid	BioShop
Bisakrilamid	BioShop
Yağsız Süt Tozu	ChemCruz
Beta Merkaptoetanol	Sigma Aldrich
Bcl-2 primer antikoru	ProteinTech
Bax primer antikoru	Bioss
Cyt-c primer antikoru	ProteinTech
Beta Aktin primer antikoru	Cell Signaling
HRP-konjuge anti-mouse ve anti-rabbit sekonder antikorları	ProteinTech
OptiMEM medium	Gibco
Proteaz Fosfataz İnhibitör Kokteyli	Invitrogen
$A\beta_{25-35}$ fragmanı	Sigma Aldrich
Tris Baz	BioShop
Glisin	Merck
Tween-20	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Thermo Scientific

Amonyum persülfat (APS)	Bio-Rad
TEMED	Thermo Fisher

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Çalışmada Kullanılan Cihaz	**Markası**
Sınıf II Laminar Akışlı Biyogüvenlik Kabini	Nuve LN 090
Karbondioksit İnkübatörü	Nuve EC 160
Inverted Mikroskop	Olympus CKX41
Su Banyosu	Nüve NB9
PCR Cihazı	Eppendorf
Real Time PCR Cihazı	Qiagen
Görüntüleme Cihazı	Vilber E-Box, Vilber Infinity
Vorteks	Labnet
Manyetik Karıştırıcı	WiseStir
Hassas Elektronik Tartı	Swiss Quality
4°C Buzdolabı	Beko
-20°C Buzdolabı	Beko
-80°C Derin Dondurucu	Hettich Freezer
Ph Metre	Hanna HI 221
Çalkalayıcı	Red Rocker
Western Blot Tankı	Bio-Rad
Güç kaynağı	Bio-Rad
Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi	Bio-Rad
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf
Santrifüj	Eppendorf, Hettich Zentrıfugen
Isı Bloğu	Major Science
Spektrofotometre	Thermo Scientific MultiScan GO
Membran Görüntüleme Cihazı	Vilber

3.5.2 Çalışmada Kullanılan Metod

Çalışmamız kapsamında hücre kültürü, Kongro kırmızısı ile amiloid beta protein fibrillerinin gösterimi, $A\beta_{25-35}$ uygulaması ile in-vitro Alzheimer nörotoksisite modeli oluşturulması, hücre canlılık testi, siRNA transfeksiyonu ile linc00968 ifadesinin susturumu, RNA ve protein izolasyonu, qRT-PCR, western blot ve flow sitometri metodları uygulandı.

3.5.2.1 Hücre Kültürü

3.5.2.1.1. Hücrelerin Üretimi ve Pasajlanması

Çalışmamızda kullandığımız SH-SY5Y hücreleri %10 fatal sığır serumu ve % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM F-12 Ham çoğaltıldı ve % 5 CO_2 ve 37 °C koşullara sahip inkübatörde kültüre edildi. SH-SY5Y hücreleri ters faz ışık mikroskobu altında kontrol edildi ve konfluensi %80 ila 90'a ulaştığında tripsinizasyon işlemine tabii tutuldu. İlk olarak flasktan besiyerinin tamamı çekildi. 1x PBS ile hücrelerin yüzeyi yıkandı ve PBS toplanarak atıldı. 25 cm^2'lik ve 75 $cm^{2'lik}$ flask için sırasıyla 1 ml ve 3 ml %0.025 (v/v) Tripsin/EDTA'dan eklenerek 5 dakika inkübasyon için CO_2'li inkübatöre kaldırıldı. Bu işlem ile hücrelerin extraselüler matrix yüzeyinden ayrılması sağlandı. İnkübasyon sonrası hücreler inkübatörden alınarak hücrelerin üzerine besiyeri eklendi. Bu aşamada hücrelerin agregat oluşturmasının engellenmesi amacıyla pipetaj işlemi yapıldı. 1200 rpm hızında 5 dakika santrifüjlenen hücrelerin çoğalmaları için yeni flasklara paylaştırılarak inkübatöre kaldırıldı.

3.5.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücrelerin dondurulması işleminde kullanılan dondurma ortamının içeriğinde %10 hücre yapısını koruma özelliği olan dimetilsülfoksit (DMSO) ile %90 oranında FBS kullanıldı.

Hücrelerin dondurulması için tripsinizasyon yapılmış hücreler 1200 rpm hızında 5 dakika süre ile santrifüjlendi. Santrifüj yapıldıktan sonra üst faz aspire edildi ve üzerine pellet yoğunluğuna göre 1 ya da 1.5 ml dondurma ortamı eklendi ve hücreler

kriyotüplere paylaştırıldı. Kriyotüp üzerine hücre pasaj bilgileri yazılarak kademeli bir şekilde önce -20 ˚C sonra -80 ˚C derin dondurucuya kaldırıldı.

SH-SY5Y hücreleri çalışmada kullanılacağı zaman -80 ˚C'li derin dondurucuda muhafaza edilen kriyotüpten 37˚C su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözünme işlemi gerçekleştirildi. Çözünme işlemi sonrasında hücreler uygun miktarda besiyeri ile santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet kısmında bulunan hücreler 25 cm^2'lik kültür flaskları için 5 ml; 75 cm^2'lik kültür flaskları için ise 15 ml besiyeri bulunan kültür kaplarına alınarak 37 ˚C ve %5 CO_2 koşullara sahip inkübatörde kültüre edildi.

3.5.2.1.3. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin pasajlanması işlemindeki santrifüj basamağına kadar aynı işlemler yapıldı ve daha sonra homojenize edilen hücre süspansiyonundan 25 µL alınarak ependorfa konuldu ve üzerine 25 µL tripan mavisi solüsyonu eklendi. Bu karışımdan 10 µL alınarak Neubauer lamı ve lamel arasına yayıldı. Ters-faz ışık mikroskobunda 10x büyütme altında sayıldı. Neubauer lamında, ideal olarak tüm karelerin ya da hücre sayısı fazla ise 16 küçük kare içeren 4 ayrı alanın sayılarak ortalaması alındı. Hücre süspansiyonundaki hücre yoğunluğunu (hücre sayısı/mL) belirlemek amacıyla hesaplama yapıldı.

Hesaplama: Ortalama sayılan hücre x seyreltme faktörü x 10^4

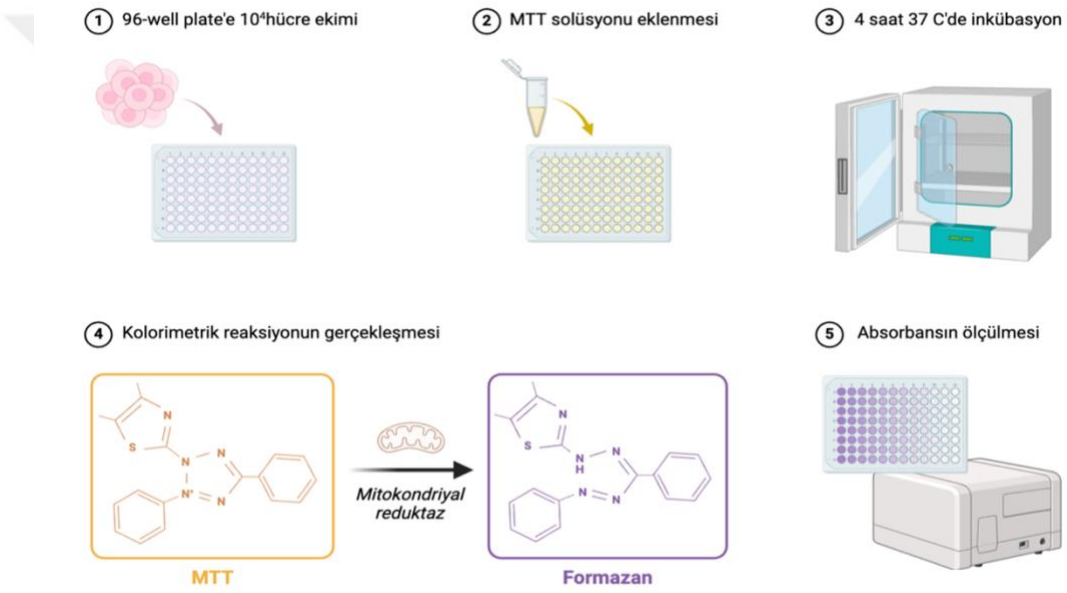
3.5.2.1.4. Aβ Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan 1 mg $A\beta_{25-35}$ toksik fragment ultra saf su ile çözülerek 1 mM konsantrasyonunda stok solüsyonu hazırlandı ve 1 ml ependorf tüplere aliquotlandı. Deneylerden önce Aβ fibril peptid oluşumu için 72 saat 37 ºC'de inkübe edildi. Kullanıma kadar -20 ˚C derin dondurucuda saklandı.

3.5.2.2 MTT Assay

Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) redüksiyonu yöntemi, hücre topluluklarındaki canlı hücre oranını kolorimetrik olarak kantitatif bir şekilde belirlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntem,

canlı hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalama yeteneğine dayanır. İşlem, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlı olarak gerçekleşir. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu, soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşür. Sonuç olarak, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücrelerin bulunduğu ortam mor renkte görünürken, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerin bulunduğu ortam renklenmez. Bu yöntem, hücrelerin MTT boyası ile inkübasyonunu, presipite reaksiyon ürününün uygun çözücü ile çözündürülmesini ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçülmesini içeren basamaklardan oluşur (Şekil 4).



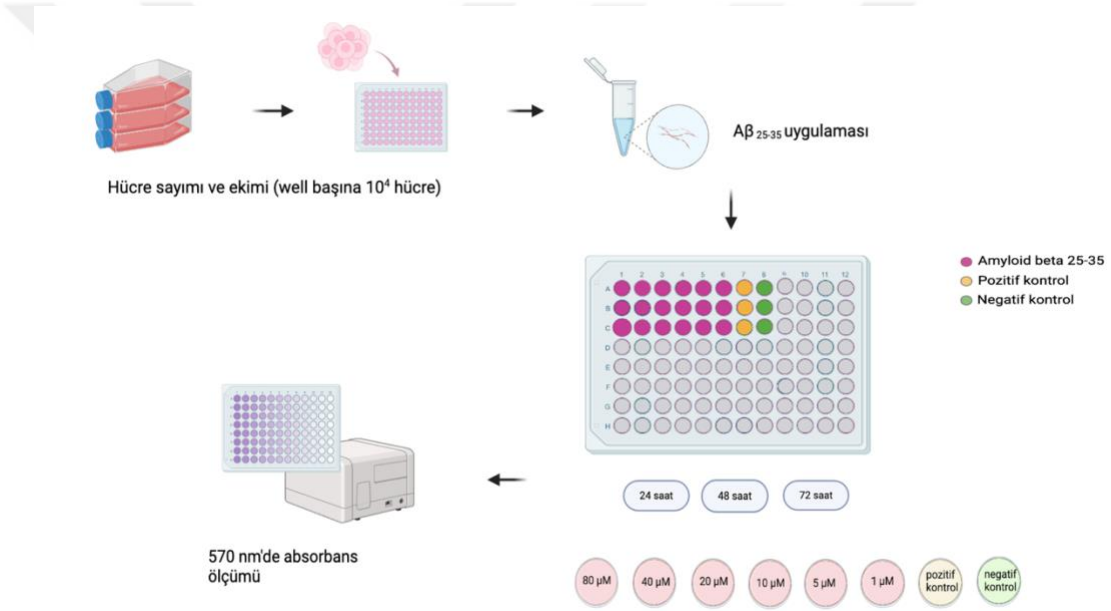
Şekil 4. MTT Tuzunun mitokondriyal reduktaz ile formazan kristallerine dönüşümü (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

MTT testi yapılmadan önce hücreler 96-kuyulu plakalara kuyu başına 1x10^4 hücre düşecek şekilde ekildi ve her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı. Hücrelerin bölünmelerini senkronize etmek amacıyla serum içermeyen besiyeri hazırlandı. Deney düzenekleri 24, 48 ve 72 saat için ayrı olarak kuruldu. Son iki kuyucuğa pozitif kontrol (hücre ve %1 DMSO) ve negatif kontrol (yalnız hücre) grupları eklendi. 24 saat sonra hücrelere belirlenen dozlarda (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM) fibrile edilmiş $A\beta_{25\text{-}35}$ fragmanı eklenerek ilgili kuyulara %1 DMSO ilave edildi. Bu kuyular,

maksimum hücre ölümünün gözlendiği kontrol grubu olarak değerlendirildi. Daha sonra 24, 48 ve 72. saatlerde 10 mg/mL MTT solüsyonu ilave edildi. MTT solüsyonu ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlık ortamda yapıldı ve plaka alüminyum folyo ile kaplanarak 4 saat süreyle 37 °C ve %5 CO^2 ortamında inkübe edildi. Dört saat sonra, formazan kristallerinin çözülmesini sağlamak amacıyla 100 µL DMSO eklendi. İki saatlik inkübasyonun ardından 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile absorbans ölçümleri yapıldı. Deney düzeni Şekil 5'te gösterilmiştir.

Hesaplama:

% Canlılık = (Örnek Abs-ΔKontrol II Abs/ ΔKontrol I Abs-ΔKontrol II Abs) x 100



Şekil 5. MTT Testi deney düzeneğinin şematize edilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.5.2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney düzeni oluşturulurken hücreler sayıldı ve 6-kuyulu plakalara ekim yapıldı. Hücrelerin tutunması için 24 saat bekledikten sonra, %50 oranında nöronal hücre ölümüne yol açtığı bilinen 40 µM $A\beta_{25-35}$ peptidi kullanıldı. Peptid fragmanları her kullanımdan önce 72 saat boyunca 37 °C'de fibrile olacak şekilde hazırlandı. Aynı gruplardan ikişer tane oluşturularak çift tekrar yapıldı ve bu hücreler farklı tampon

çözeltiler ile toplanarak qRT-PCR ve western blot deneylerinde kullanılmak üzere saklandı.

Deneylerde oluşturulan gruplar şu şekildedir:

- **Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmayan grup. 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı.
- **40 µM $A\beta_{25-35}$ Grubu:** SH-SY5Y hücrelerine 40 µM $A\beta_{25-35}$ uygulaması yapılan grup. 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı.
- **40 µM $A\beta_{25-35}$ + si-NC Grubu:** SH-SY5Y hücrelerine 40 µM $A\beta_{25-35}$ uygulaması ve scramble dizi ile transfekte edilen grup. 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı.
- **40 µM $A\beta_{25-35}$ + si-linc00968 Grubu:** SH-SY5Y hücrelerine 40 µM $A\beta_{25-35}$ uygulaması ve siRNA ile susturulmuş linc00968 (si-linc00968) ile transfekte edilen grup. 72 saat sonra üst sıvıları toplanıp saklandı ve hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı.

3.5.2.3 Amiloid 25-35 peptidinin Kongo kırmızısı ile boyanarak gösterilmesi

Kongo kırmızısı, benzidindiazo-bis-1-naftilamin-4-sülfonik asidin sodyum tuzu olarak bilinir. Bu boyar madde, polarize ışık altında çift kırılma gösterir ve amiloid fibrilleri üzerinde düzenli bir şekilde hizalanabilir. Amiloid fibrillerle non-polar hidrojen bağları oluşturarak özellikle amiloid beta plaklarına spesifik olarak bağlanabilir. Bu özellikleri sayesinde, amiloid beta 25-35 peptidi ile muamele edilen hücreler kongo kırmızısı ile boyandı ve kültürdeki amiloid beta dağılımı gözlemlendi.

3.5.2.3.1. Kongo kırmızısı ile boyamada kullanılan kimyasallar

- *Kongo Kırmızısı Stok solüsyonu*: 0.3 gr kongo kırmızısı boyası ve 0.3 gr sodyum klorür tartıldı, 100 ml %80 alkol içinde çözülerek hazırlandı. 0,2µm'lik steril filtreden geçirilip alikotlandı.
- *Sodyum hidroksit:* 1 gr NaOH 100 ml ddH_2O içinde çözülerek hazırlandı.
- *Kongo Kırmızısı çalışma solüsyonu:* %1 NaOH 100 ml ddH_2O içinde çözülerek hazırlandı.

• *Alkalin alkol solüsyonu:* 1 ml %1 NaOH ile %50 alkolün karıştırılması ile elde edildi.

3.5.2.3.2. Kongo kırmızısı ile boyama protokolü

İki ayrı 33 mm²'lik petri kabına, hücre kültürü çalışmaları için uygun olan steril lameller yerleştirildi. Hücrelerin tutunmasını ve boyama protokolünü desteklemek için petri kapları poli-D-lizin ile kaplandı. Bu işlem için 10 mg/ml konsantrasyonunda poli-D-lizin kullanıldı. Her bir 33 mm²'lik petri kabına 500 µl poli-D-lizin eklenerek, laminer flow kabin içinde 5 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra kaplanmış taban dikkatlice pipet yardımıyla çekilerek fazla poli-D-lizin çıkarıldı. Ardından ddH2O ile yıkandı ve tekrar pipet yardımıyla su çekilerek durulandı. Petri kabı içi kapağı açık bir şekilde kurumaya bırakıldı ve bu işlem laminer flow kabinde yaklaşık 30 dakika boyunca devam etti.

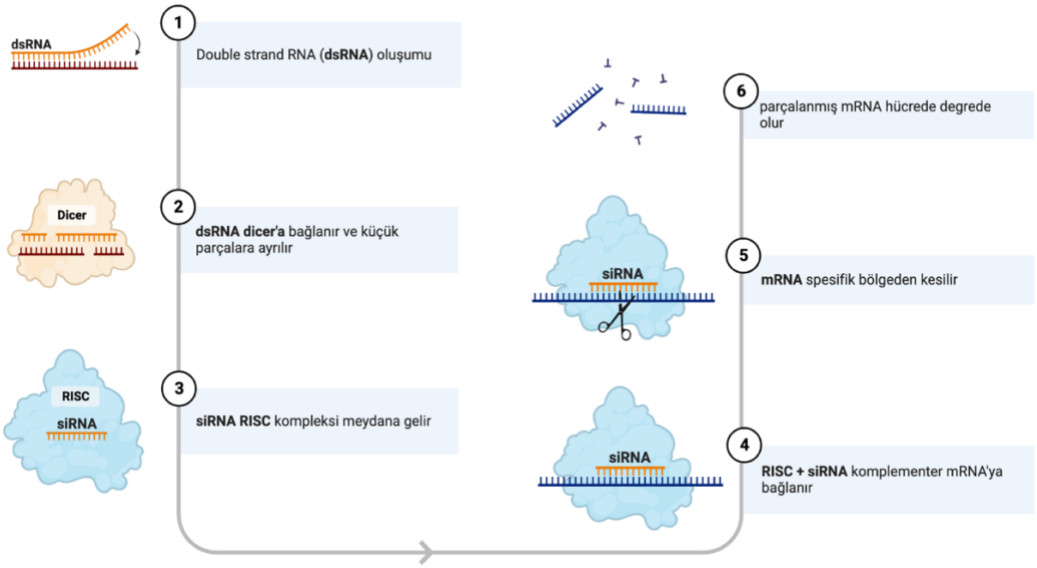
Hücreler, biri kontrol grubu diğeri ise 40 µM amiloid beta 25-35 ile muamele edilen grup olmak üzere, her iki grupta da 2x10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra besiyeri çekilip atıldı ve hücreler PBS ile üç kez yıkandı. Petri kaplarına 1 ml Kongo kırmızısı çalışma solüsyonu eklendi ve 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petri kapları PBS ile durulandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra, lameller hızlıca 9-10 kez alkalin alkol solüsyonuna daldırıldı. Daha sonra lameller 1 ml hematoksilen-eozin boyası ile 30 saniye boyunca işlem gördü, ardından amonyaklı su ile 30 saniye boyunca işlem gördü. 10 dakika boyunca ultra saf suda inkübasyon yapıldıktan sonra lameller kurumaya bırakıldı ve inverted ışık mikroskobunda incelendi.

3.5.2.4 Transfeksiyon

RNA interferans (RNAi), çift iplikçikli RNA'nın (dsRNA) hücreye girdiği zaman spesifik bir mRNA molekülünün diziye özgü olarak parçalanmasıyla sonuçlanan bir gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma hem hücre sitoplazmasında hem de nukleusunda gerçekleşebilir. Sitoplazmada, RNA interferansı sırasında dsRNA'lar transkripsiyon sırasında mRNA'ların kesilmesini veya translasyon sırasında translasyonun engellenmesini sağlayarak genin susturulmasını sağlarlar. Bu süreçte, özellikle microRNA'lar (miRNA) ve small interfering RNA'lar

(siRNA) rol oynarlar. Nukleusta ise, RNA interferansı transkripsiyon sırasında mRNA'ların sentezinin engellenmesi yoluyla genin susturulmasını sağlar. Bu mekanizma, özellikle transkripsiyon sürecinde dsRNA'ların hedeflenen mRNA'lar üzerine etki etmesiyle gerçekleşir.

RNA interferans sistemi, hücrede gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Çalışmanızda linc00968 geninin ifadesini susturmak için siRNA (si-linc00968) ve negatif kontrol dizisi (si-NC) (scramble) kullanıldı. Small interfering RNA (siRNA)'lar, eksojen kaynaklı çift iplikçikli RNA (dsRNA) moleküllerdir ve genellikle 20-25 nükleotid uzunluğundadır. Bu siRNA'lar hücre içine girdiğinde, Dicer enzimi tarafından tanınarak yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda küçük fragmanlara ayrılırlar. Bu fragmanlar daha sonra RISC (RNA-aracılı ile indüklenen susturma kompleksi) adı verilen bir kompleks ile birleşirler. Çift iplikli siRNA molekülleri, RISC ile kompleks oluşturduktan sonra hedeflenen mRNA'ya bağlanırlar. Bu süreç sonunda siRNA, hedef mRNA'yı tanır ve onu parçalar, böylece hedeflenen genin ifadesi baskılanmış olur (Şekil 6). Bu mekanizma sayesinde, siRNA'lar özellikle belirli genlerin ifadesini hedefleyerek gen susturmasını sağlarlar. Bu süreç, gen ifadesini düzenleme ve belirli mRNA moleküllerinin seviyelerini kontrol altında tutma açısından önemli bir araç olarak kullanılır ve genellikle deneysel çalışmalarda genetik manipülasyon ve fonksiyonel analizlerde kullanılır.



Şekil 6. RNAi mekanizması (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Linc00968 ifadesini baskılamak için linc00968 dizisini hedef alan si-linc00968 10 µM konsantrasyonda kullanıldı. Linc00968 'i susturacak (knockdown işlemi) siRNA havuzu (siRNA; 10 µM) ile negatif kontrol siRNA 'sı ticari olarak satın alındı (Eurofins Genomics). Linc00968' e ait siRNA dizileri şu şekildedir:

Linc00968 siRNA: 5'-CAAUGAGAGUAAAGAGAAA-3' ve 5'-UUAAAGAUGUGGAGAACUA-3'.

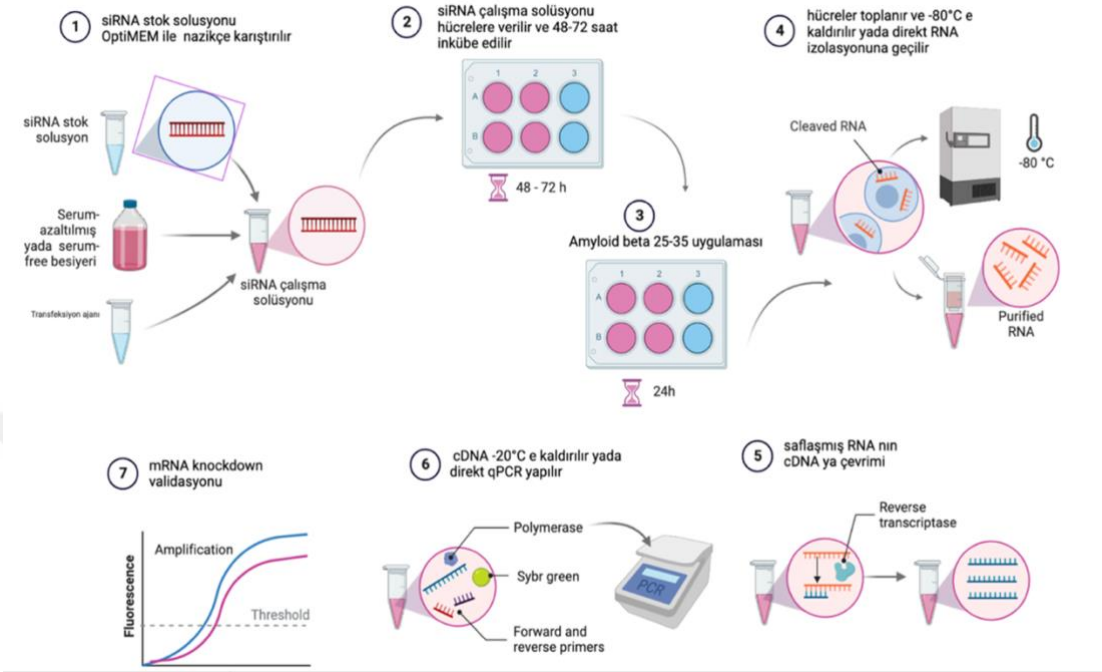
Transfeksiyon için hücreler, 6-kuyulu plakalara her bir kuyuda 1 x 10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler %90 konfluenta ulaşıncaya kadar çoğaltıldı. 24 saat sonra besiyeri, %10 FBS içeren ancak antibiyotik içermeyen besiyeriyle değiştirildi. RNA-lipid kompleksi, Tablo 3'te belirtilen protokole göre hazırlandı ve hücrelere uygulandı.

Tablo 5. siRNA ile Transfeksiyon Protokolü

Linc00968 siRNA		
Ekilen hücre miktarı		1x 10^6
A	siRNA (10 µM)	4-8 µl
	Opti-MEM	150 µl
B	RNA-İMAX transfeksiyon ajanı	5 µl
	Opti-MEM	150 µl

Transfeksiyon için hazırlanan A ve B tüpleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra, A tüpü B tüpüne aktarılarak hafif pipetaj ile homojen hale getirildi. Karışım, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi ve ardından yaklaşık 10-15 cm yükseklikten hücrelere eklendi. 12 saat sonra ilgili kuyulara etkin dozda $A\beta_{25-35}$ peptidi eklendi. Transfeksiyonun 48. saatinde, hücreler RNA izolasyonu için trizol ile ve total protein izolasyonu için RIPA tamponu ile kazınarak toplandı. Hücreler

1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen pelletler -80°C'de saklanmak üzere kullanıma kadar muhafaza edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Transfeksiyon deney düzeneğinin şematize edilmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.5.2.5 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücrelerden Total RNA izolasyonu Trizol reaktifi yardımıyla yapıldı.

- Öncelikle, 6-kuyulu plakadaki hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırıldı ve toplanan hücreler santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Elde edilen pelletin üstündeki süpernatant dikkatlice atıldı. Sonrasında, hücreler 250 µl Trizol reaktifi ile çözüldü ve buna ek olarak 50 µl kloroform ilave edildi.
- Karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra, soğuk +4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucu oluşan üst şeffaf tabaka dikkatlice alınarak yeni seril ependorf tüpüne transfer edildi.
- Üzerine 125 µl izopropanol eklenerek tekrar +4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

• Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve elde kalan pellet, 250 µl %75 soğuk etanol ile yıkanarak +4°C'de 7500 rpm'de 5 dakika daha santrifüj edildi.

• Oluşan süpernatant yeniden atıldıktan sonra, pellet 20 µl RNAz içermeyen su ile çözülerek -80°C'de saklandı.

• Toplam 1,5 µg RNA, üreticinin protokolüne göre High Capacity cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA'ya ters transkribe edildi. Reaksiyon koşulları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. cDNA Çevrimi

RNA	1,5 µg
10X RT buffer	2.0 µl
10X Random primers	2.0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µl
RNase inhibitor	1.0 µl
Nukleaz-free su	3.2 µl
Toplam	10.0 µl

Karışım hazırlandıktan sonra 10 ul RNA örneği eklenerek total 20 ul reaksiyon tablo 7'deki koşullara göre PCR cihazında cDNA'ya çevrildi.

Tablo 7. cDNA Çevrimi Koşulları

Ayarlar	**1.aşama**	**2.aşama**	**3.aşama**	**4.aşama**
Sıcaklık	25°C	37°C	85 °C	+4 °C
Süre	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∝

3.5.2.6 qRT-PCR

Linc00968'in ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifade seviyelerini belirlemek için SYBR-Green MasterMix ile Rotor-Gene Q PCR sistemi kullanılarak kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) yapıldı. Her bir 100 ng/µl cDNA örneği, SYBR Green kullanılarak qRT-PCR için kalıp olarak kullanıldı. 2X qPCR SYBR-Green MasterMix

kullanım talimatına göre; 10 µl 2X SYBR-Green 0,6 µl forward ve reverse primer, 2 ul cDNA kalıbı ve 6.8 ul ddH_2O. mRNA'lar için PCR koşulları aşağıdaki gibidir;

- 94°C'de 10 dakika ön denatürasyon,
- 95°C'de 10 saniye denatürasyon,
- 58°C'de 15 saniye bağlanma (annealing)
- 72°C'de 20 saniye uzatma (extension)

Toplamda 40 döngü olacak şekilde gerçekleşti. GAPDH housekeeping geni, mRNA ifadesi için internal kontrol olarak kullanıldı. Primerlerin nükleotid dizileri tablo 8'de gösterildiği gibidir.

Tablo 8. Primer Dizileri

Transcript adı	Primer dizisi
LINC00968	Forward: 5'-CCTGGACCTTCTGTTTATCC-3'
	Reverse: 5'-AGCAGCGCTTCTAAACTCTG-3'
BCL-2	Forward: 5'-ACCTGACGCCCTTCAC-3'
	Reverse: 5'-AGGTACTCAGTCATCCAC-3'.
BAX	Forward: 5'-AAGAAGCTGAGCGAGT-3'
	Reverse: 5'-GCCCATGATGGTTCTG-3'
CYT-C	Forward: 5'-TGGGTGATGTTGAGAAAG-3'
	Reverse: 5'-GCCCATGATGGTTCTG-3'
GAPDH	Forward: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG -3'
	Reverse: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

Tüm primerler, Eurofins Genomics tarafından tasarlanıp sentezlendi. Gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) reaksiyonları, Qiagen'in Rotor-Gene Q PCR sisteminde gerçekleştirildi. Her mRNA'nın (BCL-2, BAX ve CYT-C) relatif ifadesi, GAPDH genine göre ve 2^(-ΔΔCt) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Hesaplamalar, Light Cycler 2.0 yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.5.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Linc00968 ve apoptotik genlere ait primerlerin doğru bölgelere bağlandığını teyit etmek için %1 ila %2'lik agaroz jel üzerinde görüntüleme yapıldı. Jel hazırlığı için 1 gr agaroz, 100 ml TBE (Tris-borat-EDTA) tamponunda çözündürüldü. Agarozun tamamen çözülmesi için çözelti mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra çözelti hafifçe soğutuldu ve içine 0.5 µg/ml ethidium bromür (EtBr) eklenerek karıştırıldı. Önceden hazırlanmış jel tankına çözelti döküldü ve uygun taraklar yerleştirilerek polimerizasyona bırakıldı. Numuneler, 6X jele yükleme tamponu ile karıştırılarak jel üzerine yüklendi. Ayrıca moleküler ağırlıkların saptanması için uygun DNA ladder (50-500 bp aralığında) kullanıldı. Jel, 1X TBE tamponu içinde 10 volt/cm elektrik akımı altında çalıştırıldı ve sonrasında UV görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.5.2.8 Western Blot

SH-SY5Y hücre hattında linc00968 geninin ifadesinin susturulduğu ve sürdürüldüğü hücrelerde apoptotik gen ürünlerinin değerlendirilmesi için SDS-PAGE tabanlı western blot yöntemi kullanıldı.

3.5.2.8.1. Protein Eldesi

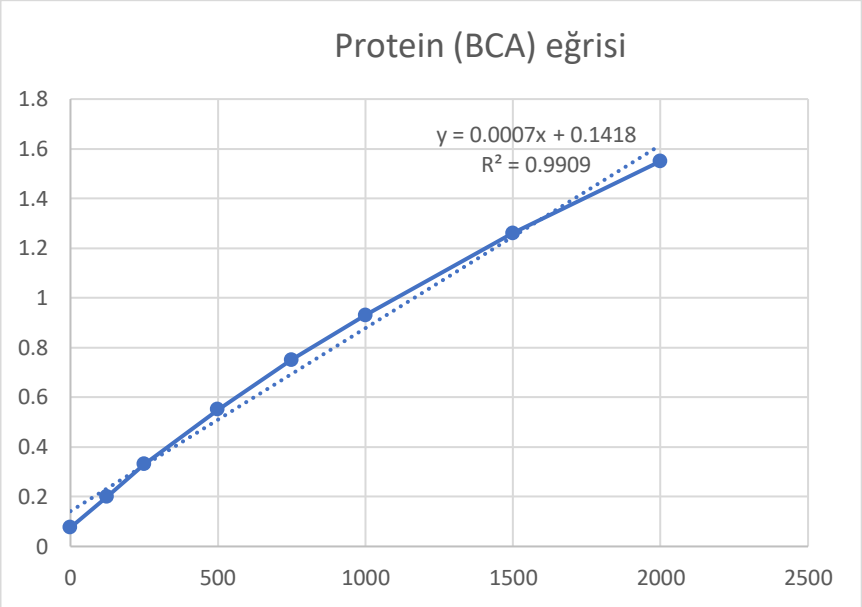
Proteinlerin izolasyonu için yapılan işlemler şu şekildedir:

- Hücreler 250xg hızında santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı.
- Soğuk PBS ile hücreler 3 kez yıkandı.
- Sonrasında hücreler 15000 rpm hızında santrifüj edilerek PBS uzaklaştırıldı.
- 10 ml RIPA tamponu içine 1 tablet proteaz inhibitör kokteyli eklenerek tamponla iyice karıştırıldı.
- Örnekler RIPA tamponu ile homojen hale getirildikten sonra 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Bir seri pipetaj ve vorteks işlemi yapılarak örnekler buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon süresinin sonunda örnekler 15000 rpm hızında +4°C'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

- Elde edilen süpernatant steril eppendorf tüplere aktarıldı.

3.5.2.8.2. Protein Miktar Tayini

BCA kiti (Takara, T9300A, USA) yardımıyla total protein konsantrasyonu Bisinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile kolorimetrik olarak belirlendi. Bu yöntemde, proteinler alkali ortamda Cu^2+ iyonlarını Cu^1+ iyonlarına indirger (Biyüret reaksiyonu), ardından bisinkoninik asit içeren bir reaktif kullanılarak Cu^1+ iyonlarının oluşturduğu renk değişimi ölçülür. Protein izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra, 1/5 oranında sulandırılmış örneklerin BCA assay kitine göre protein miktarları belirlendi. Ölçüm için 2 mg/ml BCA standartları (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 0 µg/ml) kullanıldı. Hazırlanan örnek ve standartlar 96 kuyucuklu plaklara eklendi. Absorbans ölçümleri, 562 nm dalga boyunda MultiSkan GO microplate spektrofotometre cihazında gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle proteinlere ait standart eğri oluşturuldu ve örneklerin protein konsantrasyonları bu eğriye doğrultusunda hesaplandı.



Şekil 8. Protein standart eğrisi (BCA)

3.5.2.8.3. SDS-PAGE jelin hazırlanması ve Western Blot analizi

Western blot analizi için kullanılan kimyasalların ve yöntemin hazırlanışı detaylı olarak aşağıda açıklanmıştır:

Proteinlerin yüklemeye hazırlanması için BCA assay ile belirlenen protein konsantrasyonuna göre örnekler 40 µg protein içerecek şekilde steril eppendorf tüplere aktarıldı. Thermo Owl P8DS Western Blot sisteminin stantları hazırlandı. Tablo 7'de belirtilen protokole göre ayrıştırma ve yükleme jelleri istenilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Jel stantlarına jeller döküldü ve tamamen polimerize olmaları için bekletildi.

Yürütme tankına, jellerin tamamen kaplanacak şekilde yeterli miktarda yürütme tamponu konuldu. Yürütme tamponu genellikle Tris-bazlı bir tampondur ve elektriksel akımın sağlıklı bir şekilde iletilmesini sağlar.

Proteinler, 3:1 oranında 4x yükleme tamponu (900 µl Laemli Buffer, 100 µl β-merkaptoetanol) ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Yükleme tamponu genellikle içeriğinde SDS (sodyum dodesil sülfat), β-merkaptoetanol veya DTT (ditiyotretol), gliserol ve bazen bromfenol mavi gibi bileşenler içerebilir. Bu bileşenler proteinlerin doğru yükleme ve ayrılmasını sağlar.

Hazırlanan örnekler 4x yükleme tamponu ile homojen hale getirildikten sonra, 95°C'de 5 dakika süreyle ısı bloğunda inkübe edildi. Bu işlem, proteinlerin denatüre olmasını ve SDS-PAGE jelinde doğru şekilde hareket etmelerini sağlar.

Isı inkübasyonu sonrası, örnekler daha önceden hazırlanan SDS-PAGE jeli içindeki yürütme tamponunda bekleyen boş kuyulara yüklendi. Jel üzerine yüksek gerilim uygulanarak, proteinlerin jel içinde ayrılması ve sonrasında transfer edilmesi için hazırlık yapıldı.

Örneklerin yüklendikten sonra jeller, 90 V akım altında 120-140 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. Bu süreçte, SDS-PAGE jeli içindeki proteinler SDS-PAGE tamponu ve elektrik alanın etkisiyle ayrıştı ve aşağı doğru hareket etti.

Tablo 9. Western Blot Jel Hazırlama Tablosu

	Ayrıştırma Jeli (Separating) %10	Ayrıştırma Jeli (Separating) %12	Yükleme Jeli (Stacking) %5
dH_2O	3,98 ml	3,4 ml	2,81 ml
%30 Akrilamid/bis-	3,32 ml	4 ml	0,8 ml

akrilamid			
1.5 M Tris pH: 8.8	2,5 ml	2,5 ml	-
0.5 M Tris pH: 6.8	-	-	1,25 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl	50 µl
%10 Amonyum persülfat (APS)	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Yukarıda belirtilen kimyasalların hazırlanması için adım adım talimatlar aşağıdaki gibidir:

1,5 M Tris (pH: 8,8) Hazırlanışı:

- 18,17 gr Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan) tartılır.
- 70-80 ml dH2O (deiyonize su) ilave edilerek çözülür.
- pH: 8,8'e ayarlanır. pH ayarı için gerekirse HCl (hidroklorik asit) veya NaOH (sodyum hidroksit) çözeltisi kullanılır.
- Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- +4°C'de saklanır.

0,5 M Tris (pH: 6,8) Hazırlanışı:

- 6,04 gr Tris tartılır.
- 70-80 ml dH2O ilave edilerek çözülür.
- pH: 6,8'e ayarlanır.
- Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- 0,8 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- +4°C'de saklanır.

%10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Hazırlanışı:

- 10 gr SDS tartılır.
- 100 ml dH2O ile çözülür.

- 0,8 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- +4°C'de saklanır.

%10 Amonyum Persülfat (APS) Hazırlanışı:

- 0,025 gr APS tartılır.
- 250 µl dH2O ile çözülür.
- 0,8 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- +4°C'de saklanır.

Yürütme Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.1 SDS) Hazırlanışı:

- İki jel yürütmek için (1 L) aşağıdaki miktarlar kullanılır:
- 3,03 gr Tris baz tartılır.
- 14,26 gr Glisin tartılır.
- 1 gr SDS tartılır.
- dH2O ile çözülür.
- Hazırlanan tampon +4°C'de saklanır ve kullanılmaya hazır hale getirilir.

3.5.2.8.4. PVDF membrana ıslak transfer

Transfer tamponunda dengeleme işlemi için, jel öncelikle transfer tamponu içinde 15 dakika boyunca inkübe edilir. PVDF (Polyvinylidene flüoride) membran, oda sıcaklığında metanol içinde 5 dakika boyunca inkübe edildi. Bu işlem membranın hidrofilik özellik kazanmasını ve proteinlerin membrana daha etkin bir şekilde transferini sağladı. Hazırlanmış PVDF membran, önceden kesilmiş ve hazırlanmış kurutma kağıtları ile birlikte sandviç modelinde hazırlandı. Bu adım, transfer işleminin sağlam bir şekilde gerçekleşmesini ve membranın jelin üzerine düzgün temasını sağladı. Islak transfer için +4°C'de 70-100 mA akım şiddeti ile 16-24 saat süreyle transfer işlemi yapılır. Bu süre boyunca elektrik akımı membran üzerindeki proteinleri jelden membrana doğru transfer eder. Düşük sıcaklıkta ve uzun süreli transfer, proteinlerin membrana tam ve etkili bir şekilde aktarılmasını sağlar.

Transfer Tamponu hazırlanışı (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.05 SDS):

- 2,42 gr Tris baz

- 11,41 gr Glisin
- 0,4 gr SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- 800 ml dH2O (Diyonize su)
- 200 ml Metanol

Bir behere 2,42 gr Tris bazı ve 11,41 gr Glisin eklendi. Üzerine 800 ml dH2O eklenerek karıştırıldı. SDS (0,4 gr) suya eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırıldı. Hazırlanan çözeltiye 200 ml metanol eklendi. +4°C'de çözeltiyi 200 ml metanol eklenmiş halde ıslak transfer için inkübasyona bırakıldı.

TBS-T (25 mM Tris pH:7.6, 34 mM NaCl, %1 Tween 20) hazırlanışı:

1X 500 ml TBS-T hazırlamak için; 50 ml 10X TBS, 450 ml dH_2O ve 500 µl Tween 20 çözeltisi kullanıldı.

%5 yağsız süt solüsyonu (bloklama solusyonu) hazırlanışı:

20 ml %5'lik yağsız süt hazırlamak için; 1 gr yağsız süt tozu 20 ml TBS-T de çözüldü.

3.5.2.7.5. İmmunoblotlama ve görüntüleme

Transfer işlemi sonrasında membranlar, jelin boyutlarına uygun olarak kesildi. SDS'i uzaklaştırmak için membranlar 5 dakika süreyle TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween-20) ile 150-200 rpm hızında çalkalanarak yıkandı.

Bloklama

Membranlar, %5 yağsız süt içeren TBS-T çözeltisi içinde 90-120 rpm hızında 1-2 saat boyunca bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem, membranın nonspesifik bağlanmayı önlemek için kullanılır.

Primer Antikor İnkübasyonu

İlgili primer antikor, %5 yağsız süt içinde uygun konsantrasyonda hazırlandı. Primer antikor, membran üzerinde oda sıcaklığında 1,5 saat veya 4°C'de overnight (gece boyunca) çalkalanarak inkübe edildi.

Primer antikor inkübasyonundan sonra membran, TBS-T ile oda sıcaklığında 5-15-5 dakika süreyle 150-200 rpm hızında çalkalanarak yıkandı.

Sekonder Antikor İnkübasyonu

HRP (Horseradish Peroxidase) bağlı sekonder antikor, %5 yağsız süt içinde uygun konsantrasyonda hazırlandı. Membran, sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca 90-120 rpm hızında çalkalanarak inkübe edildi.

Sekonder antikor inkübasyonundan sonra membran, TBS-T ile oda sıcaklığında 5-15-5 dakika süreyle 150-200 rpm hızında çalkalanarak yıkandı.

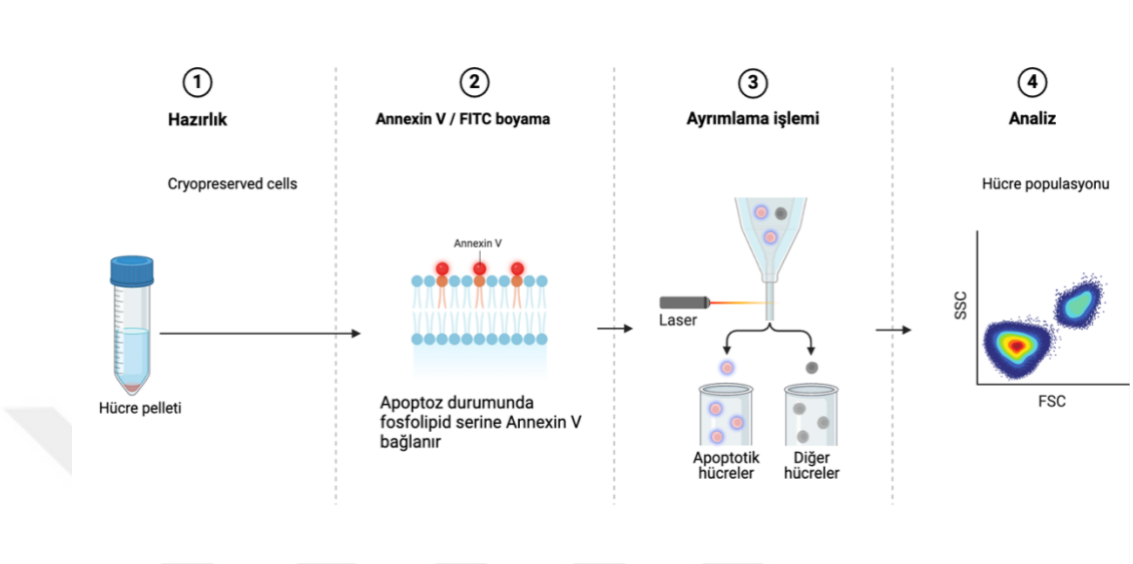
Kemilüminesans ve Görüntüleme

Yıkama işleminden sonra, spesifik protein bantları Enhanced Chemiluminescence (ECL) yöntemi ile görselleştirildi. Görüntüleme, Fusion FX Spectra veya benzeri bir kemilüminesans görüntüleme cihazında gerçekleştirilerek protein bantları İmage J programı yardımıyla analiz edildi.

3.5.2.9 Flow Sitometri

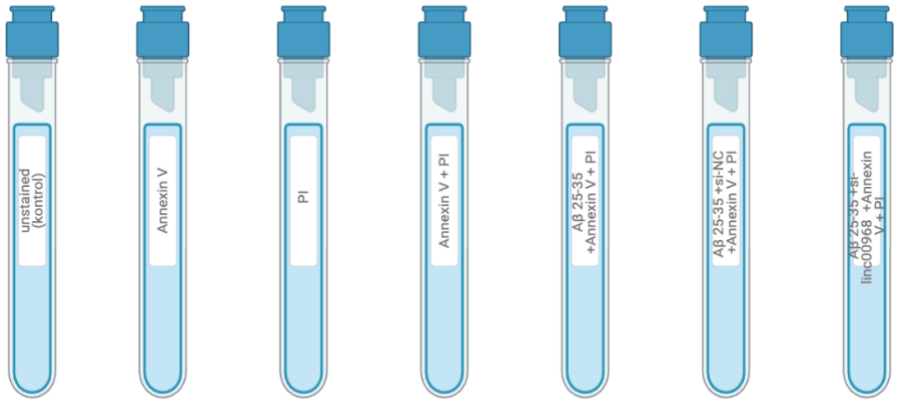
Flow sitometri, hücreleri tek tek geçirilen bir sıvı akışı içinde analiz eden bir tekniktir. Apoptotik hücrelerin tanınması için kullanılan Annexin-V ve Propidium iyodür (PI) gibi floresan boyalar, hücrelerin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemekte önemli rol oynar. Apoptoz sırasında hücre zarı üzerindeki fosfatidilserin dışa doğru hareket eder. Annexin-V, fosfatidilserine özgü olarak bağlanır ve bu nedenle apoptotik hücreleri tanımlamak için kullanılır. Genellikle yeşil floresan olarak etiketlenmiştir. Propidium iyodür, hücre zarı bütünlüğü kaybeden veya ölmüş hücrelerde kullanılan bir floresan boya olarak kullanılır. Canlı hücre zarı içine giremez, ancak ölmüş veya hasar görmüş hücrelerde hücre zarı bütünlüğü kaybı sonucunda DNA'ya bağlanarak kırmızı floresan verir. FITC, hedeflenen proteinler veya belirteçlerle etiketlenmiş olabilir. Örneğin, bir proteinin ekspresyonunu veya belirli bir hücre alt kümesini göstermek için kullanılabilir. Flow sitometri analizinde, hücreler bir akış hücresi içinden geçirilir ve lazer ışığı ile aydınlatılır. Bu süreçte, hücrelerin floresan sinyalleri algılanır ve bu sinyaller hücrelerin özelliklerine göre sınıflandırılır. Canlı hücreler, apoptotik hücreler veya ölmüş hücreler gibi farklı popülasyonlar, floresan boyaların etiketlediği belirteçlere göre ayırt edilir. Bu yöntem,

hücre popülasyonları içindeki apoptotik hücrelerin oranını belirlemek için yaygın olarak kullanılır ve hücre temelli çalışmalarda apoptozun incelenmesinde önemli bir araçtır (Şekil 9).



Şekil 9. Flow Sitometri deneyinin aşamaları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Çalışmamızda hücreler flow sitometri analizi için iki grup halinde, her biri iki tekrar olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra deney grubuna 40 µM $A\beta_{25-35}$ ve kontrol grubuna ddH2O uygulandı. Flaskın içerisindeki besiyeri 15 ml'lik bir falkona aktarıldı. Sonrasında hücreler PBS ile yıkandı ve PBS ortamı da aynı 15 ml'lik falkonun içine eklendi. Yaklaşık 1 ml 1X tripsin flaskın yüzeyine eklendi ve hafifçe sağa sola hareket ettirilerek yüzeye iyice dağıtıldı. Dağıtma işleminden hemen sonra yüzeydeki tripsin enzimi uzaklaştırılarak hücreler 37°C, %5 CO_2 koşullarında bulunan inkübatörde 2-3 dakika inkübe edildi. Yüzeyden ayrılan hücrelere 2,5 kat %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve yüzey besiyeri iyice temizlenerek daha önce kullanılan 15 ml'lik falkona aktarıldı. Hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki besiyerinin pellete dokunmadan aspire edildi ve üzerine yaklaşık 10 ml soğuk PBS eklenerek tekrar santrifüj yapıldı. PBS 15 ml falkondan aspire edildi ve hücreler 200 µl 1X bağlanma tamponu ile çözüldü.



Şekil 10. Flow sitometri deneyinde kullanılan grupların şematize edilmesi

Sonrasında hazırlanan 15 ml'lik falconlardan iyice pipetleme yapılarak 100'er µl örnek deney tüplerine aktarıldı (Şekil 10). Kontrol grubunda boyama işlemi yapılmayan (unstained) tüpe ekleme yapılmadan, PI tüpüne 4 µl PI, Annexin V tüpüne 4 µl Annexin V, PI + Annexin V tüpüne ise 4 µl hem PI hem de Annexin V eklendi. Kalan gruplara sırasıyla 4 µl Annexin V + 4 µl PI eklenerek tüpler karanlık bir ortamda 20 dakika bekletildi. Daha sonra üzerlerine 400 µl Binding Buffer eklenerek pipetleme yapıldı ve Beckman Coulter Flow Cytometry cihazında analizleri gerçekleştirildi.

3.5.2.10 İstatistiksel Analiz

Çalışmalar sonucunda toplanan veriler ortalama standart hata olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılıklar student-t, one-way ANOVA testleri ile kıyaslandı. *p* değeri 0.05'in altında olan değerler anlamlı kabul edildi. İstatistik analizlerde GraphPad Prism 9.0 version kullanıldı. Deney koşulları SH-SY5Y hücre hattında üç kez ve farklı zaman dilimlerinde en az üç defa tekrarlandı; sonuçlar ortalama±S.E.M. şeklinde sunuldu.

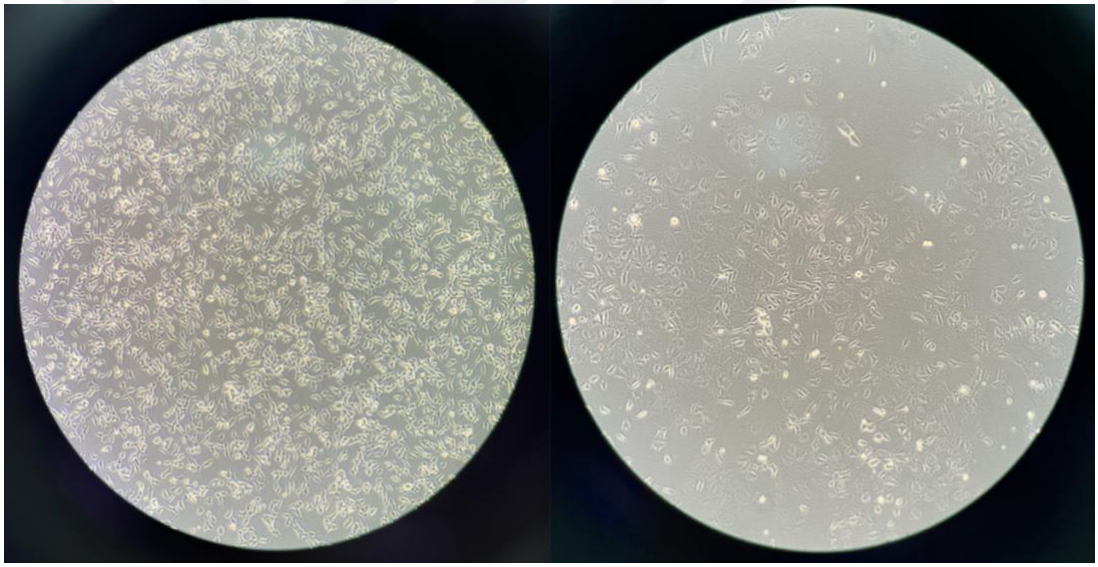
3.6 Etik Kurul Onayı

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 17.04.2019 tarihli ve 2019/10-09 numaralı karar ile etik onay almıştır (EK-1).

4. BULGULAR

4.1 SH-SY5Y Hücrelerine Amiloid Beta 25-35 uygulaması

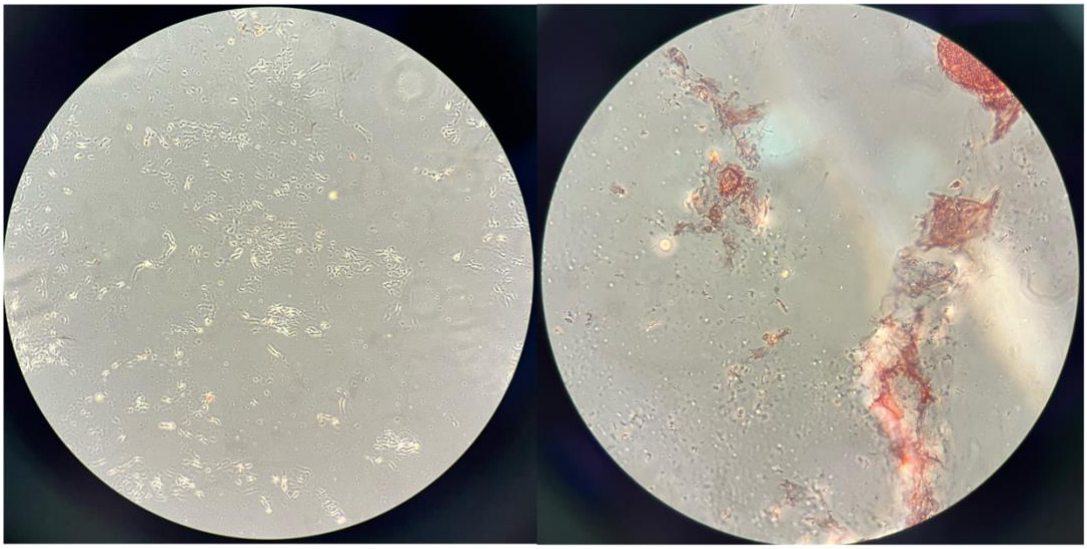
Uygun koşullarda kültüre edilen SH-SY5Y hücrelerine Aβ25-35 peptidi uygulandıktan sonra hücrelerde çeşitli morfolojik değişiklikler gözlemlendi. $A\beta_{25-35}$ peptidi uygulaması sonrasında SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik değişimleri peptid uygulanmamış kontrol gruplarıyla birlikte ışık mikroskobunda incelendi. Aβ25-35 peptidi uygulanmamış hücrelerin, uygulanan hücrelere göre daha yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra kontrol grubundaki hücrelerin uzantılarının ve dendrit benzeri yapıların, peptid uygulamasına maruz bırakılan hücrelerinkinden çok daha fazla ve belirgin olduğu gözlendi (Şekil 11).



Şekil 11. $A\beta_{25-35}$ peptidi uygulanmamış (solda) ve uygulanmış (sağda) SH-SY5Y hücrelerinin 10x büyütmede mikroskobik görüntüsü

4.2 Kongo Kırmızısı ile Amiloid Beta 25-35 Fibrillerinin Gösterimi

24 saat süreyle $A\beta_{25-35}$ peptidi uygulanmasından sonra SH-SY5Y hücreleri ışık mikroskobunda incelendi. $A\beta_{25-35}$ peptidinin kültürdeki dağılımı bir amiloid boyası olan kongo kırmızı ile boyanarak incelendi. Amiloid beta peptidinin gerek nöron toplulukları ve gerekse uzantılar üzerinde küçük veya büyük kümeler halinde toplandığı saptandı (Şekil 12).



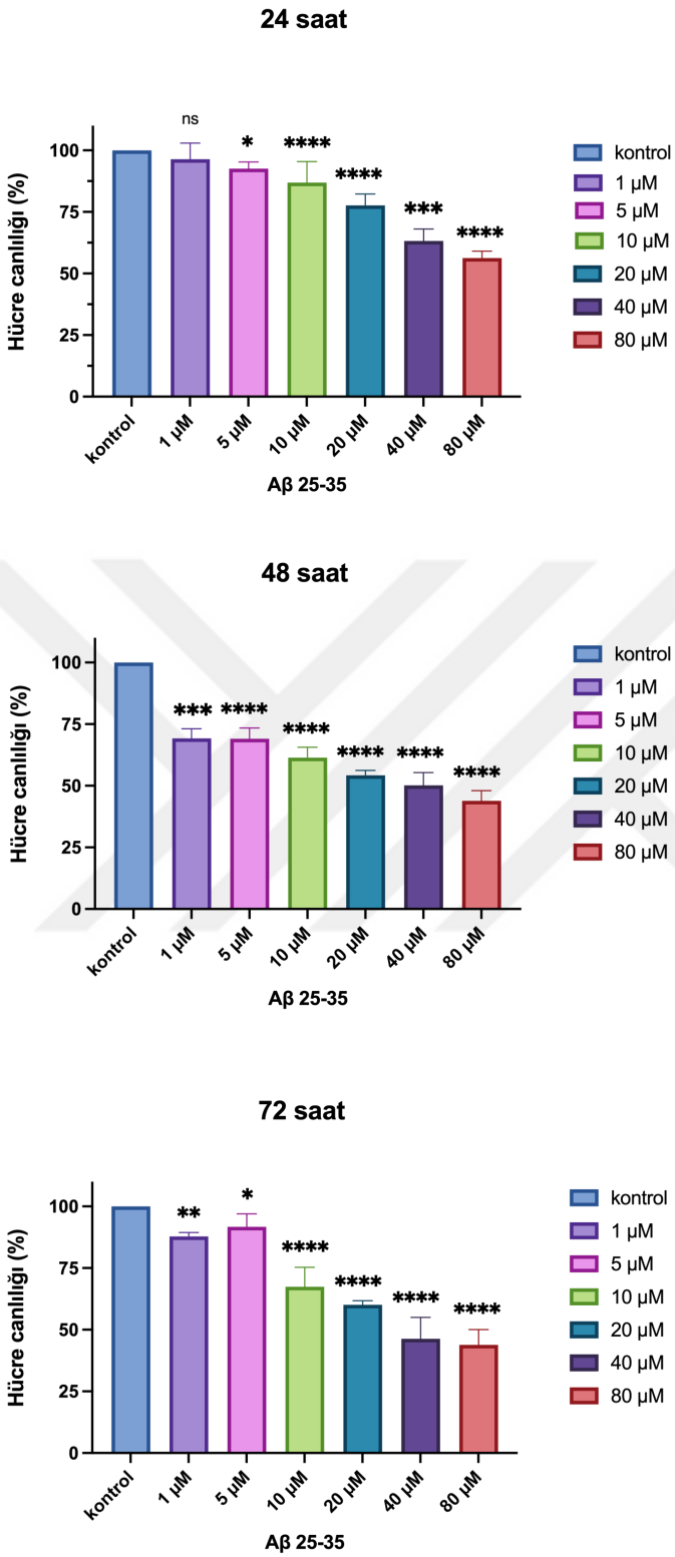
Kontrol SH-SY5Y, 20x

Aβ25-35 uygulanmış SH-SY5Y, 20x

Şekil 12. Kongo kırmızısı ile boyanan SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskobundaki görüntüleri. Hiçbir madde uygulanmayan kontrol grubu (sağda), 40 µM $A\beta_{25-35}$ uygulanan grup (solda)

4.3 MTT Analizinin Değerlendirilmesi

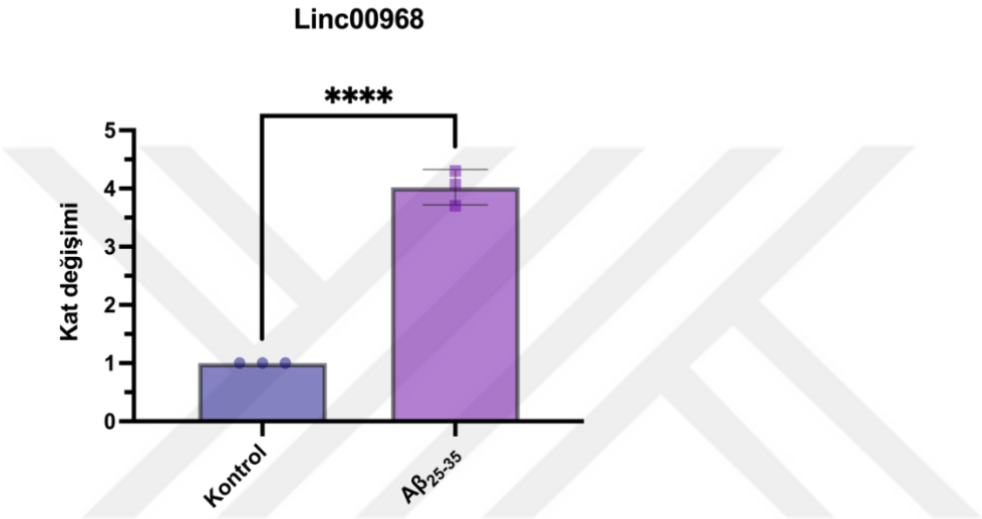
$A\beta_{25-35}$ uygulaması sonrasında SH-SY5Y hücrelerinin hücre canlılığını belirlemek ve uygulanan maddenin inhibisyon konsantrasyon (IC50) değerini saptamak için MTT analizi yapıldı. SH-SY5Y hücrelerine 0 (kontrol), 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM ve 80 µM konsantrasyonlar 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulandı. Yapılan uygulamalar sonucunda, kontrol grubuna göre 40 µM konsantrasyonunun hücre canlılığını 24 saatte %60, 48 saatte %51, 72 saatte ise %46 oranında azalttığı gözlendi ve IC50 değeri 40 µM olarak belirlendi. Daha sonraki deneylerde bu konsantrasyon üzerinde çalışıldı (Şekil 13).



Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan $A\beta_{25-35}$ maruziyetinin hücre canlılığı üzerine etkisi

4.4 SH-SY5Y Hücrelerinde Aβ25-35 Uygulaması Öncesi ve Sonrası linc00968 İfadesinin qRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

SH-SY5Y hücrelerinde linc00968 ifadesinin belirlenmesi amacıyla qRT-PCR yöntemi uygulandı. Yapılan 2^-delta delta Ct analizi sonuçlarına göre Aβ25-35 uygulanan hücrelerde linc00968 ifadesi Aβ25-35 uygulanmayan (kontrol) hücrelerine göre 4,06 kat yüksek bulundu (Şekil 14).

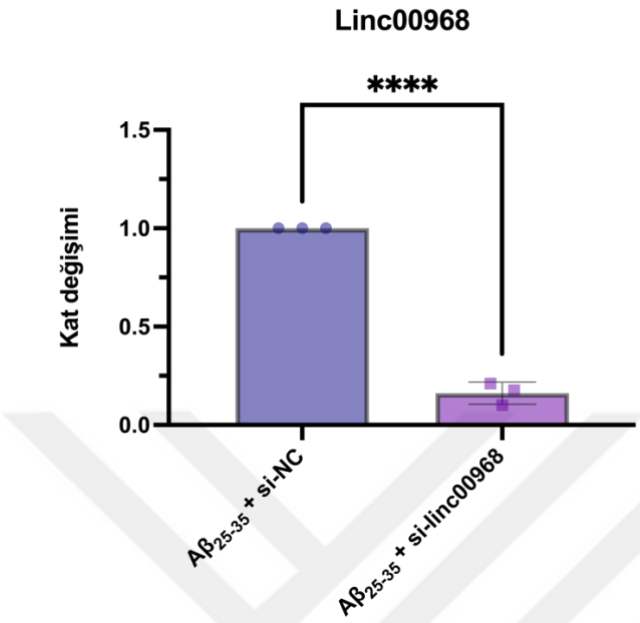


Şekil 14. SH-SY5Y Hücrelerinde Aβ25-35 uygulaması öncesi ve sonrası linc00968 ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001.

4.5 SH-SY5Y Hücrelerinde siRNA Aracılı Transfeksiyon Verimliliğinin qRT-PCR Yöntemi ile belirlenmesi

Linc00968 ifadesini baskılayan siRNA (si-linc00968) ile transfekte edilen SH-SY5Y hücrelerinde bu baskılanmanın Aβ 25-35 nörotoksisitesine etkisini araştırmak amacıyla, qRT-PCR yöntemi uygulandı. Yapılan 2^-delta delta Ct analizi sonuçlarına göre Aβ25-35 uygulanan ve linc00968'in susturulduğu hücrelerde linc00968 ifadesinin; Aβ25-35 uygulanan ancak scramble dizi ile transfekte edilen negatif kontrol (negative control- si-NC) hücrelere göre 0,17 kat azaldığı saptandı (Şekil 15). Bu sonuçlar si-

linc00968'in başarılı bir şekilde baskılandığını gösterdi ve transfeksiyon başarısı 5.8 kat olarak belirlendi.

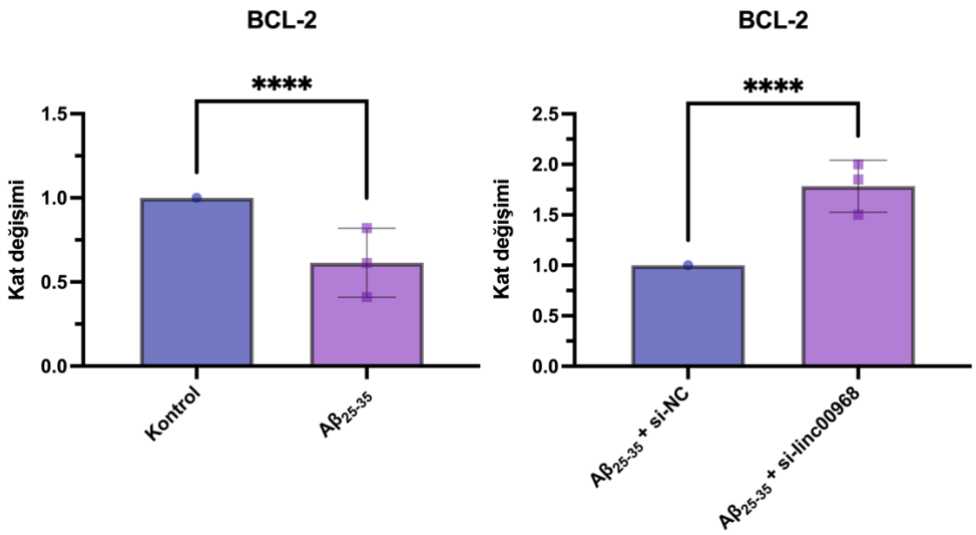


Şekil 15. SH-SY5Y Hücrelerinde Aβ $_{25\text{-}35}$ uygulaması sonrası si-NC ve si-linc00968 ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001.

4.6 SH-SY5Y Hücrelerinde Aβ$_{25\text{-}35}$ Uygulaması Sonrası Apoptotik Gen İfadelerinin Belirlenmesi

BCL-2

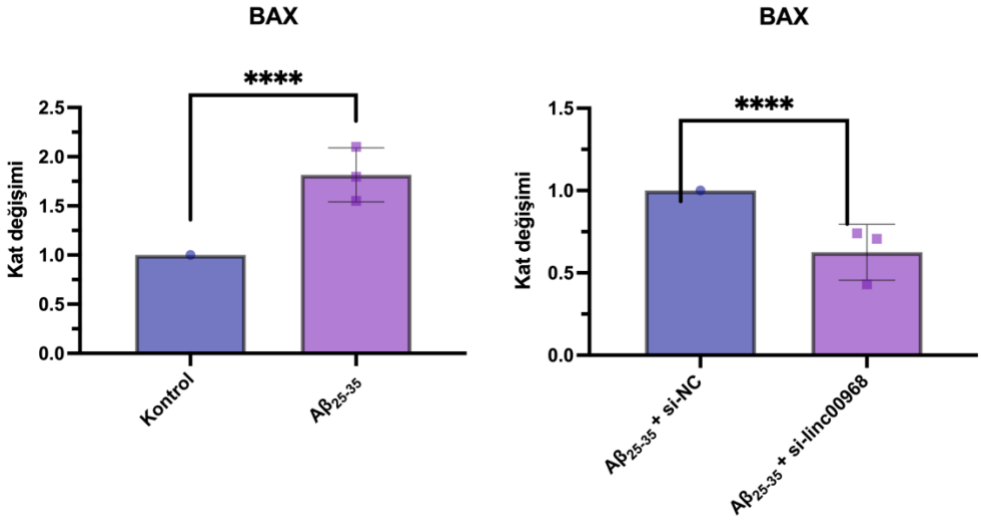
Linc00968'in ifadesinin baskılandığı SH-SY5Y hücrelerinde apoptotik gen ifade değişimlerini incelemek amacıyla qRT-PCR yapıldı. Yapılan 2^-delta delta Ct analizi sonuçlarına göre pro-apoptotik *BCL-2* geni ifadesinde; Aβ$_{25\text{-}35}$ uygulanan hücrelerde uygulanmayan kontrol hücrelerine göre 0,6 kat azalış görüldü. Ancak Aβ$_{25\text{-}35}$ uygulanan ve si-linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde, Aβ$_{25\text{-}35}$ uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulmadığı kontrol hücrelere göre 1,8 kat artış tespit edildi (Şekil 16).



Şekil 16. Aβ25-35 uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde BCL-2 gen ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001.

BAX

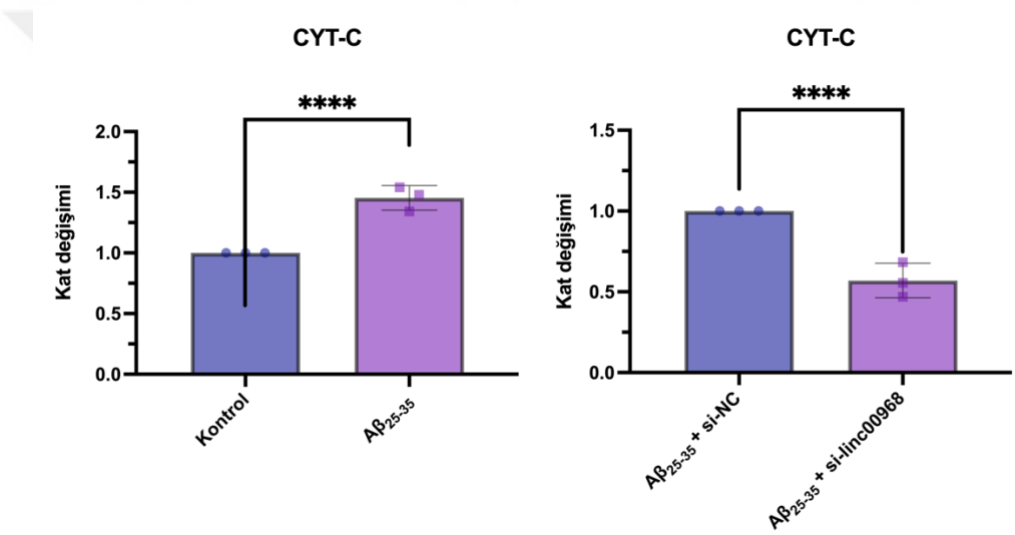
Linc00968'in ifadesinin baskılandığı SH-SY5Y hücrelerinde anti-apoptotik *BAX* geni ifadesine bakıldığında; Aβ25-35 uygulanan hücrelerde uygulanmayan kontrol hücrelere göre 1,81 kat artış; Aβ25-35 uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde ise Aβ25-35 uygulanan ancak susturmanın olmadığı kontrol hücrelere göre 0,67 kat düşüş tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17. Aβ25-35 uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde BAX gen ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001.

CYT-C

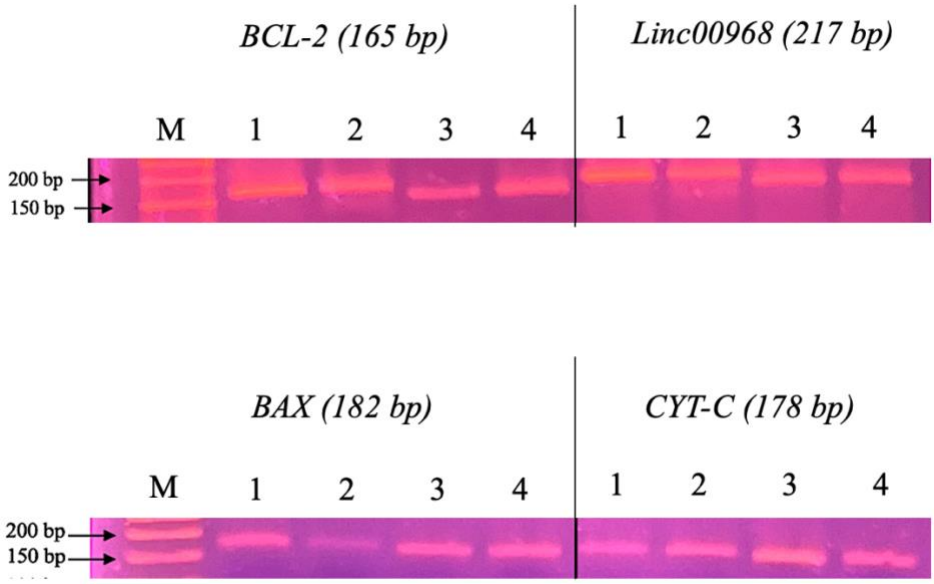
CYT-C ifadesine bakıldığında; Aβ25-35 uygulanan hücrelerde uygulanmayan kontrol hücrelere göre 1,4 kat artış ve Aβ25-35 uygulanan ve si-linc00968 ifadesinin baskılandığı hücrelerde Aβ25-35 uygulanan ancak baskılanmanın olmadığı kontrol hücrelere göre 0,5 kat düşüş tespit edildi (şekil 18).



Şekil 18. Aβ25-35 uygulanan ve linc00968 ifadesinin susturulduğu hücrelerde CYT-C gen ifadesinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ****p<0.0001.

4.7 Agaroz Jel Elektroforezi

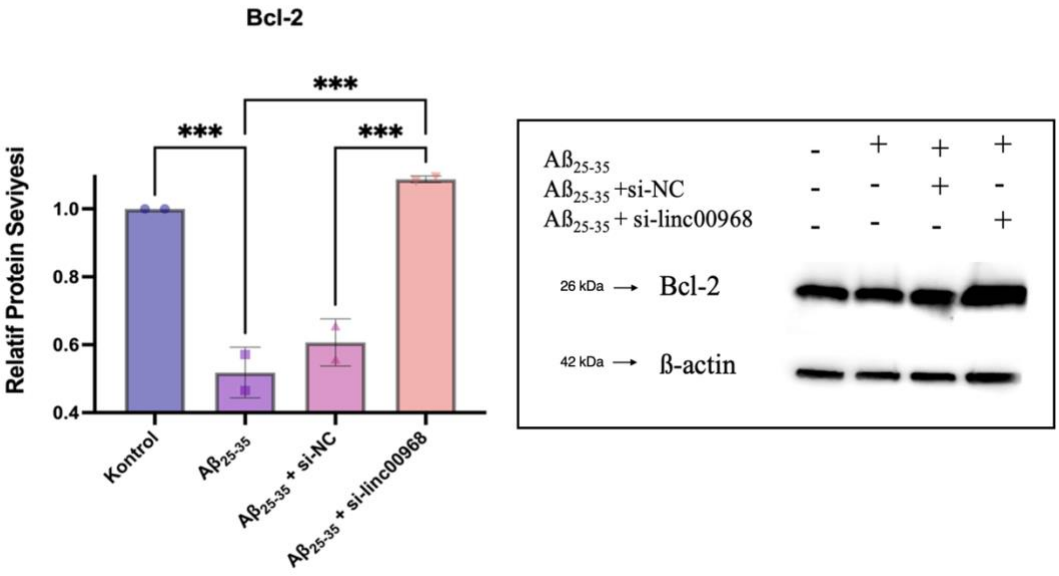
qRT-PCR sonrasında amplifikasyon ürünlerinin doğruluğunun kontrolü amacıyla PCR ürünleri %1'lik Agaroz jel elektroforezi sisteminde yürütüldü ve büyüklüklerine göre ayrımlanarak değerlendirildi. Agaroz jel görüntüleri Şekil 19'da verildi.



Şekil 19. PCR Ürünlerinin agaroz jelde gösterilmesi (M: 500 bp marker, 1: Kontrol grubu, 2: Aß$_{25-35}$ grubu, 3: Aß$_{25-35}$ si-linc00968 grubu, 4: Aß$_{25-35}$ si-NC grubu)

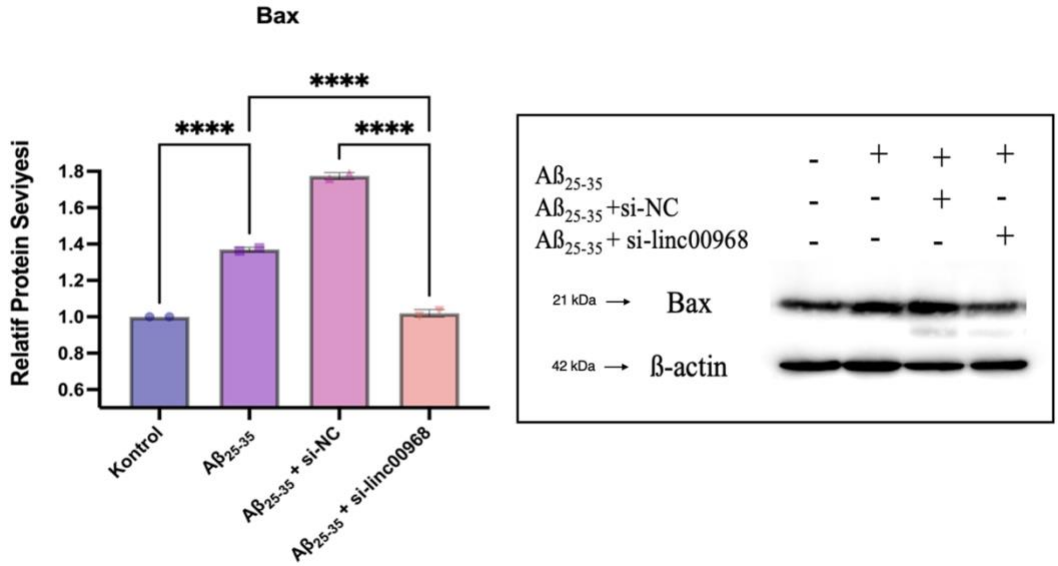
4.8 Apoptotik Protein Düzeylerinin Western Blot ile Değerlendirilmesi

Aβ$_{25-35}$ 'in ve si-linc00968'un proapoptotik ve antiapoptotik proteinler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan western blot çalışmasının sonuçlarına göre, Bcl-2 protein düzeyi Aβ$_{25-35}$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde kontrol hücrelerine göre azaldı. Ancak linc00968 ifadesinin baskılandığı ve Aβ$_{25-35}$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde Bcl-2 protein seviyesinin arttığı gözlemlendi (Şekil 20).

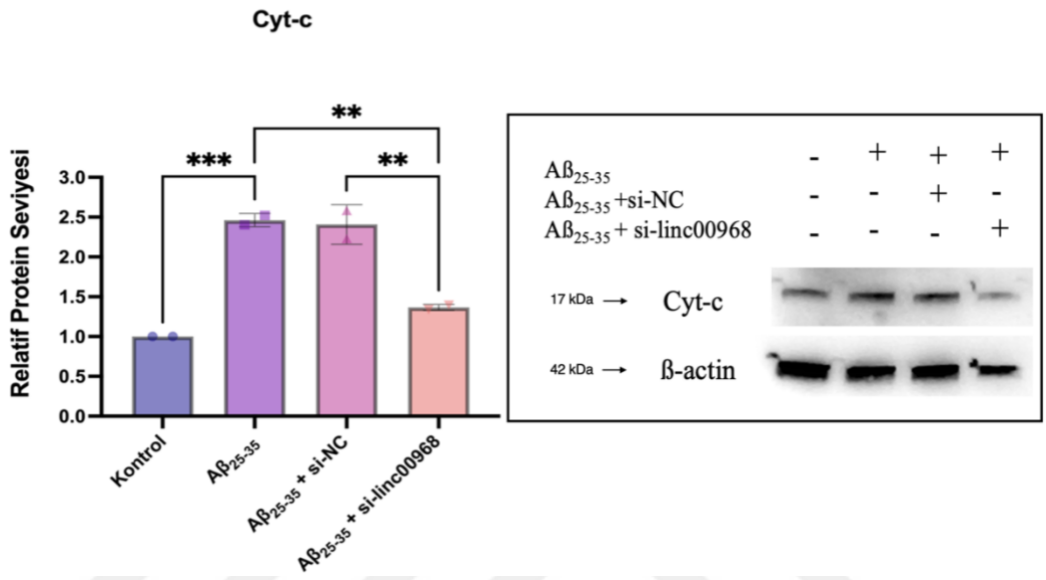


Şekil 20. Gruplarda Bcl-2 protein seviyesinin western blot ile belirlenmesi (sağda) grupların Bcl-2 protein düzeylerinin dansitometrik görüntüleri (solda). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ***p<0.0001.

Bax ve Cyt-c protein düzeylerine bakıldığında, $A\beta_{25-35}$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde anlamlı bir artış tespit edildi. Ancak linc00968 ifadesinin baskılandığı ve $A\beta_{25-35}$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde bu artışın etkisinin tersine çevrildiği saptandı (Şekil 21).



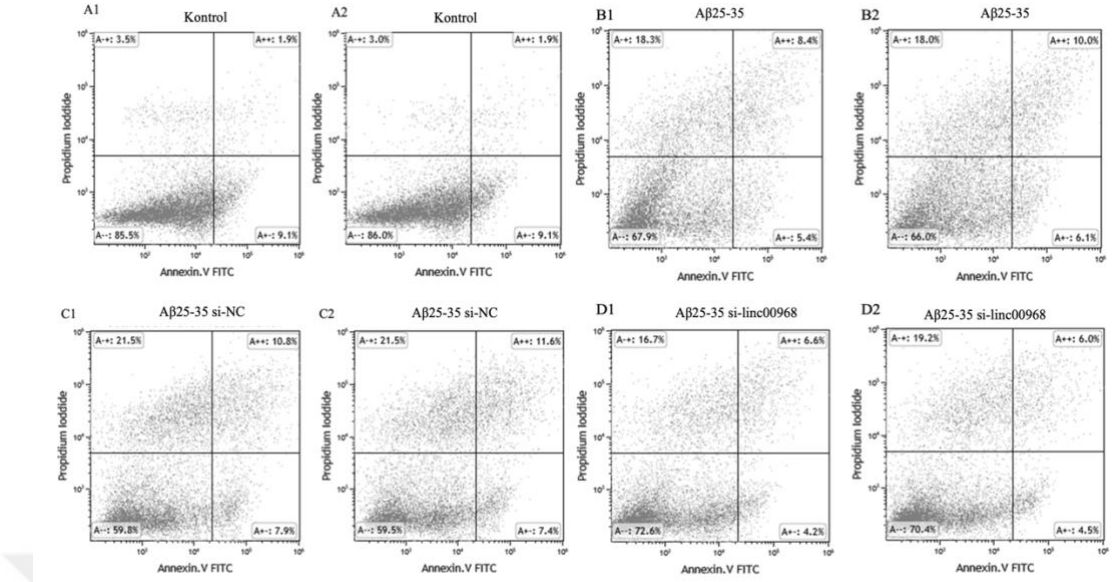
Şekil 21. Gruplarda Bax protein seviyesinin western blot ile belirlenmesi (sağda) grupların Bax protein düzeylerinin dansitometrik görüntüleri (solda). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ****p<0.0001.



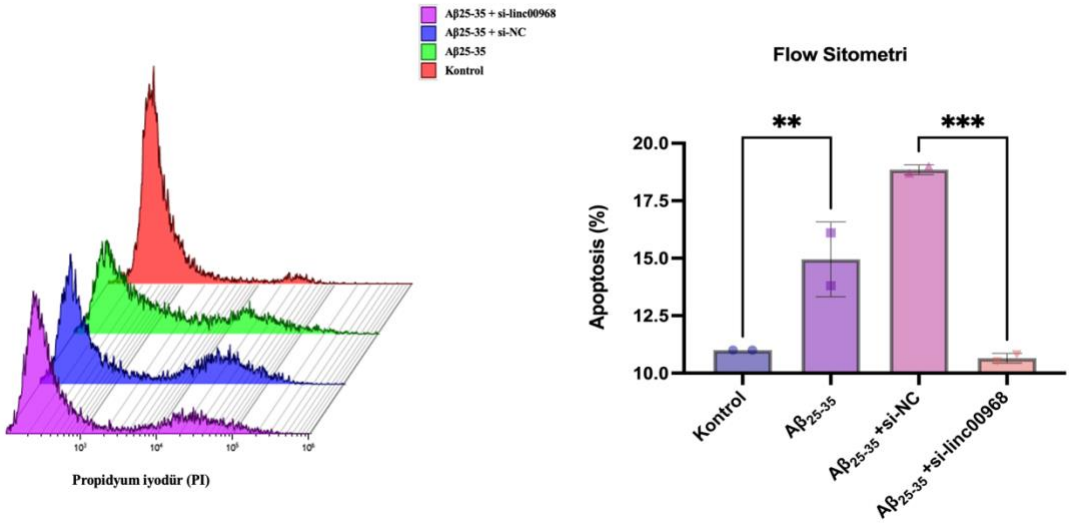
Şekil 22. Gruplarda Cyt-c protein seviyesinin western blot ile belirlenmesi (sağda), grupların Cyt-c protein düzeylerinin dansitometrik görüntüleri (solda). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

4.9 Gruplardaki Apoptoz Oranının Flow Sitometri ile Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücrelerinde Aβ25-35 uygulamasının ve susturulan linc00968 etkisinin total apoptoz üzerindeki etkisini görmek amacıyla yapılan flow sitometri çalışmasının sonucunda; Aβ25-35 uygulamasının kontrol SH-SY5Y hücrelerine göre SH-SY5Y hücrelerinde apoptozu belirgin şekilde arttırdığı tespit edildi. Şekil 23 ve şekil 24'te görüldüğü gibi, Aβ25-35 uygulamasının kontrol grubuna göre hücre canlılığını %36 azalttığı, ancak Aβ25-35 uygulanan fakat si-linc00968 ile transfekte edilen grupta Aβ25-35 uygulanan ve si-NC ile transfekte edilen gruba göre canlılığı %45 oranında arttırdığı saptandı.



Şekil 23. Gruplarda apoptoz oranlarının flow sitometri ile değerlendirilmesi. (A1-A2: Kontrol grubu, B1-B2: Aß$_{25-35}$ grubu, C1-C2: Aß$_{25-35}$ si-NC grubu D1-D2: Aß$_{25-35}$ si-linc00968 grubu dağılım grafikleri % hücre canlılığını temsil etmektedir.



Şekil 24. Gruplarda apoptoz oranlarının flow sitometri ile histogram grafiği (solda) ve yüzde (sağda) şeklinde gösterimi. Aβ$_{25-35}$ grubu kontrol ile kıyaslandığında **p<0.01, Aβ$_{25-35}$ si-linc00968 grubu Aβ$_{25-35}$ si-NC grubu ile kıyaslandığında ***p<0.001.

5. TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı, dünya çapında yaklaşık 40 milyon insanı etkileyen ilerleyici bir beyin bozukluğudur. Hastalık, beyin hücrelerindeki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle karakterizedir ve bilişsel fonksiyonların zamanla azalmasına yol açar. Alzheimer hastalığının nöropatofizyolojisi, nöronal kayıplar, sinaptik disfonksiyon ve nörodejeneratif süreçlerin kompleks bir kombinasyonundan kaynaklanır. Bu kompleks süreçlerin bir kısmı, hücresel stres, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve hücresel apoptoz gibi patofizyolojik mekanizmalarla ilişkilidir (85).

SH-SY5Y hücre hattı, nörobiyolojik araştırmalarda ve nörolojik hastalıkların çalışılmasında sık tercih edilir. Nöroblastoma kökenli olması, nöronal kökenli hücrelerin özelliklerini korumasını ve nöronal işlevlerin incelenmesi için uygun bir model oluşturmasını sağlar. İnsan kökenli olması da bu hücrelerin insan nöronal hücrelerinin özelliklerini ve tepkilerini daha doğru bir şekilde yansıtmasını sağlar. Bu özellikleri sayesinde insan nörolojik hastalıklarının çalışılmasında önemli bir model hücre hattı olarak kabul edilir. SH-SY5Y hücreleri, uygun kültür koşullarında nöron benzeri özellikler gösterebilen ve farklılaşabilen bir hücre hattıdır. Bu özelliği, nöronal gelişim ve işlevlerin çalışılmasında avantaj sağlar. Böylelikle Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların in vitro modellemesi için sıkça kullanılmaktadır. Bu hastalıkların patofizyolojisi, bu hücre hattı üzerinde incelenebilmekte ve potansiyel tedavi stratejileri test edilebilmektedir (21,86).

Alzheimer hastalığının etiyolojisi tam olarak bilinmese de amiloid β birikmesi, artmış Tau protein fosforilasyonu ve oksidatif stresin Alzheimer patofizyolojisinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Amiloid beta peptidi, Alzheimer hastalığının patogenezinde merkezi bir rol oynar ve hastalığın temel patolojik belirtilerinden biri olan ekstraselüler amiloid plağın ana bileşenidir (87). APP'nin beta ve gama sekretaz enzimleri ile kesimleri yapılan amiloid beta peptidleri bir araya gelerek nörotoksik oligomerler oluşturmakta ve Alzheimer hastalarının beyinlerinde bulunan amiloid plağın oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (88). Bu oligomerler ve amiloid plağın oluşumu, Alzheimer hastalığının ilerlemesinde kritik bir rol oynar ve sinaptik işlevi bozan ve dolayısıyla nöronal fonksiyonu etkileyen en toksik form olabilir (88,89). Aβ

peptidleri genellikle nöronal hücrede ve Alzheimer hastalık modelinde bir stres etkeni olarak kullanılmaktadır. Aβ birikimi, nöronal işlev bozukluğuna ve kaybına neden olan apoptozla ilişkili yolların aktivasyonundan kaynaklanabilir. Alzheimer hastalığının in vitro modellerinde, amiloid beta peptidinin farklı fragmanları kullanılarak hastalığın patofizyolojisini ve mekanizmalarını çalışmak yaygın bir yöntemdir. Çeşitli çalışmalar, amiloid beta 25-35 fragmanının nörotoksisite, oksidatif stres, apoptoz ve nöronal hasar gibi Alzheimer hastalığı ile ilişkili patolojik süreçleri tetikleyebileceğini göstermektedir (90–92). Aβ peptidi, 40 ve 42 aminoasitlik prekürsör proteinlerden kesilerek oluşan bir peptid fragmanıdır ve tam uzunluktaki peptidin nörotoksik etkilerini gösterebilecek yeterli uzunlukta olduğu kabul edilmektedir (93). $A\beta_{25-35}$ fragmanının nörotoksik etkileri iyi karakterize edilmiş olması, hücre içinde fibril oluşumunu rahatlıkla teşvik edebilmesi, laboratuvar koşullarında kolayca üretilebilmesi ve stabil bir şekilde saklanabilmesi; bunun da deneylerin tekrarlanabilirliğini artırması ve konsantrasyonunun hassas bir şekilde kontrol edilmesine olanak tanınması bu peptidin in vitro çalışmalarda kullanılırlığını arttırmaktadır (94). Bu çalışmada, Alzheimer hastalığının *in-vitro* nörotoksisite modelini oluşturmak amacıyla amiloid beta plakların ana bileşeni olan amiloid beta peptidlerini SH-SY5Y hücrelerine ekzojen olarak uyguladık. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, SH-SY5Y hücrelerinin $A\beta_{25-35}$ peptidine maruz kalması sitotoksisiteye ve artmış hücresel apoptoza neden oldu.

Gen ifade paternlerindeki düzenleyici rolleri nedeniyle, lncRNA'lar, on yıl içinde nörodejeneratif hastalıkların neredeyse tüm fizyolojik ve patolojik sürecinde yer alan bir düzenleyici molekül sınıfı olarak ortaya çıkmıştır (95). Djebali S ve arkadaşlarının ve Gutschner T ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, lncRNA'ların yüksek ifadelerinin hücre, doku ve sekans-spesifikliğinin lncRNA-hedefleme terapötiklerinin spesifik düzenlemesinin umut verici hedefler olduğu gösterilmiştir (96,97). Uzun kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar), 200 nükleotidi aşan uzunlukta olup, açık okuma çerçevesi (ORF) içermeyen ve protein kodlamayan RNA transkriptlerinden oluşan bir sınıftır. Son zamanlarda, lncRNA'ların AH gelişimi de dahil olmak üzere sinir sistemi disfonksiyonu ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (96). Yapılan bir çalışmada lncRNA *Rpph1*'in AH modeli oluşturulmuş farelerde yüksek ifade edildiğini ve CDC42'nin ifadesini de arttırabildiğini böylelikle hipokampal nöron

dendritik omurga oluşumunun düzenlenmesinde rol aldığını göstermiştir (98). Hem Aβ ile indüklenen SK-N-SH hücrelerinin hem de AH fare modelinin kullanıldığı başka bir çalışmada lncRNA *Rpph1'*in AH'deki rolünü araştırılmış, sonuçlar hem lncRNA Rpph1 hem de miR-122'nin AH fare modelinde ifadesinin arttığını göstermiştir. Ayrıca *Rpph1*'in, hücre canlılığını yükselterek ve miR-122'yi hedefleyerek hücre apoptozunu inhibe ettiği; SK-N-SH hücrelerinde Aβ ile indüklenen nöronal hasarı da iyileştirdiği belirtilmiştir (99). Uzun kodlamayan intergenik RNA'lar (LincRNA'lar), mRNA'lardan daha düşük ekspresyon seviyeleri ve daha fazla doku özgünlüğü ile ayırt edilir, ayrıca biyogenez, yıkım ve epigenetik düzenleyici özellikleri bakımından da farklılık gösterirler. Fonksiyonel olarak karakterize edilen az sayıdaki lincRNA, stabil ve baskılayıcı kromatin durumları oluşturarak transkripsiyonel aktivasyonu artırabilir veya baskılayabilir. Ayrıca, hücre çekirdeğinde daha yüksek düzen mimarisi sağlarlar ve proteinler ile RNA'ların iskeleti veya tuzakları olarak görev yapabilirler. LincRNA'ların transkripsiyonu, lincRNA transkriptlerinden bağımsız olarak gen lokuslarını düzenleyebilir. Ayrıca, lincRNA kaynaklı küçük açık okuma çerçeveleri giderek daha fazla tanımlanmakta ve fonksiyonel mikropeptitler oluşturabilmektedir. Bu durum, bazı lincRNA lokuslarının kodlama lokusları olarak sınıflandırılması gerektiğini yeniden düşünme ihtiyacını ortaya koymakta ve lokusların kodlama ve kodlamayan işlevlere sahip olma potansiyelini gündeme getirmektedir (100). Bir çalışmada, Linc00507 adlı bir lincRNA'nın Alzheimer hastalığı patogenezindeki rolü incelenmiştir. Linc00507'nin, beyindeki amiloid beta peptid birikimini ve nörotoksisiteyi düzenlediği bulunmuştur. Bu lincRNA, amiloid beta peptidlerinin hücre içine alınmasını ve bu peptidlerin toksik etkilerini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır. Linc00507'nin Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki nöronal kayıp ve sinaptik disfonksiyonu engelleyebileceği düşünülmektedir (101).

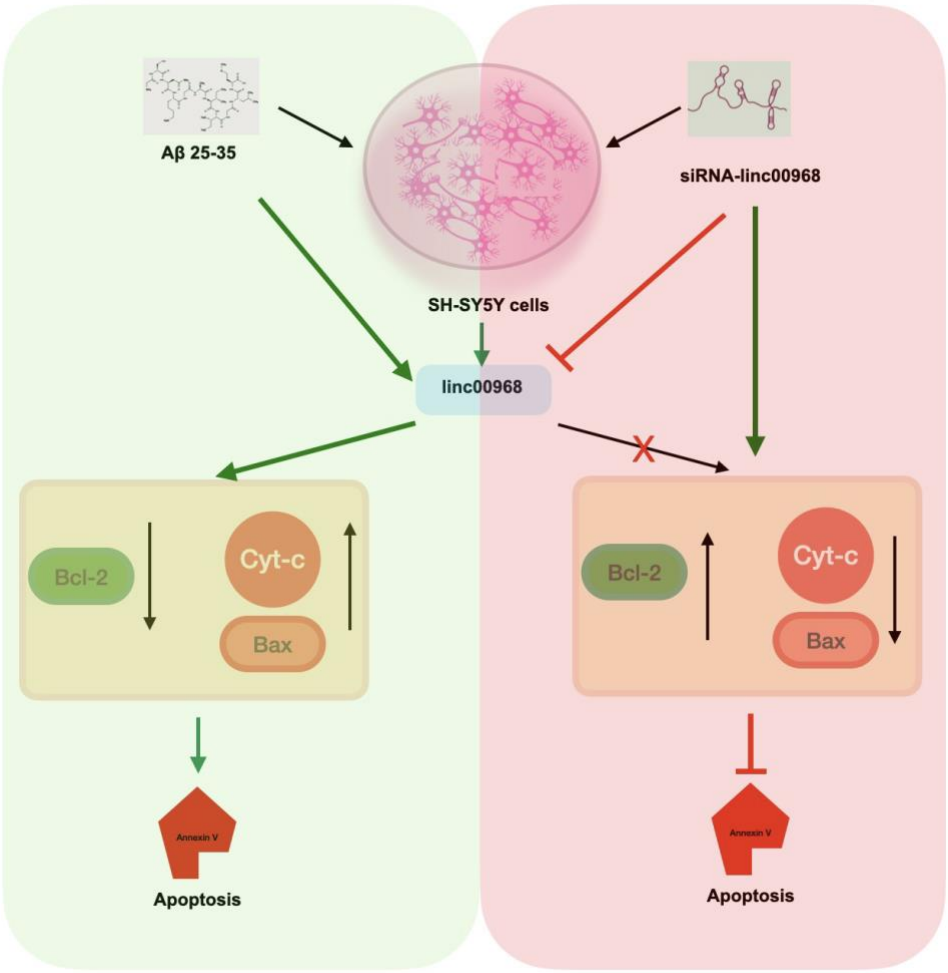
Çalışmamızda incelediğimiz linc00968 lncRNA'sının ekspresyonu, $A\beta_{25-35}$ toksisitesine maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde artmış bulundu. Bu nedenle, hipotezimizi linc00968 ekspresyonunun baskılanması durumunda $A\beta_{25-35}$ nörotoksisitesinin tersine çevrilebileceği üzerine kurduk. Yapılan bir çalışma, Alzheimer hastalığında MALAT1 adlı lincRNA'nın nöroinflamasyon sürecindeki rolünü araştırmış ve miR-199a'yı sönümleyerek NF-κB sinyal yolunu aktive ederek bu süreci düzenlediğini göstermiştir (102). Bu tez çalışmasının ileri aşamalarda farklı

yolaklarda rol alan RNA'lar ile olan ilişkisi incelenerek yeni çalışmalara ışık tutmasını beklemekteyiz.

Nöronal apoptoz, hücresel ölüm sürecidir ve Alzheimer hastalığında nöron kaybının temel mekanizmalarından biridir. Araştırmalar, Alzheimer hastalığında nöronal apoptozun, amiloid beta peptidinin nörotoksik etkileri, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, artan tau fosforilasyonu ve proinflamatuar kaskadların uyarılması gibi faktörlerle ilişkili olduğunu göstermektedir (103). Apoptoz mekanizması 3 yolak üzerinden çalışır, bunlar ekstrinsik yolak (ölüm reseptörü yolağı), intrinsik yolak (mitokondriyal yolak) ve perforin-granzim yolağıdır. İntrinsik yolak; mitokondri tarafından başlatılan bir takım hücre içi sinyallerin, hücre içindeki belli hedeflere ulaşmasıyla apoptoza neden olur. Mitokondrinin bu sinyalleri oluşturmasını sağlayan negatif ve pozitif uyaranlar vardır. Bu uyaranlar iç mitokondri zarındaki porların açılmasına, zar potansiyelinin kaybolmasına ve apoptozu uyarıcı iki protein grubunun sitozole salınmasına neden olur. İlk grup içinde sitokrom c'nin bulunduğu bir grup proteinden oluşur. Sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz-9'a bağlanarak bir apoptozom kompeksi oluştururlar. Bu kompleksin oluşması prokaspaz-9'un kaspaz-9'a dönüşmesine neden olur. Kaspaz-9 da Kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu tetikler. İkinci grup proteinler ise hücre çekirdeğine girerek çeşitli aşamalarda DNA'nın parçalanmasına neden olurlar (104). Bu apoptotik mitokondriyal olaylar Bcl-2 2 (B-cell lymphoma 2) protein ailesi üzerinden gerçekleşir. Bcl-2 ailesinde 25 gen vardır ve bunların bir kısmı apoptozu engelleyici (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl, Bcl-xs, Bcl-w, BAG) bir kısmı da apoptozu uyarıcıdır (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk). Bcl-2 ailesinin asıl rolünün mitokondriyal zar geçirgenliğini etkileyerek sitokrom c salımını kontrol etmesi olduğu düşünülmektedir (105). Bu yüzden çalışmamızda apoptotik markırlar olarak; antiapoptotik Bcl-2, pro apoptotik Bax ve mitokondri salınımlı sitokrom c seçilmiştir. Apoptotik uyaran olan $A\beta_{25–35}$ fragmanları uygulandığında *BCL-2* düzeyi azalırken; *BAX* ve *CYT-C* düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular $A\beta_{25–35}$'in apoptozu uyardığını desteklemektedir.

$A\beta_{25–35}$ kaynaklı nöronal hasardaki işlevini ve etki mekanizmasını belirlemek amacıyla yapılan bir başka çalışmada lncRNA SOX21-AS1 ve hedefi olan miR-132 araştırıldığında; SOX21-AS1'nin Aβ25–35 uygulanan hücrelerde ifadesinin arttığı ve susturumunun da bu etkiyi tersine çevirdiği gösterilmiştir. Ayrıca bu susturum Aβ25-

35'in neden olduğu canlılık inhibisyonunu ve apoptoz ve oksidatif stresin verdiği hücresel zararı azalttığı bulunmuştur (106). Tüm bu yapılan çalışmalar lncRNA'ların farklı yolaklarda işlev görerek trasnkripsiyonel regülasyonlar sürecindeki önemini vurgulamaktadır. Çalışmamızda araştırdığımız linc00968 ile alakalı daha önce literatürde AH ile ilişkili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak akciğer adenokarsinomda düzenlenmesinin bozulduğu (107) ve onkogen olarak tanımlandığı (59) birkaç çalışma mevcuttur. Mevcut çalışmamızda öncelikli olarak Aβ toksisitesi uyguladığımız SH-SY5Y hücrelerinde linc00968'in ifadesini yüksek olarak belirledik. Daha sonra bu hücrelerde siRNA ile ifadesi baskılanan linc00968'nin apoptotik gen ve protein düzeylerini arttırdığını saptadık. Bu bulgular linc00968'in AH'deki Aβ ile indüklenen nöronal hasarı iyileştirebileceği yönündeki hipotezimizi güçlendirmiştir. Baskılanma sonunda anti-apoptotik genlerden *BCL-2* ifadesinin, $A\beta_{25–35}$ uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde yüksek iken; ifadesi baskılanan linc00968 (si-linc00968) grubunda azaldığı tespit edildi. Ayrıca pro-apoptotik gen *BAX*'ın da ifadesinin aynı şekilde artış gösterdiği tespit edildi. *CYT-C* apoptoz halinde mitokondri dış zarından salınan bir proteindir apoptozun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (108). qRT-PCR ile $A\beta_{25–35}$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerde *CYT-C* düzeyine bakıldığında artış gözlerken; si-linc00968 ile birlikte $A\beta_{25–35}$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ise *CYT-C* düzeyinde azalış tespit ettik. Bu 3 apoptotik belirtece baktığımız zaman $A\beta_{25–35}$ nörotoksisite kaynaklı hasarın SH-SY5Y hücrelerinde apoptozu uyarırken; $A\beta_{25–35}$ ile birlikte si-linc00968 verilen SH-SY5Y hücrelerinde oluşan nöronal hasarı iyileştirdiği sonucuna varmaktayız. Bu koruyucu etkinin apoptoz mekanizmaları üzerinden oluştuğunu göstermek amacıyla Bcl-2, Bax ve Cyt-c protein düzeyleri de araştırılmıştır. Linc00968 baskılanmasının, Aβ' a karşı antiapoptotik Bcl-2 proteinini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. Linc00968'in susturumunun $A\beta_{25-35}$ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerini apoptozdan nasıl kurtardığını gösteren şematik model

Literatürde linc00968 ile AH arasında, ya da Aβ proteinleri arasında bir ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması çalışmamızın özgün değerini oluşturmaktadır. Bu bağlamda gelecek çalışmalar için umut vaadedici sonuçları literatüre kazandırmayı planlamış bulunmaktayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak elimizdeki bulgular, AH modelinde linc00968'in susturulması ile hücre canlılığını korunduğu ve mitokondriyal intrinsik yolak üzerinden apoptozun baskılandığını göstermektedir. Alzheimer hastalığı için, hem terepötik potansiyele hemde karşı koruyucu olan bir biyomarkır potansiyele sahip olduğu görülmektedir, ancak daha ileri çalışmalarla bu bulguların doğrulanması güçlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda Aβ25-35 ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerini kullanarak oluşturduğumuz modelde, lncRNA linc00968' in AH'de nöronal apoptoz üzerindeki rolünü araştırdık. Sonuçlar, lncRNA linc00968'in Aβ nörotoksisitesi ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde linc00968 ifedesinin artış gösterdiğini; linc00968 baskılanmasının ise hem hücre canlılığının artmasını hem de hücre apoptozunu inhibe ederek SH-SY5Y hücrelerinde Aβ ile indüklenen nöronal hasarı iyileştirdiğini gösterdi. Bu çalışma, linc00968'in, Alzheimer hastalığı modeli üzerindeki rolünün moleküler bir çerçeveden araştırıldığı, bilinen ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Çalışmamız kapsamında nöroblastoma kaynaklı SH-SY5Y hücreleri model olarak kullanıldı. Bu hücreler Parkinson, Alzheimer, Multipl Skleroz gibi birçok nörodejeneratif hastalığın modellemesinde kullanılmaktadır. Hastalık patogenezine bağlı bir şekilde, farklı indükleyici ajanlar ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin hastalığı in vitro taklit etmesi planlanır. Ancak bu hücrelerin yanısıra nöronal farklılaşmayı sağlayan uyaranlarla muamele edilen farklı hücre hatlarına da gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada Bcl-2, Bax ve Cyt-c proteinleri incelenmiştir, bu proteinler de sadece intrinsik ve mitokondriyal yolak üzerinden apoptoz oluşumunu göstermektedir. Ekstrinsik ve perforin/granzim yolaklarında etkili protein düzeyleri de incelenerek apoptoz mekanizmasıyla ilgili tüm mekanizma açıklığa kavuşturulmalıdır. Aktif kaspaz-3 düzeyi veya kaspaz-3 enzim aktivitesi çalışmamızda ölçülememiştir, ilerleyen süreçlerde bu parametrelerin de katılması ile apoptoz üzerinde linc00968 etki mekanizması netleştirilmelidir.

Elimizdeki bulgular, sadece linc00968 mekanizmasına ait veriler olmasına rağmen literatüre katkı sağlayacak olmakla beraber, post transkripsiyonel seviyelerde bu transkriptin hedef genlerinin belirlenmesi önemli olacaktır. Bu önerilerin eklendiği ve hayvan deneyleri ile güçlendirildiği takdirde, önümüzdeki aşamalarda linc00968 ve hedef genleri ile ilgili veriler, AH için umut vadeden bir küçük moleküllü teröpatik ajan olma yönündedir.

7. KAYNAKLAR

1. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Research. 31 Temmuz 2018;7:1161.
2. Zhang C. Etiology of Alzheimer's Disease. Discov Med. Ekim 2023;35(178):757-76.
3. Ma N, Tie C, Yu B, Zhang W, Wan J. Identifying lncRNA–miRNA–mRNA networks to investigate Alzheimer's disease pathogenesis and therapy strategy. Aging. 07 Şubat 2020;12(3):2897-920.
4. Washietl S, Pedersen JS, Korbel JO, Stocsits C, Gruber AR, Hackermüller J, vd. Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome. Genome Res. Haziran 2007;17(6):852-64.
5. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. Nat Rev Genet. Mart 2024;25(3):211-32.
6. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome | Nature [İnternet]. [a.yer 02 Nisan 2024]. Erişim adresi: https://www.nature.com/articles/nature11247
7. Liu J, Zhong X. Epiallelic variation of non-coding RNA genes and their phenotypic consequences. Nat Commun. 14 Şubat 2024;15(1):1375.
8. Dykes IM, Emanueli C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. Genomics Proteomics Bioinformatics. Haziran 2017;15(3):177-86.
9. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet. Mart 2009;10(3):155-9.
10. Agostini M, Mancini M, Candi E. Long non-coding RNAs affecting cell metabolism in cancer. Biol Direct. 01 Ekim 2022;17(1):26.
11. Barth DA, Drula R, Ott L, Fabris L, Slaby O, Calin GA, vd. Circulating Non-coding RNAs in Renal Cell Carcinoma—Pathogenesis and Potential Implications as Clinical Biomarkers. Front Cell Dev Biol [Internet]. 15 Eylül 2020 [a.yer 02 Nisan 2024];8. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00828
12. Robinson EK, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul

Mech. 01 Nisan 2020;1863(4):194419.

13. Aurilia C, Donati S, Palmini G, Miglietta F, Iantomasi T, Brandi ML. The Involvement of Long Non-Coding RNAs in Bone. Int J Mol Sci. Ocak 2021;22(8):3909.

14. Jiang Q, Ma R, Wang J, Wu X, Jin S, Peng J, vd. LncRNA2Function: a comprehensive resource for functional investigation of human lncRNAs based on RNA-seq data. BMC Genomics. 29 Ocak 2015;16(3):S2.

15. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. Nat Rev Genet. Ocak 2016;17(1):47-62.

16. Welsh IC, Kwak H, Chen FL, Werner M, Shopland LS, Danko CG, vd. Chromatin Architecture of the Pitx2 Locus Requires CTCF- and Pitx2-Dependent Asymmetry that Mirrors Embryonic Gut Laterality. Cell Rep. 13 Ekim 2015;13(2):337-49.

17. Severini C, Barbato C, Di Certo MG, Gabanella F, Petrella C, Di Stadio A, vd. Alzheimer's Disease: New Concepts on the Role of Autoimmunity and NLRP3 Inflammasome in the Pathogenesis of the Disease. Curr Neuropharmacol. Nisan 2021;19(4):498-512.

18. Yang HD, Kim DH, Lee SB, Young LD. History of Alzheimer's Disease. Dement Neurocognitive Disord. 01 Aralık 2016;15(4):115-21.

19. Tommonaro G, García-Font N, Vitale RM, Pejin B, Iodice C, Cañadas S, vd. Avarol derivatives as competitive AChE inhibitors, non hepatotoxic and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. Eur J Med Chem. 21 Ekim 2016;122:326-38.

20. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments for Alzheimer's disease. Ther Adv Neurol Disord. Ocak 2013;6(1):19-33.

21. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Chapter 13 - Alzheimer's disease. İçinde: Dekosky ST, Asthana S, editörler. Handbook of Clinical Neurology [İnternet]. Elsevier; 2019 [a.yer 03 Nisan 2024]. s. 231-55. (Geriatric Neurology; c. 167). Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128047668000133

22. Monteiro AR, Barbosa DJ, Remião F, Silva R. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. Biochem Pharmacol. 01 Mayıs 2023;211:115522.

23. Allan LM, Ballard CG, Burn DJ, Kenny RA. Prevalence and Severity of Gait Disorders in Alzheimer's and Non-Alzheimer's Dementias. J Am Geriatr Soc. 2005;53(10):1681-7.

24. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Dialogues Clin Neurosci. 30 Haziran 2009;11(2):111-28.

25. Webber KM, Casadesus G, Perry G, Atwood CS, Bowen R, Smith MA. Gender Differences in Alzheimer Disease: The Role of Luteinizing Hormone in Disease Pathogenesis. Alzheimer Dis Assoc Disord. Haziran 2005;19(2):95.

26. Maes A, Verschaeve L. Can cytogenetics explain the possible association between exposure to extreme low-frequency magnetic fields and Alzheimer's disease? J Appl Toxicol. 2012;32(2):81-7.

27. Sun L, Hu C you, Shi X hong, Zheng C guang, Huang Z zhi, Lv Z ping, vd. Trans-Ethnical Shift of the Risk Genotype in the CETP I405V with Longevity: A Chinese Case-Control Study and Meta-Analysis. PLOS ONE. 15 Ağustos 2013;8(8):e72537.

28. McGrowder DA, Miller F, Vaz K, Nwokocha C, Wilson-Clarke C, Anderson-Cross M, vd. Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer's Disease: Current Evidence and Future Perspectives. Brain Sci. Şubat 2021;11(2):215.

29. Lista S, Hampel H. Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Expert Rev Neurother. 02 Ocak 2017;17(1):47-57.

30. Chen XY, Du YF, Chen L. Neuropeptides Exert Neuroprotective Effects in Alzheimer's Disease. Front Mol Neurosci [İnternet]. 2019 [a.yer 19 Aralık 2023];11. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00493

31. Thinakaran G. The role of presenilins in Alzheimer's disease. J Clin Invest. 15 Kasım 1999;104(10):1321-7.

32. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. Eur J Neurol. 2018;25(1):59-70.

33. Ibrahim MM, Gabr MT. Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. Neural Regen Res. Mart 2019;14(3):437.

34. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular

mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 16 Temmuz 2020;15(1):40.

35. Devi R, Gogoi S, Dutta HS, Bordoloi M, Sanghi SK, Khan R. Au/NiFe2O4 nanoparticle-decorated graphene oxide nanosheets for electrochemical immunosensing of amyloid beta peptide. Nanoscale Adv. 22 Ocak 2020;2(1):239-48.

36. Vogt ACS, Jennings GT, Mohsen MO, Vogel M, Bachmann MF. Alzheimer's Disease: A Brief History of Immunotherapies Targeting Amyloid β. Int J Mol Sci. Ocak 2023;24(4):3895.

37. Sehar U, Rawat P, Reddy AP, Kopel J, Reddy PH. Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci. 26 Ekim 2022;23(21):12924.

38. Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, vd. Tauopathy in *Drosophila* : Neurodegeneration Without Neurofibrillary Tangles. Science. 27 Temmuz 2001;293(5530):711-4.

39. Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y, Song W. Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Front Mol Neurosci [Internet]. 15 Eylül 2017 [a.yer 02 Mayıs 2024];10. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00294

40. Lee J, Hyun DH. The Interplay between Intracellular Iron Homeostasis and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. Antioxid Basel Switz. 12 Nisan 2023;12(4):918.

41. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. J Neurochem. Ekim 2016;139 Suppl 1:179-97.

42. Xiao T, Zhang W, Jiao B, Pan CZ, Liu X, Shen L. The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer' disease. Transl Neurodegener. 02 Şubat 2017;6(1):3.

43. Gupta Y, Lee KH, Choi KY, Lee JJ, Kim BC, Kwon GR, vd. Early diagnosis of Alzheimer's disease using combined features from voxel-based morphometry and cortical, subcortical, and hippocampus regions of MRI T1 brain images. PLoS ONE [Internet]. 2019 [a.yer 24 Nisan 2024];14(10). Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6777799/

44. Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JC. Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. Australas

Psychiatry Bull R Aust N Z Coll Psychiatr. Ağustos 2018;26(4):347-57.

45. Kızmaz MZ, Paylan İC, Erkan S. DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araşt Derg. 31 Ağustos 2017;6(2):47-53.

46. Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. Içinde: Rao MRS, editör. Long Non Coding RNA Biology [Internet]. Singapore: Springer; 2017 [a.yer 24 Nisan 2024]. s. 1-46. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3_1

47. Liao J, Chen B, Zhu Z, Du C, Gao S, Zhao G, vd. Long noncoding RNA (lncRNA) H19: An essential developmental regulator with expanding roles in cancer, stem cell differentiation, and metabolic diseases. Genes Dis. 24 Mart 2023;10(4):1351-66.

48. Shah IM, Dar MA, Bhat KA, Dar TA, Ahmad F, Ahmad SM, vd. Long Non-Coding RNAs: Biogenesis, Mechanism of Action and Role in Different Biological and Pathological Processes. Içinde: Recent Advances in Noncoding RNAs [Internet]. IntechOpen; 2022 [a.yer 24 Nisan 2024]. Erişim adresi: https://www.intechopen.com/chapters/81800

49. Rusconi F, Battaglioli E, Venturin M. Psychiatric Disorders and lncRNAs: A Synaptic Match. Int J Mol Sci. 25 Nisan 2020;21(9):3030.

50. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. Nat Rev Mol Cell Biol. Şubat 2021;22(2):96-118.

51. Li F, Wang Y, Yang H, Xu Y, Zhou X, Zhang X, vd. The effect of BACE1-AS on β-amyloid generation by regulating BACE1 mRNA expression. BMC Mol Biol. 01 Ekim 2019;20:23.

52. Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. Cancer Biol Med. Mart 2015;12(1):1-9.

53. Briggs JA, Wolvetang EJ, Mattick JS, Rinn JL, Barry G. Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. Neuron. 02 Aralık 2015;88(5):861-77.

54. Khodayi M, Khalaj-Kondori M, Hoseinpour Feizi MA, Jabarpour Bonyadi M, Talebi M. Plasma lncRNA profiling identified BC200 and NEAT1 lncRNAs as potential blood-based biomarkers for late-onset Alzheimer's disease. EXCLI J. 09 Mayıs 2022;21:772-85.

55. Massone S, Ciarlo E, Vella S, Nizzari M, Florio T, Russo C, vd. NDM29, a RNA polymerase III-dependent non coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid β secretion. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 01 Temmuz 2012;1823(7):1170-7.

56. Gu C, Chen C, Wu R, Dong T, Hu X, Yao Y, vd. Long Noncoding RNA EBF3-AS Promotes Neuron Apoptosis in Alzheimer's Disease. DNA Cell Biol. Mart 2018;37(3):220-6.

57. Ciarlo E, Massone S, Penna I, Nizzari M, Gigoni A, Dieci G, vd. An intronic ncRNA-dependent regulation of SORL1 expression affecting Aβ formation is upregulated in post-mortem Alzheimer's disease brain samples. Dis Model Mech. Mart 2013;6(2):424-33.

58. Tang H, Han X, Feng Y, Hao Y. linc00968 inhibits the tumorigenesis and metastasis of lung adenocarcinoma via serving as a ceRNA against miR-9-5p and increasing CPEB3. Aging. 05 Kasım 2020;12(22):22582-98.

59. Liu G, Yuan D, Sun P, Liu W, Wu PF, Liu H, vd. LINC00968 functions as an oncogene in osteosarcoma by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling. J Cell Physiol. Kasım 2018;233(11):8639-47.

60. Arabpour M, Layeghi SM, Majidzadeh-A K, Bazzaz JT, Mamivand A, Naghizadeh MM, vd. Dysregulation of lncRNA LINC00968 may contribute to the tumorigenesis of estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer [Internet]. In Review; 2022 Mar [a.yer 02 Ocak 2024]. Erişim adresi: https://www.researchsquare.com/article/rs-59534/v3

61. Wang Y, Zhou J, Xu YJ, Hu HB. Long non-coding RNA LINC00968 acts as oncogene in NSCLC by activating the Wnt signaling pathway. J Cell Physiol. 2018;233(4):3397-406.

62. Li Z, Yu Z, Meng X, Yu P. LncRNA LINC00968 accelerates the proliferation and fibrosis of diabetic nephropathy by epigenetically repressing p21 via recruiting EZH2. Biochem Biophys Res Commun. 02 Ekim 2018;504(2):499-504.

63. Wang QC, Wang ZY, Xu Q, Chen XL, Shi RZ. lncRNA expression profiles and associated ceRNA network analyses in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. Sci Rep. 15 Ocak 2021;11(1):1567.

64. Sun Z, Ma X, Yang H, Zhao J, Zhang J. Brain-derived neurotrophic factor

prevents beta- amyloid-induced apoptosis of pheochromocytoma cells by regulating Bax/Bcl-2 expression. Neural Regen Res. 15 Şubat 2012;7(5):347-51.

65. Morley JE, Farr SA, Nguyen AD. Alzheimer Disease. Clin Geriatr Med. Kasım 2018;34(4):591-601.

66. Paquet C, Nicoll JA, Love S, Mouton-Liger F, Holmes C, Hugon J, vd. Downregulated apoptosis and autophagy after anti-Aβ immunotherapy in Alzheimer's disease. Brain Pathol. 2018;28(5):603-10.

67. Erekat NS. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. Clin Anat. 2022;35(1):65-78.

68. Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues. Apoptosis. 01 Ağustos 2023;28(7):943-57.

69. Dhapola R, Hota SS, Sarma P, Bhattacharyya A, Medhi B, Reddy DH. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. Inflammopharmacology. 01 Aralık 2021;29(6):1669-81.

70. Wu CK, Thal L, Pizzo D, Hansen L, Masliah E, Geula C. Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Exp Neurol. 01 Ekim 2005;195(2):484-96.

71. Jan R, Chaudhry G e S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. Adv Pharm Bull. 01 Haziran 2019;9(2):205-18.

72. Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? J Clin Invest. 01 Temmuz 2004;114(1):23-7.

73. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. Tumor Biol. 01 Temmuz 2016;37(7):8471-86.

74. Blomgren K, Leist M, Groc L. Pathological apoptosis in the developing brain. Apoptosis. 01 Mayıs 2007;12(5):993-1010.

75. Go MJ, Kim JM, Lee HL, Kim TY, Joo SG, Kim JH, vd. Anti-Amnesia-like Effect of Pinus densiflora Extract by Improving Apoptosis and Neuroinflammation on Trimethyltin-Induced ICR Mice. Int J Mol Sci. Ocak 2023;24(18):14084.

76. Alshial EE, Abdulghaney MI, Wadan AHS, Abdellatif MA, Ramadan NE, Suleiman AM, vd. Mitochondrial dysfunction and neurological disorders: A narrative

review and treatment overview. Life Sci. 01 Aralık 2023;334:122257.

77. Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N, Bonni A. Cdc2 Phosphorylation of BAD Links the Cell Cycle to the Cell Death Machinery. Mol Cell. 01 Mayıs 2002;9(5):1005-16.

78. Rajesh Y, Kanneganti TD. Innate Immune Cell Death in Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. Cells. 10 Haziran 2022;11(12):1885.

79. Kudo W, Lee HP, Smith MA, Zhu X, Matsuyama S, Lee H g. Inhibition of Bax protects neuronal cells from oligomeric Aβ neurotoxicity. Cell Death Dis. Mayıs 2012;3(5):e309-e309.

80. Callens M, Kraskovskaya N, Derevtsova K, Annaert W, Bultynck G, Bezprozvanny I, vd. The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca2+ signaling in health and in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 01 Mayıs 2021;1868(6):118997.

81. Drache B, Diehl G e., Beyreuther K, Perlmutter L s., König G. Bcl-xl-Specific antibody labels activated microglia associated with Alzheimer's disease and other pathological states. J Neurosci Res. 1997;47(1):98-108.

82. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, vd. Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid-β Precursor Protein and Amyloidogenic Aβ Peptide Formation. Cell. 30 Nisan 1999;97(3):395-406.

83. Rohn TT, Head E, Nesse WH, Cotman CW, Cribbs DH. Activation of Caspase-8 in the Alzheimer's Disease Brain. Neurobiol Dis. 01 Aralık 2001;8(6):1006-16.

84. Rehker J, Rodhe J, Nesbitt RR, Boyle EA, Martin BK, Lord J, vd. Caspase-8, association with Alzheimer's Disease and functional analysis of rare variants. PLoS ONE. 06 Ekim 2017;12(10):e0185777.

85. Li D, Zhang J, Li X, Chen Y, Yu F, Liu Q. Insights into lncRNAs in Alzheimer's disease mechanisms. RNA Biol. 18(7):1037-47.

86. Voogd EJHF, Frega M, Hofmeijer J. Neuronal Responses to Ischemia: Scoping Review of Insights from Human-Derived In Vitro Models. Cell Mol Neurobiol. 01 Ekim 2023;43(7):3137-60.

87. Murphy MP, LeVine III H. Alzheimer's Disease and the Amyloid-β Peptide. J Alzheimers Dis. 01 Ocak 2010;19(1):311-23.

88. Mensinger ZL, Cook BL, Wilson EL. Adsorption of Amyloid Beta Peptide by Metal–Organic Frameworks. ACS Omega. 29 Aralık 2020;5(51):32969-74.

89. Yamin R, Zhao C, O'Connor PB, McKee AC, Abraham CR. Acyl peptide hydrolase degrades monomeric and oligomeric amyloid-beta peptide. Mol Neurodegener. 23 Temmuz 2009;4(1):33.

90. Qian W, Li H, Pan N, Zhang C. Curcumin Treatment is Associated with Increased Expression of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Subunit, NR2A, in a Rat PC12 Cell Line Model of Alzheimer's Disease Treated with the Acetyl Amyloid-β Peptide, Aβ(25–35). Med Sci Monit. 01 Mayıs 2018;24:2693-9.

91. Ding Y, Zhang H, Liu Z, Li Q, Guo Y, Chen Y, vd. Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) alleviates oxidative stress and apoptosis of hippocampal neuron in response to beta-Amyloid peptide fragment Aβ25-35. Bioengineered. 01 Ocak 2021;12(1):5440-9.

92. Wang W, Yin J, Ma X, Zhao F, Siedlak SL, Wang Z, vd. Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer's disease in rodent model. Hum Mol Genet. 01 Kasım 2017;26(21):4118-31.

93. Nagamatsu T, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K. Kamikihito reduces β-amyloid25–35-induced axon damage via neurotrophic factors. J Nat Med. 01 Ocak 2024;78(1):246-54.

94. Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA. Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for Abeta(25-35). Exp Neurol. Ocak 2010;221(1):26-37.

95. Maoz R, Garfinkel BP, Soreq H. Alzheimer's Disease and ncRNAs. Adv Exp Med Biol. 2017;978:337-61.

96. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. RNA Biol. 01 Haziran 2012;9(6):703-19.

97. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi AM, vd. Landscape of transcription in human cells. Nature. 06 Eylül 2012;489(7414):101-8.

98. Cai Y, Sun Z, Jia H, Luo H, Ye X, Wu Q, vd. Rpph1 Upregulates CDC42 Expression and Promotes Hippocampal Neuron Dendritic Spine Formation by Competing with miR-330-5p. Front Mol Neurosci [Internet]. 07 Şubat 2017 [a.yer 24 Temmuz 2024];10. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals/molecular-

neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2017.00027/full

99. Gu R, Wang L, Tang M, Li SR, Liu R, Hu X. LncRNA Rpph1 protects amyloid-β induced neuronal injury in SK-N-SH cells via miR-122/Wnt1 axis. Int J Neurosci. Mayıs 2020;130(5):443-53.

100. Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. Nat Rev Mol Cell Biol. Mart 2018;19(3):143-57.

101. Yan Y, Yan H, Teng Y, Wang Q, Yang P, Zhang L, vd. Long non-coding RNA 00507/miRNA-181c-5p/TTBK1/MAPT axis regulates tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. J Gene Med. Aralık 2020;22(12):e3268.

102. Liao K, Lin Y, Gao W, Xiao Z, Medina R, Dmitriev P, vd. Blocking lncRNA MALAT1/miR-199a/ZHX1 Axis Inhibits Glioblastoma Proliferation and Progression. Mol Ther - Nucleic Acids. 06 Aralık 2019;18:388-99.

103. Koca RÖ, Görmüş ZIS, Solak H. Alzheimer Hastalığında Monoaminerjik Sistem Değişiklikleri: Geleneksel Bir Derleme. Turk Klin J Med Sci. 2022;42(4):323-34.

104. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. Haziran 2007;35(4):495-516.

105. Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, Moldoveanu T. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. FEBS J. Temmuz 2016;283(14):2690-700.

106. Gu F, Ji D, Ni H, Chen D. SRY-Box 21 Antisense RNA 1 Knockdown Diminishes Amyloid Beta25–35-Induced Neuronal Damage by miR-132/PI3K/AKT Pathway. Neurochem Res. 01 Eylül 2021;46(9):2376-86.

107. Zhu Y, Bo H, Chen Z, Li J, He D, Xiao M, vd. LINC00968 can inhibit the progression of lung adenocarcinoma through the miR-21-5p/SMAD7 signal axis. Aging. 04 Kasım 2020;12(21):21904-22.

108. Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, vd. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature. 29 Ocak 1998;391(6666):496-9.

EK-1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Sefa Kızıldağ

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4714-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☒ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Uzun Kodlamayan RNA (lncRNA) Linc00968'in Alzheimer Hücre Kültürü Modellerinde Apoptoz Üzerine Etkisinin Araştırılması**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ Tıbbi Biyoloji A.D.	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2019/10-09**	**Tarih:17.04.2019**
	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ 'ın sorumlusu olduğu **"Uzun Kodlamayan RNA (IncRNA) Linc00968'in Alzheimer Hücre Kültürü Modellerinde Apoptoz Üzerine Etkisinin Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER (Başkan Yardımcısı)	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	



SERAP KURT

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

12 Eylül 2018 - Şu Anda (6 yıl)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.58 / 4.0

08 Eylül 2015 - 31 Temmuz 2018 (2 yıl 11 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: 18093301001
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.68 / 4.0

01 Eylül 2010 - 26 Haziran 2015 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR.
Diploma Numarası: 2014/04/0224
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.54 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Şubat 2021 - Şu Anda (3 yıl 7 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, MANİSA CELÂL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Eylül 2018 - Şu Anda (6 yıl) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMACI, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2016 - Mayıs 2017 (1 yıl 5 ay) (Yarı Zamanlı)
DİĞER, PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ

Haziran 2014 - Temmuz 2014 (2 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, EGE ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Tıbbi Biyoloji

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

S. KURT, F. ÇETİN & F. S. ÇAM, A THE STRUCTURE OF THE GENOME, Academic Studies in Health Sciences(51 - 65), ISBN: 978-625-75xx-xx-x: Duvar Yayınları,, Kitapta Bölüm.

S. KURT & F. S. ÇAM, Amiloid Beta Peptidler: in-vitro Alzheimer Hastalığı Toksisite Modellerinde Kullanımları, Sağlık Bilimleri Araştırmaları: Temel Tıp- IV(143 - 158), ISBN: 978-975-447-847-1: Özgür Yayınları, Kitapta Bölüm.

S. KURT, H. B. GERİK ÇELEBİ & F. S. ÇAM, Nörogenetikte Etik Sorunlar, Türkiye Klinikleri Tıbbi Genetik - Özel Konular Nörogenetikte Güncel Gelişmeler(76 - 82), ISBN: 2146-9040: Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, Kitapta Bölüm.

H. B. G. ÇELEBİ, S. KURT & F. S. ÇAM, Nörogenetikte Etik Sorunlar, F. S. ÇAM [Editörler], Nörogenetikte Güncel Gelişmeler(76 - 82): Türkiye Klinikleri, 31 Ocak 2023, Kitapta Bölüm.

Makaleler

H. B. SAATLI, S. KURT, E. ÇAĞLIYAN & S. KIZILDAĞ, The alteration of apoptosis?related genes in female pelvic supportive
tissues with regard to menopausal status, Molecular Biology Reports, 2023, 1573-4978, 51, 1.

B. K. S. K. F. H. A. A. M. A. S. K. N. U. H. SERVET KİZİLDAG, Magnesium yields opposite effects on the nuclear and cytosolic cascades of apoptosis in different rat brain regions, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2022, 26:6523-6535, 26, 8, 6523-6535.

S. KURT, A. G. TOMATİR, P. E. TOKGUN & C. ONCEL, Altered Expression of Long Non-coding RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Alzheimer's Disease, MOLECULAR NEUROBIOLOGY, 2020, 0893-7648.

S. KURT & A. G. TOMATIR, Long Non-coding RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells Associated with Alzheimer Disease, International Journal of Scientific and Technological Research , 2019, 2422-8702, 5, 10, 10.

P. E. TOKGUN, O. TOKGUN, S. KURT, A. G. TOMATİR & H. AKCA, MYC-driven regulation of long non-coding RNA profiles in breast cancer cells, GENE, 2019, 0378-1119, 714.

S. KURT & A. G. TOMATIR, Long Non-coding RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells Associated with Alzheimer Disease, International Journal of Scientific and Technological Research, 2019, 2422-8702.

Bildiriler

S. KURT & S. KIZILDAĞ, Effect of long non-coding RNA linc00968 on apoptosis in in-vitro
Alzheimer's model, Poster Sunumu, 18th Medical Biology and Genetics Congress (26-29 October 2023), 26 Ekim 2023, 29 Ekim 2023, 2822-4272, 2, 3.

S. KIZILDAĞ, Ş. GENÇ, S. KURT, S. KIZILDAĞ, M. SAKIZLI & M. FADILOĞLU, The protective effect of erythropoietin on apoptotic cell death induced by amyloid in PC12 cells, Tam Metin Bildiri, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), 21 Mart 2020, 23 Mart 2020.

S. KURT, A. G. TOMATIR & P. E. TOKGÜN, Alzheimer Hastalığı Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinde Long non-coding RNA'ların Araştırılması, Poster Sunumu, 16. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27 Ekim 2019, 30 Ekim 2019.

P. E. TOKGÜN, O. TOKGÜN, S. KURT, A. G. TOMATIR & H. AKÇA, MYC Regulated Long Non-Coding RNAs in Breast Cancer: A Preliminary Data, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Genetik Günleri, 11 Mayıs 2017, 13 Mayıs 2017.

P. E. TOKGÜN, S. KURT, O. TOKGÜN, A. G. TOMATIR & H. AKÇA, MYC regulated long non-coding RNAs could have roles in development of breast cancer, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2017, 11 Mayıs 2017, 13 Mayıs 2017, 39, 2, 5000 - 5000.

Projeler

TÜSEB, ARAŞTIRMACI, Timolün Aß25-35 Kaynaklı Nörotoksisite Oluşturulmuş in vitro Glioblastoma Hücre Modelindeki
Etkilerinin Araştırılması (Devam ediyor) .

Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, ARAŞTIRMACI, RPTEC/TERT1 h?cre hatt?nda MOTS-C nin etkilerinin incelenmesi, 21 Ocak 2021, 21 Ocak 2023.

Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, ARAŞTIRMACI, Uzun Kodlamayan RNA (lncRNA) linc00968 'in Alzheimer h?cre k?lt?r? modellerinde apoptoz ?zerine etkisinin ara?t?r?lmas?, 02 Ocak 2020, 02 Ocak 2023.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0