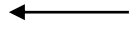


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA ROLÜ OLDUĞU
DÜŞÜNÜLEN ADAY GEN(LER)İN FONKSİYONEL
ANALİZİ**

PINAR KÖSEOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. NİHAN ERGİNEL-ÜNALTUNA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS**

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA ROLÜ OLDUĞU
DÜŞÜNÜLEN ADAY GEN(LER)İN FONKSİYONEL
ANALİZİ**

PINAR KÖSEOĞLU

**İKİNCİ DANIŞMAN
ÖĞR.GÖR DR. ZEYNEP GAMZE GÜVEN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Pınar KÖSEOĞLU tarafından Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA'nın danışmanlığında hazırlanan "Alzheimer Hastalığında Rolü Olduğu Düşünülen Aday Gen(ler)in Fonksiyonel Analizi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 19.07.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Selçuk S. TOKDEMİR
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ
İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fak.
Çocuk Sağ. ve Hast. A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Pınar Köseoğlu



İTHAF

Anneme, Babama ve Kız Kardeşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden, bilgi ve önerileriyle desteğini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Nihan Ünaltuna'ya,

Tez deneyleri ve tez yazım süreci boyunca ilgisini ve emeğini esirgemeyen, bitmeyen sorularıma her zaman cevap veren ilk yüksek lisans öğrencisi olarak beni kabul eden değerli ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Gör. Zeynep Gamze Güven'e,

Yüksek lisans eğitimim sırasında her zaman içtenlikle yardımcı olan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren ve bu konuda kendimi şanslı hissettiğim Ar.Gör.Dr. Filiz Geyik ve Ar.Gör.Dr. Neslihan Çoban'a,

Kullanılan hücre hattının temin edilmesini sağlayarak tez çalışmasına yardımcı dokunan değerli hocamız Doç.Dr. Sema Sırma Ekmekçi'ye,

Enstitü müdürümüz sayın Prof. Dr. Günnur Deniz'e ve akım sitometri deneylerinde yardımlarından dolayı Abdullah Yılmaz'a,

Birlikte çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum, her başım sıkıştığında gittiğim, yola beraber başladığım laboratuvar dışında da dostluğunu her zaman hissettiğim Uzm.Mol. Bio. Aybike Sena Özuynuk'a,

Tez çalışmam süresince beni yalnız bırakmayan, her zaman manevi desteklerini hissettiğim canım arkadaşlarım Mol.Bio Esra Kaynak, Uzm.Bio Selin Demirer, Uzm.Bio. Tuğçe Sudutan, Uzm.Bio. Burcu Salman ve Uzm.Bio Büşra Yaşa'ya,

Desteklerinden dolayı her zaman minnettar kalacağım canım arkadaşlarım Uzm.Mol.Bio Göksu Kaşarcı, Mol.Bio Benay Daylan, Mol.Bio İrem Kaya, Betül Uzar ve Elif Betül Aydın'a

Ve en önemlisi arkamda her zaman desteklerini hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan, beni motive eden ve bana her zaman güvenen canım annem Nazlı Köseoğlu, canım babam Hasan Köseoğlu, canım kardeşim Yağmur Köseoğlu ve Enes Gürdal başta olmak üzere bütün aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33597

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iii
BEYAN.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Alzheimer Hastalığı Genetiği.....	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığı Nöropatolojisi	5
2.1.4. Beyin ve Demir	7
2.1.4.1. Demirin Beyinde Taşınması.....	8
2.2. Ferroptoz	10
2.2.1. Ferroptoz Mekanizması.....	13
2.2.1.1. Ferroptoz Mekanizmasında Demir Metabolizması.....	15
2.2.1.2. Ferroptoz Mekanizmasında Lipid Metabolizması	16
2.2.2. Ferroptoz Mekanizmasında Bulunan Aktivatör ve İnhibitörler	17
2.2.3. Ferroptoz ile İlişkili Genler	20
2.2.4. Ferroptoz ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi	22
2.2.5. Aday Genler	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı	25
3.1.1.1. HEPG2 hücre hattı	25

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	25
3.1.3. Kullanılan Kitler	26
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	27
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	28
3.1.5.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	28
3.1.6. Hasta ve kontrol grubu	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. HEPG2 Hücre Kültürü	29
3.2.2. Akım Sitometri Deneyleri	31
3.2.3. Seçilen Hedef Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	32
3.2.3.1. RNA İzolasyonu.....	32
3.2.3.2. RNA Kalite ve Miktar Tayini	33
3.2.3.3. cDNA Sentezi.....	33
3.2.4. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Kantitatif PZR	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Hasta Grubunun Özelliklerinin Değerlendirilmesi	36
4.2. HEPG2 Hücre Hattında Erastin ve Ferrostatin-1 Konsantrasyonlarının Optimizasyonu	36
4.3. Akım Sitometri Deneyleri.....	44
4.4. qRT-PZR Sonuçları	47
4.4.1. Hücre Kültürü Ekspresyon Sonuçları	47
4.4.2. Hasta – Kontrol Grubunun Ekspresyon Sonuçları	52
5. TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	58
HAM VERİLER	67
FORMLAR	68
ETİK KURUL KARARI	69
PATENT HAKKI İZNİ	71
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	72
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Hücre ölüm şekillerinin başlıca özellikleri	11
Tablo 2-2 Ferroptoz aktivatörleri.....	18
Tablo 2-3. Ferroptoz inhibitörleri	19
Tablo 2-4 . Ferroptoz ile İlişkili Genler	21
Tablo 3-1 : Kullanılan kimyasallar	25
Tablo 3-2: Kullanılan kitler	26
Tablo 3-3 : Kullanılan cihazlar	27
Tablo 3-4 : Ferroptoz çalışma tasarımı	30
Tablo 3-5 : cDNA sentez protokolü.....	33
Tablo 3-6. qRT-PZR’de kullanılan primerler	35
Tablo 4-1. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri.....	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Alzheimer hastasına ait beyin kesit görüntüsü	5
Şekil 2-2. Amiloid Precursor Proteinin Proteolitik Yıkımı	6
Şekil 2-3. Alzheimer hastalığında ve normal durumda mikrotübül Tau protein ilişkisi ..	7
Şekil 2-4. Beyinde demirin taşınması	10
Şekil 2-5. Apoptoz ve Ferroptoz inhibitörlerinin etkisi	13
Şekil 2-6. Sistem X_c^- işlevi.....	14
Şekil 2-7.Ferroptoz mekanizması	17
Şekil 2-8. Ferroptozda seçilen aktivatör ve inhibitor.....	20
Şekil 4-1. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.....	37
Şekil 4-2. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.....	38
Şekil 4-3. HEPG2 hücrelerinin 10, 15, 20 ve 25µM Erastin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması	39
Şekil 4-4. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.....	39
Şekil 4-5. HEPG2 hücrelerinin 25µM Erastin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması.....	40
Şekil 4-6. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.....	41
Şekil 4-7. HEPG2 hücrelerinin 25µM Erastin ve 25µM Erastin +2 µM Ferrostatin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması.	42
Şekil 4-8. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.....	43
Şekil 4-9. HEPG2 hücrelerinin 35µM Erastin ve 35µM Erastin +2,5 µM Ferrostatin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması	43
Şekil 4-10. Akım sitometride hücrelerin dağılımı	44
Şekil 4-11. Akım sitometri sonuçları	45
Şekil 4-12. Akım sitometride hücrelerin dağılımı	46
Şekil 4-13. Akım sitometri grafiği	46
Şekil 4-14. Hücre kültürü materyallerinde <i>RAD21</i> geninin anlatım düzeyi	47
Şekil 4-15. Hücre kültürü materyallerinde <i>SLC7A11</i> geninin anlatım düzeyi	48
Şekil 4-16. Hücre kültürü materyallerinde <i>BNIP3L</i> geninin anlatım düzeyi.....	48
Şekil 4-17. Hücre kültürü materyallerinde <i>ACSL4</i> geninin anlatım düzeyi	49
Şekil 4-18. Hücre kültürü materyallerinde <i>TM2D1</i> geninin anlatım düzeyi	49
Şekil 4-19. Hücre kültürü materyallerinde <i>GPX4</i> geninin anlatım düzeyi	50

Şekil 4-20. Hücre kültürü materyallerinde <i>HMOX-1</i> geninin anlatım düzeyi.....	50
Şekil 4-21. Hedef genlerin hücre kültüründe anlatım düzeyleri.....	51
Şekil 4-22. Hasta-kontrol grubunda <i>SLC7A11</i> geninin anlatım düzeyi.....	52
Şekil 4-23. Hasta-kontrol grubunda <i>GPX4</i> geninin anlatım düzeyi	52



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μ L: mikrolitre

μ M: mikro molar

ACSL4: Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4

AH : Alzheimer Hastalığı

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid Öncü Protein

A β : Amiloid beta

BKEH: Beyinin Kılcal Damarında Bulunan Epitel Hücreleri

BNIP3L: BCL2 Interacting Protein 3 Like

DMSO: Dimetil sülfoksit

DMT1: Divalent Metal Taşıyıcı 1

EBAH: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

FBS: Fetal Sığır Serum

FPN: Ferroportin 1

GBAH: Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

GPX4 : Glutasyon Peroksidaz 4

GSH: Glutasyon

GSSG: Glutasyon Disülfid

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HMOX-1: Heme oxygenase 1

KBB: Kan Beyin Bariyeri

mL: mililitre

NFY: Nörofibriller Yumaklar

PBS: Phosphate Buffered Saline

PSEN-1: Presenilin-1

PSEN-2: Presenilin-2

PUFA: Çoklu Doymamış Yağ Asidi

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAD21: RAD21 Cohesin Complex Component

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SLC7A11: Solute Carrier Family 7 Member 11

SP: Senil Plaklar

TF: Transferrin

TfR1: Transferrin Reseptörü 1

TM2D1: TM2 Domain Containing 1



ÖZET

Köseoğlu P. Alzheimer Hastalığında Rolü Olduğu Düşünülen Aday Gen(lerin) Fonsiyonel Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

Ferroptoz yeni keşfedilen ve lipid peroksidleriyle tetiklenen demire bağımlı bir hücre ölümü şeklidir. Ferroptozun düzenlenmesi için birçok yolak ve ilgili gen tanımlanmıştır. Bu genlerden bazıları çeşitli hastalık patogeneziyle ilişkilendirilmiştir. Alzheimer hastalığı (AH) son yıllarda dünyada prevalansı büyük oranda artan, demansla kendini gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır. AH patogenezinde görülen hücre ölümlerinin mekanizması tam olarak çözülememiştir. Bu çalışmada HEPG2 hücre hattında ferroptoz indükleyicisi olan erastin ve inhibitörü olan ferrostatin-1 ile yapay ferroptoz ortamı oluşturulmuştur. Ferroptozun doğrulanması için hemositometre ile hücre sayımı ve akım sitometri deneyleri yapılmıştır. Hücre kültüründe ferroptozun başarılı bir şekilde oluşturulmasından sonra ferroptozla ilişkili olduğu bilinen *GPX4*, *SLC7A11*, *ACSL4* ve *HMOX-1* genlerinin yanısıra AH ile ilgili *BNIP3L*, *TM2D1*, *RAD21* genlerinin HEPG2 hücre hattında nasıl etkilendiği kantitatif GZ-PZR (qPZR) ile incelenmiştir. Aynı zamanda ferroptoz ile ilişkili genlerin (*GPX4* ve *SLC7A11*) anlatım düzeylerindeki değişimler 25 Alzheimer hastası ve 21 kontrolde kantitatif GZ-PZR ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda hücre kültüründen elde edilen örneklerle yapılan qPZR sonuçlarına göre erastin eklenen koşulda negatif koşula göre göre *RAD21* ve *GPX4* gen ifadelerinde azalma görülürken *SLC7A11*, *BNIP3L* ve *HMOX-1* gen ifadelerinde artış görülmüştür. Ancak erastin ve ferrostatin-1'in birlikte eklendiği koşulda ilgili gen ifadelerinin etkilenmediği gözlenmiştir. Ferroptozla ilişkili genlerin hasta gruplarında yapılan qRZR sonucunda ise anlamlı bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, *in vitro* deney şartlarında erastin ve ferrostatin-1 ile hücre kültüründe başarılı bir şekilde ferroptoz oluşturulmuştur. Ancak ilgili gen ifadelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: ferroptoz, erastin, ferrostatin-1, Alzheimer hastalığı, hücre ölümü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33597

ABSTRACT

Köseoğlu P. Functional Analysis of Genes May Involved in Alzheimer Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul. 2019.

Ferroptosis is a newly discovered form of iron-dependent death triggered by lipid peroxides. Many pathways and related genes have been identified for regulating ferroptosis. Some of these genes have been associated with various disease pathogenesis. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by dementia and its prevalence has increased in recent years. The mechanism of cell death in AD pathogenesis is not fully understood. In this study, artificial ferroptosis was created with the ferroptosis inducer erastin and its inhibitor ferrostatin-1 in HEPG2 cell line. Cell counts using hemocytometer and flow cytometry experiments were performed to confirm ferroptosis. After optimization of cell culture, the effect of genes (*BNIP3L*, *TM2D1* and *RAD21*) thought to be associated with AD in the HEPG2 cell line was examined by quantitative RT-PCR (qPCR). At the same time, changes in expression levels of ferroptosis-related genes (*GPX4* and *SLC7A11*) were evaluated by quantitative RT-PCR in 25 Alzheimer's patients and 21 controls. In this context, qPCR results from cell culture showed that the changes in gene expression of interest were either in the same direction only under erastin and in conditions where erastin and ferrostatin were added at the same time. It was determined that there was no significant change in qPCR results of the related ferroptosis genes in patient groups.

As a result, ferroptosis was successfully induced in cell culture with erastin and ferrostatin-1. However, no significant change was observed in related gene expression.

Key Words: ferroptosis, erastin, ferrostatin-1, Alzheimer's Disease, cell death

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2019-33597

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), beyinde biriken amiloid plaklar ve nörofibriller yumakların yanı sıra progresif bilişsel bozukluk ile karakterize en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Sinaptik iletişimin kaybı ve nöron ölümü, AH gibi nörodejeneratif hastalıkların altında yatan temel nedenler arasındadır. Ancak bu hücre ölümünün ortak moleküler mekanizmaları henüz bilinmemektedir. AH beyinlerinde artmış enflamasyon ve dejenerasyon süreci yalnızca apoptotik hücre ölümü ile açıklanamamaktadır. Bu da araştırmacılara alternatif bir hücre ölüm mekanizmasının söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Beyin, sağlığı ve gelişimi için demire ihtiyaç duyar. Sinapsların gelişmesi, miyelinizasyon süreci ve nörotransmitterlerin üretimi için demir-bağımlı enzimler ve proteinler gereklidir. Vücutta demir seviyeleri, diyetten alınan hassas demir alımı ile korunur. Bununla birlikte, vücudun demir atılımı için özel bir fizyolojik mekanizması yoktur. Demir bu nedenle yaşla belirli dokularda birikme eğilimindedir. Beyin, demirin yaşla birlikte biriktiği, önemli bir organdır. Demir homeostazındaki bozukluklar ve demir birikimi AH, Parkinson hastalığı (PD) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta görülmektedir [1].

Ferroptoz, hücre içinde lipid peroksidlerin birikmesiyle tetiklenen yeni tanımlanmış demire bağımlı bir hücre ölüm şeklidir. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşen tepkimeler zinciridir. En yaygın hedefleri biyolojik membran bileşikleridir [2]. Hücre içi hasarları hafifleten mekanizmaların yokluğunda lipid reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölümcül bir şekilde birikmesi, apoptoz gibi diğer hücre ölüm modellerinden biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı olan ferroptotik hücre ölümüne yol açar. Ferroptoz bugüne kadar Alzheimer, Huntington, Parkinson gibi dejeneratif hastalıkların yanı sıra karsinogenez, inme, travmatik beyin hasarı ve böbrek hastalıkları gibi patolojik hücre ölümü gerçekleşen hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur [3,70].

Bu tez çalışmasında, HEPG2 hücre hattında ferroptoz indükleyicisi olan erastin ve inhibitör madde olan ferrostatin-1 kullanılarak yapay ferroptoz modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu ferroptoz modelinde, AH ile ilişkili '*BCL2 Interacting Protein 3 Like*' (*BNIP3L*) , '*RAD21 Cohesin Complex Component*' (*RAD21*) ve '*TM2*

Domain Containing 1' (TM2D1) genlerinin anlatım düzeylerindeki farklılıkların belirlenmesi ve saptanacak olası farklılıkların ferroptoz ile ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca ferroptoz mekanizmasında rol oynadığı bilinen '*Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4' (ACSL4)* geni ile hücrede antioksidan göreviyle bilinen '*Heme Oxygenase 1' (HMOX-1)* geninin anlatım düzeyleri de oluşturulan ferroptoz modelinde bakılacaktır. Bununla birlikte, hastalık durumunda ferroptoz metabolizmasında görev alan genlerin anlatımlarının nasıl etkilendiğini belirlemek amacı ile, ferroptoz metabolizmasında görev aldığı bilinen '*Glutathione Peroxidase 4' (GPX4)* ve '*Solute Carrier Family 7 Member 11' (SLC7A11)* genlerinin periferik kandaki anlatım düzeyleri Alzheimer hastaları ve kontrollerde incelenmiştir.

Seçilen genlerin AH ve ferroptoz ile ilişkileri ilk kez bu proje kapsamında incelenecek olup saptanacak olası farklılıkların AH patogeneze katkı sağlaması muhtemeldir. Bununla birlikte mevcut ferroptoz inhibitörlerin optimizasyonu veya ferroptozu bloke eden yeni inhibitörlerin tanımlanması, Alzheimer hastalığı tedavisinde yol gösterici olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), genellikle yakın bellek bozukluğu ile başlayan sonrasında tüm zihinsel işlevleri etkileyen ve günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ile karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır [4].

AH ilk kez klinik psikiyatrist ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Dr. Alzheimer, 3 Kasım 1906 tarihinde gerçekleşen Tübingen'deki 37. Güney Batı Alman Psikiyatristleri Toplantısında, ilk kez hastalığın klinik ve patolojik bulgularını “serebral kortekse özgü ciddi bir hastalık süreci” başlıklı konuşmasında sunmuştur [5]. Bu konuşmasında paranoya, ilerleyici uyku ve hafıza bozukluğu, saldırganlık ve kafa karışıklığı şikayetleri bulunan 51 yaşındaki bir kadın hastasından bahsetmiştir. Dr. Alzheimer, 5 yıl sonra ölen hastasına yaptığı otopsi ile beynini morfolojik ve histolojik açıdan incelemiştir. Raporunda hastanın beyin histolojisinde senil plaklar ve nörofibriler yumaklar olduğunu belirtmiş ve sonrasında 1909'da benzer üç vaka daha yayınlamıştır. Hastalığa 1910 yılında Dr. Emil Krapelin tarafından Alzheimer hastalığı adı verilmiştir.

2.1.1. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi

Demansın en sık görülen sebebi olan Alzheimer hastalığı, bireyler ve toplum için büyük etkileri olan büyüyen bir küresel sağlık sorunudur [6]. 2012 verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 5,5 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır ve dünya genelinde prevalansı 24 milyon kadar yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerin nüfuslarının hızla yaşlandığı göz önüne alındığında, sıklığın 2040 yılına kadar her 20 yılda bir ikiye katlanması beklenmektedir [4]. Dünya nüfusu yaşlanmaya devam ettikçe, risk altındaki bireylerin sayısı da artacaktır. Toplumsal yaşlanmaya bağlı olarak yaklaşmakta olan artışın büyüklüğü dikkate değerdir [74] ve önümüzdeki yıllarda maliyeti yüksek bir halk sağlığı yükü olacaktır. İngiltere ve Galler'de, demans genel olarak ölümlerin önde gelen nedenlerindendir ve 2015 yılında kaydedilen tüm ölümlerin% 11,6'sını oluşturmaktadır [6].

'Alzheimer Europe' organizasyonunun yaptığı bir araştırmaya göre, Türkiye'de 2012 yılında demans hastalarının sayısı 331,512 olarak tahmin edilmektedir ve bu

rakam toplam 74.508.771 nüfusun % 0.44'ünü temsil etmektedir. Bu rakam Türkiye'deki demanslı bireylerin sayısının, % 1.55 olan AB ortalamasından oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

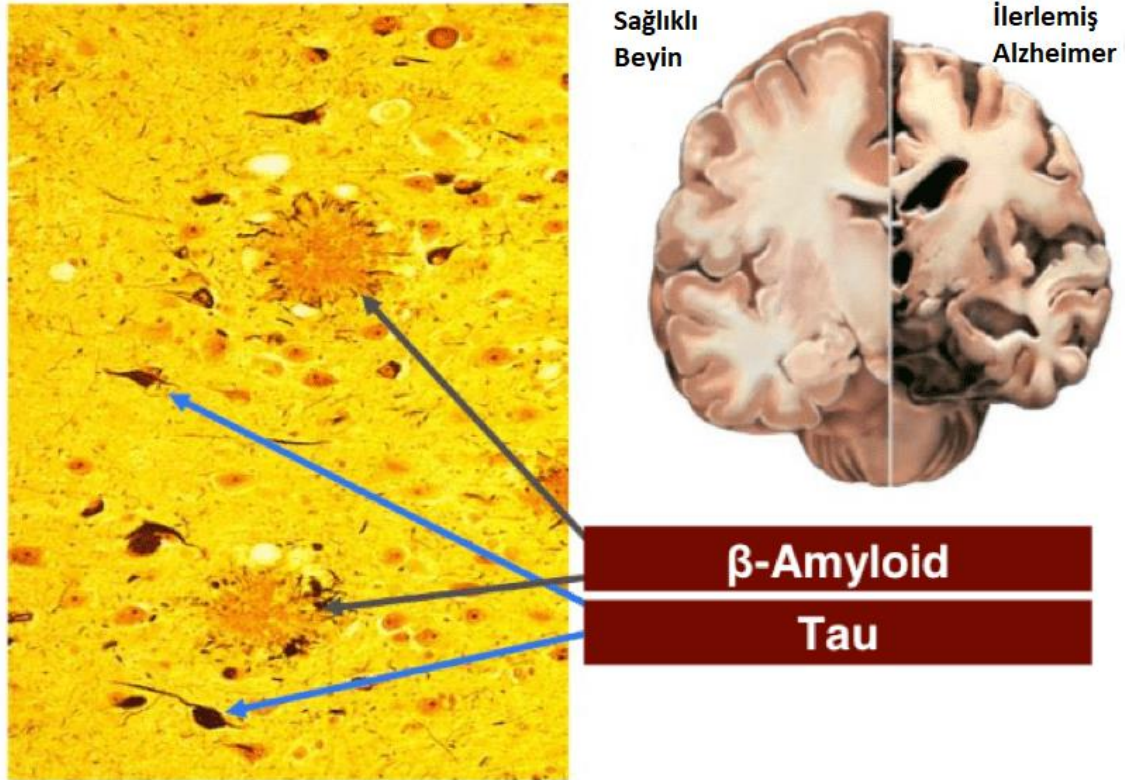
2.1.2. Alzheimer Hastalığı Genetiği

Yapılan çalışmalar AH riskinin yaklaşık % 70'inin genetik faktörlere bağlı olduğu düşündürmektedir [6]. Alzheimer hastalığı başlangıç yaşına göre erken başlangıçlı AH (EBAH) ve geç başlangıçlı AH (GBAH) olarak 2 gruba ayrılır. Hem EBAH hem de GBAH'da, aşamalı bellek kaybı ile başlayan ve ardından ciddiyeyle artan demans ile devam eden klinik bir tablo görülür. Hastalığın 65 yaşından önce başlayan formu olan EBAH, tüm Alzheimer hastalarının %1-6'sını oluşturmaktadır. EBAH vakalarının yaklaşık %60'ı ailevidir ve bu vakaların %13'ünde otozomal dominant kalıtım şekli görülür [8]. EBAH için bugüne kadar 3 gende - *Amyloid Beta Precursor Protein (APP)*, *Presenilin-1 (PSEN1)*, *Presenilin-2 (PSEN2)* - görülen mutasyonlar sorumlu tutulur.

AH'nin en yaygın şekli olan GBAH ise 65 yaşından sonra başlar ve çoğunlukla sporadiktir. GBAH'ın, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminden kaynaklanması muhtemeldir. GBAH için en önemli risk faktörü *Apolipoprotein E (APOE)* geni $\epsilon 4$ allel taşıyıcılığıdır [6]; $\epsilon 4$ allelini heterozigot olarak taşıyanların AH riski yaklaşık 3 kat artarken, $\epsilon 4$ allelini homozigot olarak taşıyanların riski ise yaklaşık 12 kat yükselir [7]. Ancak, *APOE* $\epsilon 4$ allelini taşıyan birçok kişinin 90 yaşına kadar hastalık belirtisi göstermeden geldiği de görülmüştür. Bu durum da GBAH için henüz belirlenmemiş diğer genetik ve/veya çevresel risk faktörlerinin varlığını göstermektedir. AH ile ilişkili yeni aday genlerin belirlenmesi amacıyla yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında, 20'den fazla AH risk lokusu tanımlanmıştır ve ilişkili genlerin enflamasyon, kolesterol metabolizması ve endositoz yollarında görev aldıkları belirlenmiştir [8]. Son yapılan epidemiyolojik bir çalışma, fiziksel egzersizin bireyi AH'ye karşı koruyabileceğini hipertansiyon ve diyabetin ise AH riskini arttırdığını göstermektedir [9]. Ayrıca obezite ve demans arasında uzun zamandır bağlantı olduğu düşünülmüş ve 2015'de yapılan bir kohort çalışmasında aşırı kilonun Alzheimer riskini arttırdığı bulunmuştur [10].

2.1.3. Alzheimer Hastalığı Nöropatolojisi

AH demansın en sık görülen türüdür ve iki nöropatolojik özellik ile tanımlanır: hücre dışı nöronal senil plakların (SP) ana bileşeni olan amiloid beta peptidi ($A\beta$) birikimi ve hücre içi nörofibriller yumakları (NFY) oluşturan aşırı fosforile mikrotübül ile ilişkili protein tau birikimi (Şekil 2-1) [11, 68].

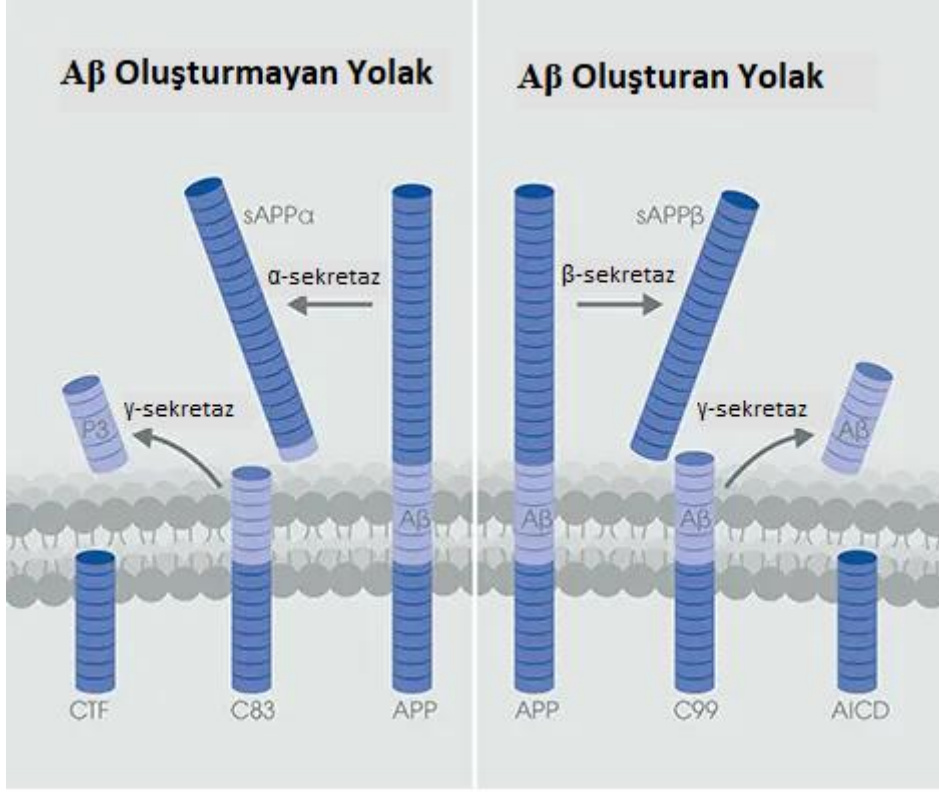


Şekil 2-1. Alzheimer hastasına ait beyin kesit görüntüsü

Şekilde sağlıklı (sol) ve Alzheimer hastasına (sağ) ait beyin kesiti görülmektedir. Mavi oklar hücre içindeki tau proteinini ve yeşil oklar ise amiloid plakları göstermektedir. [12]

Amiloid plaklar, esas olarak, APP metabolizmasının yan ürünü olan 40 veya 42 amino asitlik ($A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$) anormal şekilde katlanmış amiloid beta ($A\beta$) proteininden oluşan hücre dışı birikimlerdir. APP nöronlar ve diğer beyin hücrelerinde bulunan bir transmembran proteinidir. APP α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz adlı 3 farklı enzim ile proteolitik yıkıma uğrar. Toksik $A\beta$ oluşması APP'nin hangi enzimle kesildiğine bağlıdır (Şekil 2-2). APP'nin önce α -sekretaz ardından γ -sekretaz ile

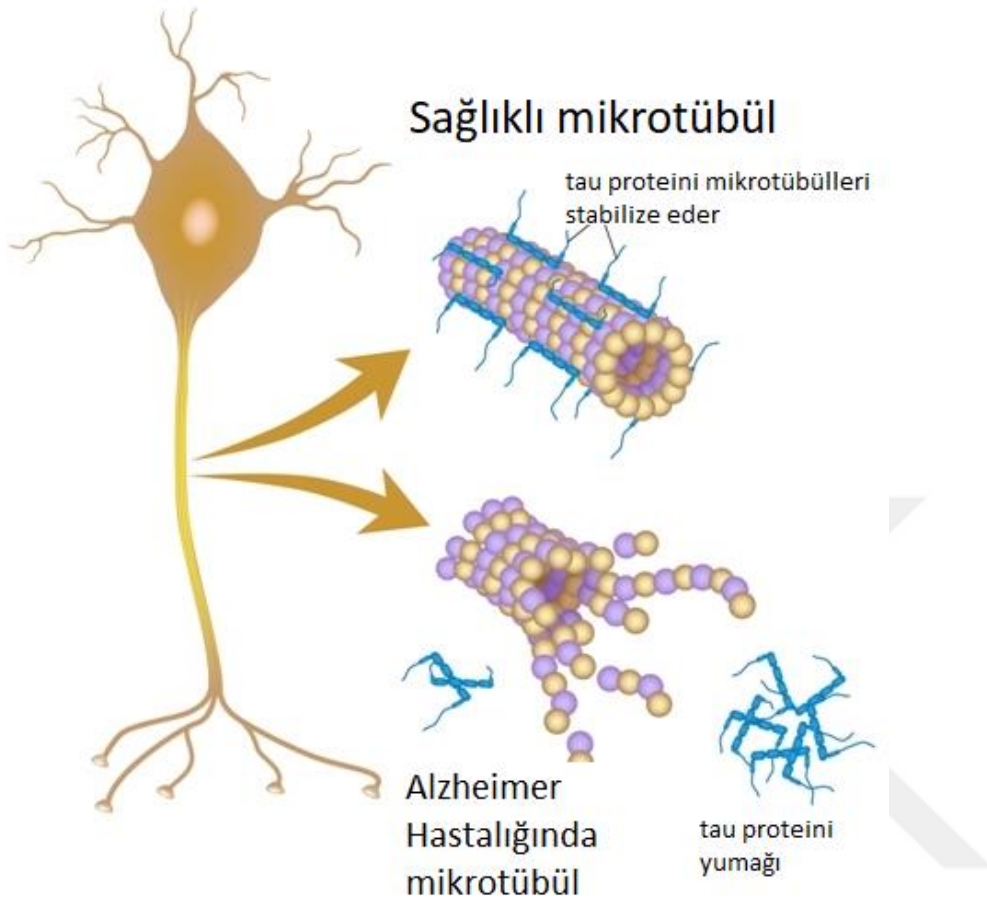
kesiminde A β proteinini oluşmazken, önce β -sekretaz sonrasında γ -sekretaz ile kesilmesi A β proteininin oluşmasına yol açar [6].



şekil 2-2. Amiloid Precursor Proteinin Proteolitik Yıkımı

şekilde sol tarafta APP'nin önce α -sekretaz sonra γ -sekretaz ile kesilmesiyle A β oluřturmayan yolak gōsterilirken sağ tarafta APP'nin önce β -sekretaz sonra γ -sekretaz ile kesilmesiyle A β oluşturan yolak gōsterilmiřtir [13].

Nōrofibriler yumaklar (NFY) esas olarak hiperfosforile tau proteininden oluşan çift sarmal liflerden oluşmaktadır. Tau proteinini mikrotübüllerin stabilizasyonu ve aksonal taşınmada önemli rol oynamaktadır. Hiperaktif kinazlar ve hipoaktif fosfatazlar tau proteinini hiperfosforile ederek mikrotübüllere bağlanmasını engeller. Hiperfosforile tau proteinleri çözünmeyen bir formda bulunduğu için beyinde birikme eğilimindedir. Tau monomerleri önce oligomerler oluşturmak üzere bir araya gelirler daha sonra nōrofibriller yumakları oluştururlar (şekil 2-3) [14].



Şekil 2-3. Alzheimer hastalığında ve normal durumda mikrotübül Tau protein ilişkisi

Sağlıklı durumda aksonal transportta görevli mikrotübüllerin stabilizasyonu tau proteini tarafından sağlanır. Kritik bölgelerin fosforilasyonu ile tau proteini mikrotübüllerden ayrılır ve çift sarmallı filamanlar halinde birikir [15].

Amiloid plak ve tau proteini AH'nin patogenezinde kritik olsa da, ikisinin de mekanik olarak nasıl bağlantılı olduğu belirsizdir. Bir dizi kanıt, doğal immün sistemin (nöroenflamasyon) AH patogenezinde kritik bir rol oynadığını ve bu bağı sağlayabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda aktive edilmiş mikroglia hücrelerinin postmortem beyinlerde amiloid plaklarla birlikte yerleşik olduğu gösterilmiştir [6].

2.1.4. Beyin ve Demir

Demir, dünya üzerindeki yaşam için gerekli olan en bol metaldir. Demirin oksidasyon yeteneği, katalitik işlevlerini yerine getirmek isteyen birçok enzim

tarafından kullanılır. Bu nedenle demir; solunum, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi zorunlu hücre fonksiyonları ile oksijen transportu, nöronların elektriksel uyarımı gibi özel hücresel fonksiyonlarda yer alan proteinler için vazgeçilmez bir yardımcı faktör olarak ortaya çıkmıştır [16]. Demir, biyomoleküller üzerinde hasara yol açabilen, kolaylaştıracağı hayatı tehlikeye sokabilen güçlü bir oksidan görevi de görebilir. Vücutta demir seviyeleri, beslenmeyle alınan hassas demir miktarı ile korunur. Bununla birlikte, vücudun demir atılımı için özel bir fizyolojik mekanizması yoktur. Demir bu nedenle yaşla belirli dokularda birikme eğilimindedir. Beyin, demirin yaşla birlikte özellikle de patolojik olarak biriktiği önemli bir organdır [1].

Beyin, sağlığı ve gelişimi için demire ihtiyaç duyar. Sinapsların gelişmesi, miyelinizasyon süreci ve nörotransmitterlerin üretimi için demir-bağımlı enzimler ve proteinler gereklidir. Dahası beyin, hücresel solunumla ilgili demir bağımlı proteinlere enerjisel olarak bağımlıdır. Erken gelişme sırasında demir eksikliği, normal beyin gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum zeka, algı, motor beceriler ve sosyal davranışlar dahil olmak üzere beyin fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir [17].

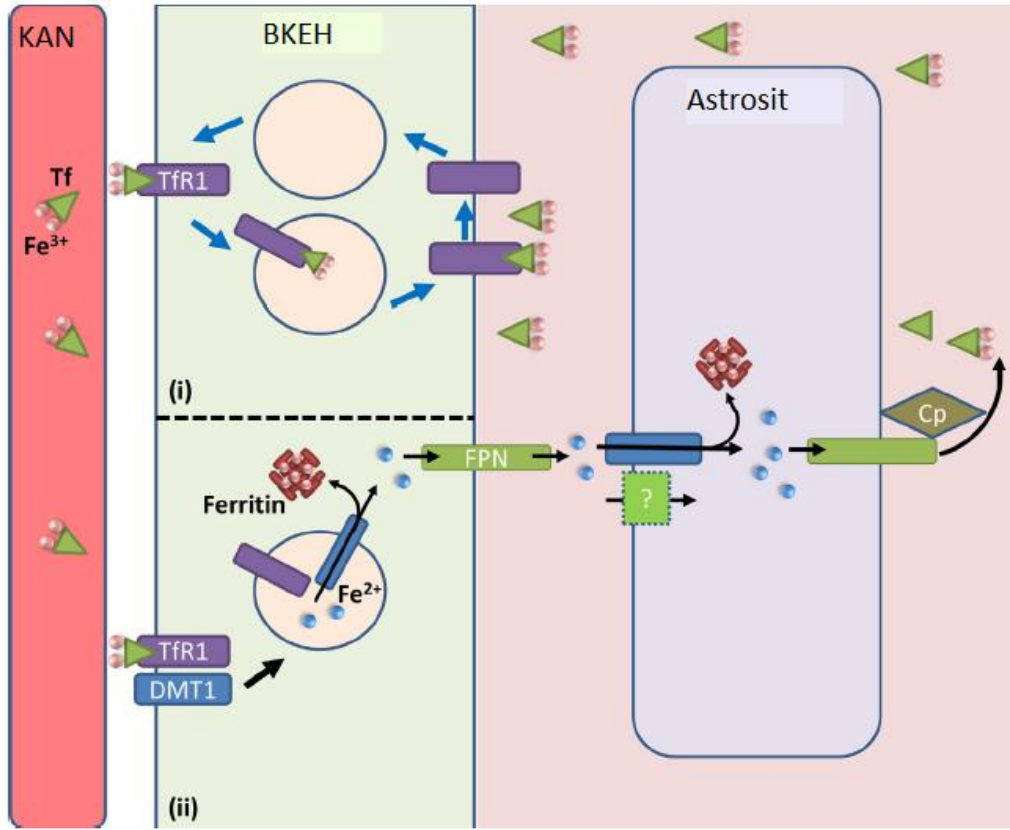
Hücresel hasar ve oksidatif stres ile ilişkili demir metabolizmasının düzensizliği, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ortak bir olay olarak bildirilmektedir [14]. Yaşlanmanın nörodejeneratif hastalıklar için ana risk faktörü olduğu kabul edilmektedir. Benzer şekilde, demir de yaşla beraber beynin çeşitli bölgelerinde birikir ve çeşitli nörodejeneratif bozuklukları ortaya çıkmasına yol açar [18, 19]. Bazı nörodejeneratif hastalıklar için tanı ve tedavi yaklaşımları oluşturulması için yapılan son çalışmalar, nörodejenerasyon ve ilgili oksidatif stres sürecinde demirin merkezi bir rol oynadığını düşündürmektedir [11].

2.1.4.1. Demirin Beyinde Taşınması

Demir, beyindeki normal fizyolojik fonksiyonların korunmasında çok önemli bir rol oynar [20]. Beyine demir taşınmasında ilk adım beynin kılcal damarındaki endotel hücrelerinin (BKEH), kandan transferine (Tf) bağlı demir alımına izin vermesidir. Beynin kılcal damarındaki endotel hücreler aynı zamanda kan beyin bariyerinin bütünlüğünü korur. Beyinde sinaptik boşlukta bulunan ve birikmesiyle toksik etkilere neden olabilen ve ekstrasellüler dengeyi bozabilen maddelerin temizlenmesi için bir

çeşit glia hücresi olan astrositler bulunur. Bu koruyucu mekanizma ile beyinde demir alımı kolaylaşmış olur (Şekil 2-4).

Beynin içine demir alımı, kan dolaşımında bulunan transferrin (Tf) 'nin BKEH'lerin yüzeyi üzerindeki transferrin reseptörü 1'e (TfR1) bağlanması ve Tf / TfR1 kompleksinin oluşması ile başlar. Ancak araştırmacıların uzun süreli yaptığı çalışmalar sonucu hücreye girdikten sonraki kısım için fikir birliğine varılamamış ve iki senaryo ortaya atılmıştır. Alternatif modele (transitoz model) göre, demir yüklü transferrin (holo-Tf) BKEH'lerin sitosolü boyunca abluminal bölgeye taşınır ve daha sonra doğrudan beyinde serbest bırakılır. Klasik modele göre demir, proton pompalarının aktivitesi ile elde edilen düşük bir pH (yaklaşık 5.5) altında BKEH'lerin endozomunda bulunan transferrinden salınır. Bunu, STEAP3 gibi ferrik redüktazların varlığında demirin ferroz (Fe^{+2}) haline indirgenmesi izler. Daha sonra demirin endozomal membrandan sitosol içerisine taşınmasına divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1) aracılık eder. Ferroz demir daha sonra ferritin içine depolanabileceği gibi demir pompası olan ferroportin 1 (FPN) tarafından hücre membranı boyunca dışarı da atılabilir [1]. Demirin atılımı, ferrozun oksidasyonunu sağlayarak ferrik (Fe^{+3}) haline geçip transferrine bağlanabilmesini sağlayan ceruloplasmin (Cp) gibi ferroksidazların yardımıyla gerçekleşir [21].



Şekil 2-4. Beyinde demirin taşınması

Beyinde demirin taşınmasında alternatif model (i) ve klasik model (ii) olarak iki teori öne sürülmüştür. Alternatif modelde demir yüklü transferrin (Tf) BKEH'lerin sitosolü boyunca abluminal bölgeye taşınır ve daha sonra doğrudan beyinde serbest bırakılır. Klasik modelde ise beyine demir taşınımı divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1) aracılığıyla yapılmaktadır. Ferroz demir daha sonra ferritin içine depolanabileceği gibi demir pompası olan ferroportin 1 (FPN) tarafından hücre membranı boyunca dışarı da atılabilir [1].

2.2. Ferroptoz

Hücre ölümü, normal gelişim ve homeostazda önemli olduğu kadar kanser gibi hiperproliferatif hastalıkların önlenmesi için de çok önemlidir. Uzun yıllar boyunca, araştırmacılar hücre ölüm süreçlerini programlanmış ve programlanmamış olanlara ayırmıştır [22]. Aynı şekilde bilim insanları, memeli hücrelerinde meydana gelen programlanmış hücre ölümlerinin hemen hemen hepsinin apoptozdan kaynaklandığı düşünmüştür. Ancak son yıllarda, daha önce tesadüfi bir yapı olduğuna inanılan bazı hücre ölümü biçimlerinin sıkı bir şekilde düzenlendiğini ortaya koyulmuştur.

Ferroptoz, apoptoz ve nekroz gibi geleneksel hücre ölümlerinden farklı, demire bağımlı ve lipid peroksid birikmesiyle gerçekleşen yeni keşfedilmiş bir hücre ölümü biçimidir. Ferroptoz terimi ilk defa 2012 yılında Stockwell ve ekibinin yaptığı çalışmada kullanılmıştır [23].

Kaspaz bağımlı apoptoz, moleküler düzeyde karakterize edilen ilk düzenlenmiş ve programlanmış hücre ölümü şeklidir. Son yıllarda, apoptozun ötesinde düzenlenmiş hücre ölümü mekanizmalarının, normal fizyolojik süreçte gerçekleşmesi programlanmasına rağmen bu fizyolojik koşulların ne olduğu büyük ölçüde gizemini korumaktadır.

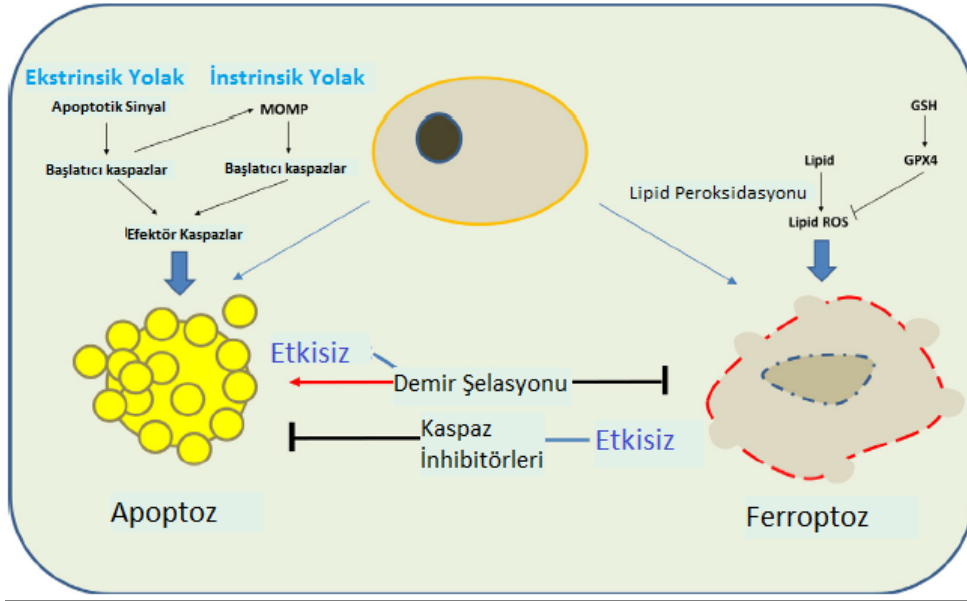
Hücrelerde ferroptoz ve apoptoz gibi hücre ölümleri, morfolojik ve biyokimyasal olarak ayırt edilebilir (Tablo 2-1). Ferroptoz görülen hücrelerde, kromozomal yoğunlaşma ve apoptotik cisimler gibi apoptoz ile ilişkili özellikler yoktur. Ferroptoz mekanizmasından apoptozdan farklı olduğu farklı olduğu inhibitörleriyle yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Şekil 2-5) [1].

Tablo 2-1. Hücre ölüm şekillerinin başlıca özellikleri

Hücre ölüm şekillerinin biyokimyasal özellik, morfolojik özellik, anahtar genler, düzenleyici yollar, aktivatör ve inhibitörler açısından farkları tabloda verilmiştir [24].

Hücre Ölümü	Ferroptoz	Apoptoz	Otofaji	Nekroz
Biyokimyasal Özellikler	Sistem Xc- inhibisyonu ve glutamat azalması, GPX4 inhibisyonu. Demir birikimi ve lipid peroksidasyonu	Kaspazların aktivasyonu, oligonükleozomal DNA fragmentlerinin oluşumu	Artan lizozomal aktivite	ATP seviyelerinde düşüş ve RIP1, RIP3, MLKL aktivasyonu
Morfolojik Özellikler	Küçülmüş mitokondri, mitokondri kristasının ve mitokondrinin dış	Plazma membranının tomurcuklanması, hücre hacminin azalması, nüklear	Çift zarlı otolizozomların oluşumu	Plazma zarının parçalanması, organellerin şişmesi

	zarının azalması ya da yok olması	fragmasyon		
Anahtar Genler	<i>GPX4, Nrf2, LSH, TFR1, xCT</i>	<i>Kaspaz, P53, Fas, Bcl-2, Bax</i>	<i>ATG5, ATG7, DRAM3, TFEB</i>	<i>LEF1, RIP1, RIP3</i>
Düzenleyici Yolaklar	Sistem Xc- ve Gpx4, MVA, HSF1-HSPB1, p62-Keap1-Nrf2 yolakları, LSH sinyal yolağı	Ölüm reseptörü, Mitokondriyal, Endoplazmik retikulum yolakları, Kaspaz, P53, Bcl-2 aracılı sinyal yolağı	PI3K-AKT-mTOR, MAPK-ERK1/2-mTOR sinyal yolağı	TNF α , TNFR1, TLR3, TRAIL, FasL, ROS, PKC-MAPK-AP-1-aracılı sinyal yolağı
Aktivatörler	Erastin, DPI2, BSO, SAS, lanperisone, SRS, RSL3, DPI7, DPI10, FIN56, sorafenib, artemisinin	FASL, DCC, UNC5B	Rapamycin, lithium, sodium, valproate, carbamazepine, C2-ceramide, rapamycin	TNF α , zVAD-fmk, PAMPS
İnhibitörler	Desferoxamine, vitamin E, U0126, ferrostatin-1, SRS, CA-1, cycloheximide, aminooxyacetic acid Liproxstatin-1 HCl	XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ILP-2, ML-IAP/livin, NAIP, Z-VADFMK	3-ME, LY294002, wortmannin, PIK-III, compound 31, SAR 405, Vps34-In1, MRT68921, Spautin-1, Bafilomycin A1, hydrochloroquin	Nec-1, NSA, Kongensin- A



Şekil 2-5. Apoptoz ve Ferroptoz inhibitörlerinin etkisi

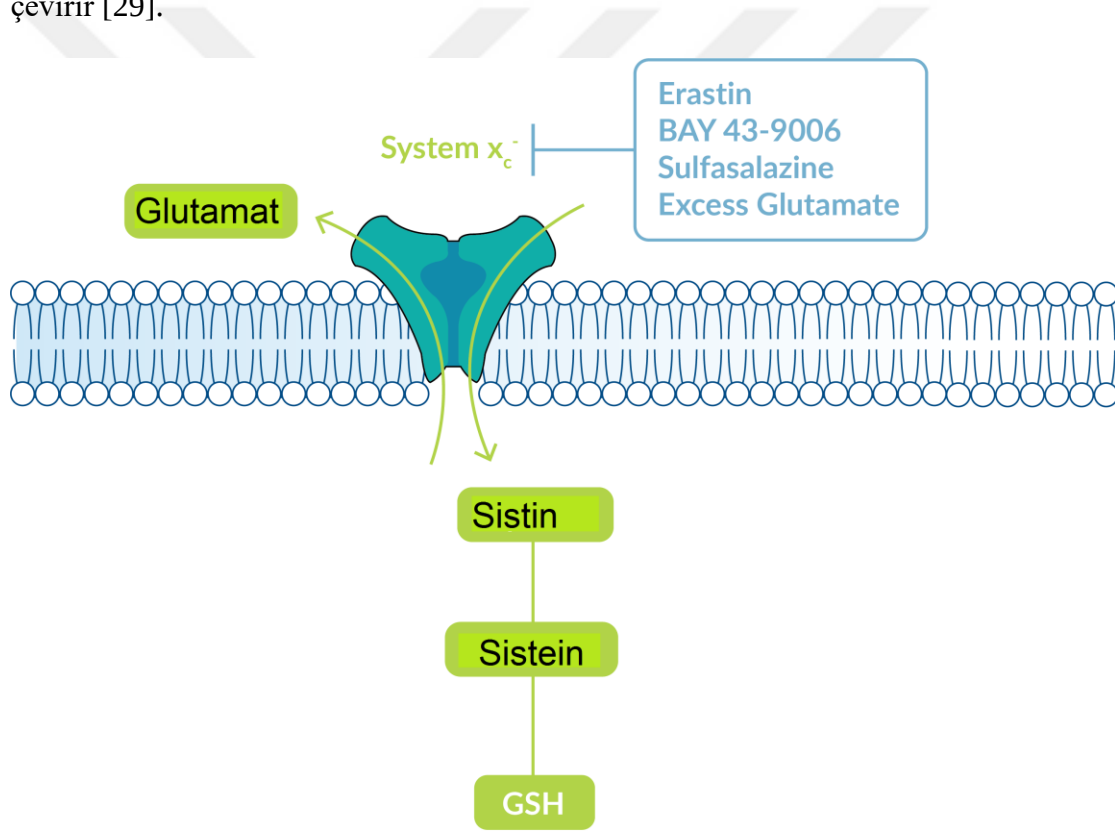
Demir şelatörleri apoptoza etki etmezken ferroptozu inhibe eder. Aynı şekilde kaspaz inhibitörleri ise apoptoza inhibe ederken ferroptoz sürecini etkilemez [1].

2.2.1. Ferroptoz Mekanizması

Ferroptotik ölüm, glutatyon ve GPX4 gibi lipid onarım sistemleriyle büyük ölçüde kontrol edilen ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) biyosentezini de içeren bir dizi enzimatik reaksiyona bağlı düzenlenmiş hücre ölümü şeklidir. Birçok yolla tetiklenebilir [69].

Ferroptoz, iki farklı mekanizma aracılık ettiği GPX4 aktivitesinin kaybıyla başlar (Şekil 2-6). İlk mekanizma, GPX4 enzimini dolaylı olarak engelleyen sistem Xc⁻'nin inhibisyonudur (örneğin, erastin ile muamele). Sistem Xc⁻, hücre membranında bulunan bir hafif zincirli alt birimden (xCT, SLC7A11) ve bir ağır zincir alt biriminden (CD98hc, SLC3A2) oluşan Na⁺ bağımlı bir sistein-glutamat antiporterıdır (Şekil 2-7). Hücre içinde bulunan glutamati hücre dışına atarken, hücre dışında bulunan sistini hücre içine taşır [25]. Hücre içine alınan sistin daha sonra glutatyon (GSH) sentezinde kullanılmak üzere sisteine dönüştürülür. Sistein, glutamat ve glisinle birleşerek glutatyonu oluşturur. Sistinin hücreye alınıp sisteine dönüştürülmesi, glutatyon sentezinin kilit basamağıdır ve glutatyon, hücreleri oksidatif stresin neden olduğu hasardan korumak için kritik öneme sahiptir [23]. Glutatyon, lipid tamir enzimi olan

glutasyon peroksidaz 4'ün (GPX4) aktivitesi için gereklidir ve GPX4 lipid bazlı reaktif oksijen türlerinin (ROS), özellikle lipid hidroperoksitlerin birikimini önler. GPX4, temel bir kofaktör olarak glutasyonu kullanarak fosfolipid peroksidaz aktivitesini sağlayarak lipid peroksitlerin indirgenmesini katalizler [26]. Erastin glutamat/sistin antiportu sistem X_c^- 'yi inhibe eder [27]. Erastin bu sistemi baskıladığı için hücre içindeki glutasyon seviyesinin düşmesine ve hücrenin oksidatif hasara hassasiyetinin artmasına neden olur. Glutasyon sentezinin hızını sınırlayan enzim olan γ -GCS'nin butiyonin sülfoksiminin (BSO) ile inhibe edilmesi de ferroptozu başlatmak için yeterlidir [28]. GPX4, lipid hidroperoksitlerini alkole ve serbest hidrojen peroksitlerini suya dönüştürmek için glutasyonu oksitlenmiş formu olan glutasyon disülfite (GSSG) çevirir [29].



Şekil 2-6. Sistem X_c^- işlevi

Sistem X_c^- , hücre membranında bulunan Na^+ bağımlı bir sistein-glutamat antiporteridir. Hücre içinde bulunan glutamati hücre dışına atarken, hücre dışında bulunan sistini hücre içine taşır. Hücre içine alınan sistin daha sonra glutasyon (GSH) sentezinde kullanılmak üzere sisteine dönüştürülür. Sistein, glutamat ve glisinle birleşerek glutasyonu oluşturur. Glutasyon, lipid tamir enzimi olan glutasyon peroksidaz 4'ün (GPX4) aktivitesi için gereklidir. GPX4, lipid hidroperoksitlerini alkole ve serbest hidrojen peroksitlerini suya dönüştürmek için glutasyonu oksitlenmiş formu olan glutasyon disülfite (GSSG) çevirir.

Ferroptozun bir başka moleküler mekanizması, GPX4 aktivitesinin doğrudan engellenmesidir. Klasik ferroptotik indükleyici olan (1S, 3R) -RSL3, GPX4 enziminin aktif bölgesinde bulunan selenosisteinini hedef alarak GPX4'ün enzimatik aktivitesini geri dönüşümsüz bir inhiye edebilir (Şekil 2-7) [28, 30]. Ayrıca, GPX4'ün siRNA ile inhibisyonu, ferroptotik hücre ölümü için gerekli olan lipid ROS birikimini indüklemek için de yeterli olmuştur [28]. Sonuç olarak GPX4, ferroptoz mekanizmaların merkezi bir düzenleyicisidir.

Demir bağımlı ROS birikiminin, ferroptotik hücre ölümünü tetiklediği göz önüne alındığında, hem demir metabolizması hem de lipid peroksidasyonu, ferroptoz mekanizmasında rol oynayan iki kritik işlemdir.

2.2.1.1. Ferroptoz Mekanizmasında Demir Metabolizması

Hücre içindeki ferroz demir havuzları (Fe^{2+}) lipid peroksidleri zararlı serbest radikaller oluşturmak üzere Fenton reaksiyonu ile doğrudan katalize edebilir. Lipid peroksidler hücre içinde zamanında detoksifiye edilmezse, lipid alkoksi ($RO\bullet$) radikallerine dönüşerek hücrede birikir ve bu birikim ferroptozu yol açar. Bu yolak, ferroptozun neden diğer metal iyonlarından ziyade demire bağlı olduğunu açıklamanın sebeplerinden sadece bir tanesidir [26].

Demir metabolizmasının ana regülatörü olan '*Iron response element binding protein 2 (IREB2)*', HT-1080 ve Calu-1 hücrelerinde erastin kaynaklı ferroptoz için temel bir gen olarak tanımlanmıştır [31]. *IRP2* olarak da adlandırılan *IREB2*, transkripsiyon sonrası demir metabolizma genlerini (*FTH1*, *FTL*, *TF*, *TfR1*, *Fpn* ve *DMT1*) kontrol ederek hücre içi demir homeostazını çok önemli bir rol oynar [32]. Ferritin hücre içi demir depolama proteindir. Ferritinofaji olarak adlandırılan ferritinin NCOA4 ile otofajik degradasyona uğraması, hücre içine serbest demir saldığı için ferroptoz duyarlılığını artırır (Şekil 2-7) [33].

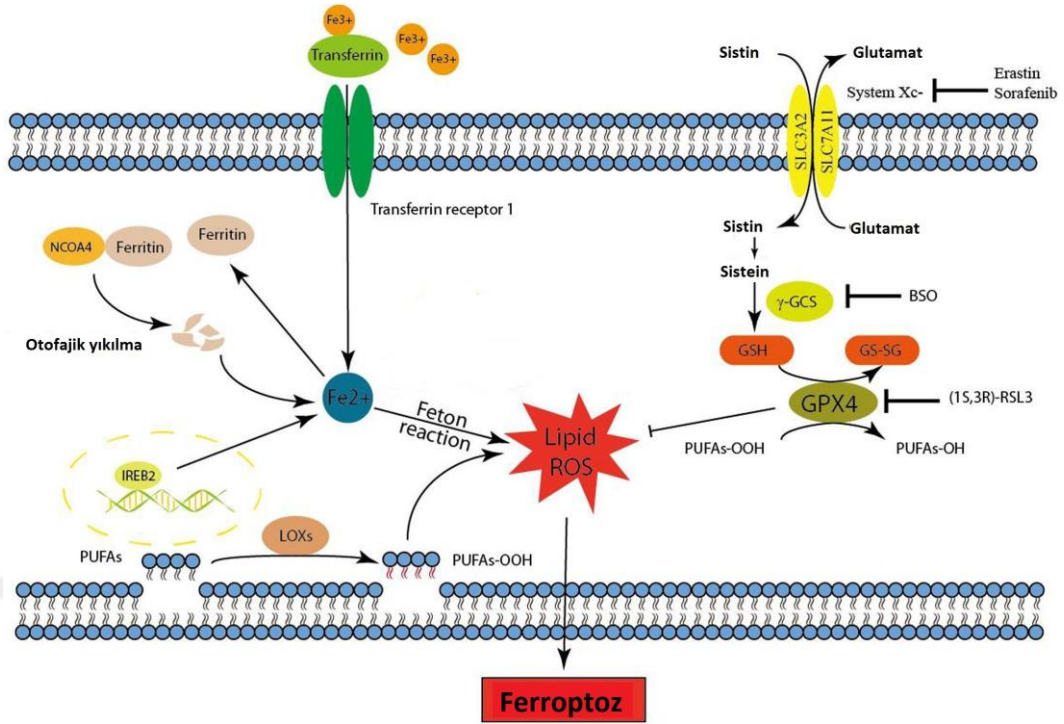
Demir, transferrin reseptörü 1 (*TfR1*) aracılığıyla transferrin (*Tf*) proteinine bağlı olarak endositoz ile hücre içine taşınır [32]. Yapılan çalışmalar, *Tf*'nin ferroptotik hücre ölümünün indüksiyonu için önemli bir bileşen olduğunu göstermiştir [34]. Hücre içinde bulunan serbest demir havuzunun tolere edilebilir bir seviyede tutulması, hücreyi

oksidatif strese karşı korur ancak ferroz demir havuzunun konsantrasyonu, homeostatik sınırların ötesine yükselirse, hücrede şiddetli oksidatif hasar meydana gelir [35].

2.2.1.2. Ferroptoz Mekanizmasında Lipid Metabolizması

Lipid metabolizması ayrıca ferroptozu karşı hücrel duyarlılığın belirlenmesinde de rol oynar. Kolayca çıkarılabilen hidrojen atomları içeren çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), lipid peroksidasyonuna meyillidir ve ferroptozun gerçekleştirilmesi için gereklidir [28, 72]. Bu nedenle, çoklu doymamış yağ asitlerinin bolluğu ve lokalizasyonu hücrelerde meydana gelebilecek lipid peroksidasyon derecesini ve dolayısıyla ferroptozun ne kadar etkin olduğunu belirler [36]. Hücrede bulunan iki enzim, ACSL4 ve LPCAT3 hücrel membranda çoklu doymamış yağ asitlerinin biyosentezi ve yeniden şekillenmesi ile ilgilidir. Bu genler, lipid peroksidasyonu ve ROS oluşumu için ferroptozu teşvik etmeye yeterli membran lipid PUFA üretimini sağlar (Şekil 2-8) [37].

Normal koşullar altında, yağ asidi hidroperoksitleri, GPX4 aracılığı ile yağ asidi alkollerine dönüştürülür. Bununla birlikte, ferroptoz sırasında GPX4 enziminin inaktif olması nedeniyle bu dönüşüm engellenmiş olur. Birikmiş yağ asidi hidroperoksitleri, hücrelerde öldürücü etkisi olan demir aracılı Fenton reaksiyonları ile lipid peroksid radikallerine katalize edilir [26].



Şekil 2-7.Ferroptoz mekanizması

Ferroptoz, sistem Xc⁻ erastin ile inhibisyonu ya da GPX4 aktivitesinin RSL3 ile doğrudan inhibe edilmesi ile başlayıp hücre ölümü ile sonlanır. Lipid ROS ferroptotik ölüm sürecinden sorumludur. Hücre membranında bulunan PUFA peroksidasyonu ferroptoz yolağında önemli bir role sahipken diğer yandan, hücre içinde biriken aşırı demir de lipid ROS birikmesinde ve sonuç olarak ferroptoz mekanizmasının temelidir [26].

2.2.2. Ferroptoz Mekanizmasında Bulunan Aktivatör ve İnhibitörler

Ferroptoz aktivatörlerinin tanımlanması 2003 yılında ferroptozun keşfinden önce olmuştur. İlk tanımlanan ferroptotik madde ise erastindir [38, 67]. Erastin ile imidazol keton erastin (IKE) ve piperazin erastin (PE) gibi daha güçlü analoglarının yanı sıra FDA onaylı ilaçlar olan sulfasalazin ve sorafenib, küçük molekürlü sınıf 1 ferroptoz indükleyicileridir (Tablo 2-2) [39].

Sınıf 2 ferroptoz indükleyicileri, GPX4'ün doğrudan inhibisyonu yoluyla etki eder. Bu sınıfta bulunan maddeler GPX4'ün nükleofilik aktif bölgesinde bulunan selenositle kovalent olarak etkileşime girer ve enzimatik aktivitesini inhibe eder. Buna bağlı olarak GPX4 lipid tamir fonksiyonu kaybeder ve öldürücü lipid peroksitlerin birikimi gerçekleşerek hücre ölümüne neden olur.

Ferroptoz indükleyici 56 (FIN56) ve kaspazdan bağımsız letal 56 (CIL56) bileşiklerini içeren sınıf 3 ferroptoz aktivatörleri, GPX4 proteininin ve aynı zamanda mitokondriyal elektron taşıma zincirinde iyi bilinen fonksiyonuna ek olarak endojen lipofilik antioksidan olan koenzim Q10'un (CoQ10) hücrede degrade olmasına neden olarak etki eder [39].

FINO2, hali hazırda bilinen tek sınıf 4 ferroptoz aktivatörüdür. FINO2 demiri oksitleyerek ve dolaylı olarak GPX4'ü etkisiz hale getirerek ferroptozu indükleyen bir endoperoksittir.

Tablo 2-2 Ferroptoz aktivatörleri

Ferroptoz mekanizmasını indükleyen maddeler tabloda gösterilmiştir [39].

Sınıf	Örnekler	Özellikleri	Ferroptoz Üzerindeki Etkisi
Sınıf 1	Erastin, PE, IKE, diğer erastin analogları, sulfasalazine, sorafenib, glutamat	Sistem Xc- inhibisyonu	Sistinin hücre içine alınmasını engeller, glutasyon oluşamaz ve GPX4 aktive olamaz
Sınıf 2	RSL3, ML162, DPI compounds 7, 10, 12, 13, 17, 18, 19	GPX4 aktivitesinin inhibisyonu	GPX4 ile etkileşime girerek enzimatik aktivitesini inhibe eder
Sınıf 3	FIN56 ve CIL56	GPX4 proteini ve CoQ ₁₀ degradasyonu	GPX4 proteinini hedef alır ve aynı zamanda SQS-mevalonate yolağı aracılığıyla CoQ ₁₀ degradasyonuna sebep olur
Sınıf 4	FINO2	Lipid peroksidasyonunu arttırması	Demirin oksidasyonunu sağlayarak lipid peroksidasyonuna neden olur, dolaylı olarak GPX4 aktivitesini inhibe eder

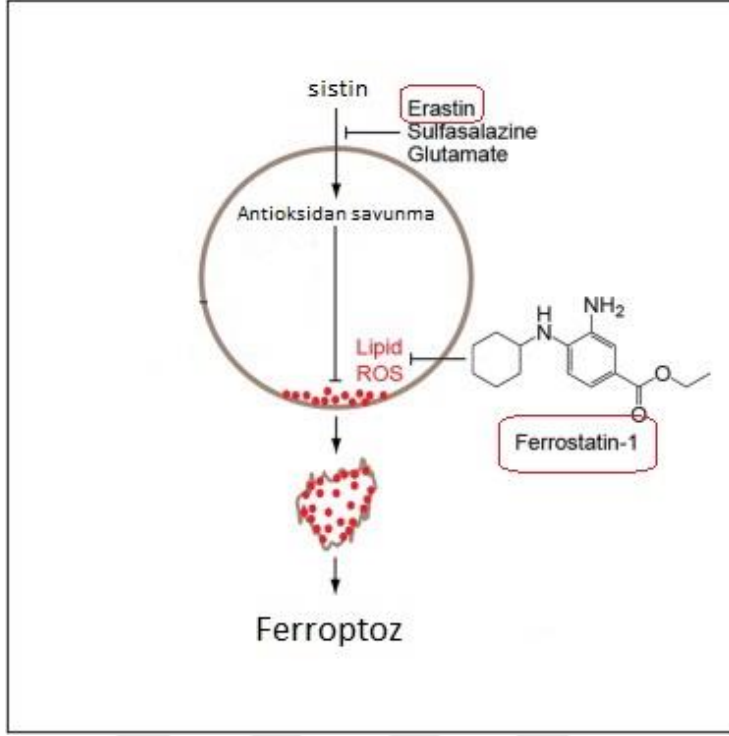
Yapılan çalışmalarda belirli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek çeşitli ferroptoz inhibitörleri tanımlanmıştır [31] (Tablo 2-3). Sınıf 1 inhibitörü olan demir şelatörleri, lipoksijenazları (LOX'ler) inhibe ederek lipid peroksidasyonunun başlamasını engellerken aynı zamanda Fenton reaksiyonunu baskılayarak lipid peroksidasyonunun yayılmasını önler. Diğer yandan sınıf 2 inhibitörü olan lipofilik antioksidanlar, etkilerini lipid peroksidasyonunu baskılamak için oluşan radikal bileşikler yakalayıp detoksifiye eden mekanizma yoluyla gösterirler.

Tablo 2-3. Ferroptoz inhibitörleri

Ferroptoz mekanizmasını inhibe eden maddeler tabloda gösterilmiştir [39].

Sınıf	Örnekler	Özellikleri	Ferroptoz Üzerine Etkisi
Sınıf 1	Deferoxamine, cyclipirox, deferiprone	Demir şelatörleri	Demiri tutar ve demirin lipid peroksidasyonuna neden olmasına engel olur
Sınıf 2	Vitamin E, BHT, Ferrostatin-1, liproxstatin-1, XJB-5-131, CoQ10	Lipofilik antioksidanlar	Lipid peroksidasyonunu önler
Sınıf 3	D4-arachidonik asit, D10-docosahexaenoik asit	Döteryumlanmış çoklu doymamış yağ asitleri (Deuterated-PUFA)	Lipid peroksidasyonunun başlamasına ve yayılmasına engel olur
Sınıf 4	CDC, baicalein, PD-146176, AA-861, zileuton	LOX inhibitörleri	LOX inhibisyonuna neden olur ve LOX tarafından lipid peroksidasyonunun uyarılmasını önler

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere aktivatör olarak erastin, inhibitör olarak ferrostatin-1 seçilmiştir. Ferroptoz mekanizmasında nerede etkili oldukları Şekil 2-8’de verilmiştir.



Şekil 2-8. Ferroptozda seçilen aktivatör ve inhibitör

Ferroptoz aktivatörü olarak seçilen erastin sistin sistem xc-’yi inhibe eder ve hücre içine sistin alınmasını engeller. Hücre içinde antioksidan görevi yapan GPX4 oluşamaz ve hücre, biriken lipid peroksidlere (Lipid ROS) karşı savunmasız kalır. Ferroptoz inhibitörü olan ferrostatin-1 oluşan lipid peroksidleri yakalayıp detoksifiye eder. Hücreyi lipid peroksidasyonundan koruyarak ölüme gitmesini engeller [31].

2.2.3. Ferroptoz ile İlişkili Genler

Bugüne kadar ferroptozu düzenleyen ya da ferroptoz belirteci olarak kabul edilen çok sayıda gen tanımlanmıştır ve bu genlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Ferroptoz ile ilişkili genlerden bazıları Tablo 2-4’te özetlenmiştir.

Tablo 2-4 . Ferroptoz ile İlişkili Genler

Gen	Adı	İşlevi
<i>ACSL4</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	Serbest yağ asitlerini açıl-coA esterlerine dönüştürür. Lipid biyosentezinde kilit rol oynar. Ferroptoz için gereklidir.
<i>ALOX</i>	Lipoxygenases	Ferroptozda çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda rol oynar
<i>CISD1</i>	CDGSH iron sulfur domain 1	Mitokondriyal demir havuzunu düzenler
<i>DPP4</i>	Dipeptidyl-dipeptidase-4	Lipid peroksidasyonunu indükler
<i>GCLC/GCLM</i>	Glutamate-cysteine ligase	Glutasyon biyosentezinde görevlidir
<i>GLS2</i>	Glutaminase 2	Glutaminin parçalanması ve ferroptoz için gereklidir
<i>GPX4</i>	Glutathione peroxidase 4	Ferroptozu baskılamak için membran fosfolipid hidroperoksitlerini azaltır
<i>GSS</i>	Glutathione synthetase	Glutasyon biyosentezinde görevlidir
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2	Prostoglandin biyosentezinde görevlidir ve GPX4 inhibitörleri tarafından indüklenir
<i>SAT1</i>	Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1	Lipid peroksidasyonunu indükler
<i>SLC7A11</i>	Solute carrier family 7 member 11	Sistem Xc-‘yi oluşturun alt birimlerden birini oluşturur, hücre içine sistin alınmasında görevlidir.
<i>TFRC</i>	Transferrin receptor	Hücre içine demir alımını sağlar

Tez projesi kapsamında bu genler arasından hücre kültüründe ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları incelemek üzere *ACSL4*, *GPX4*, *HMOX-1* ve *SLC7A11* genleri seçilmiştir.

2.2.4. Ferroptoz ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi

AH beyinlerinde artmış enflamasyon ve dejenerasyon süreci yalnızca apoptotik hücre ölümü ile açıklanamamaktadır. Bu durum, alternatif bir hücre ölüm mekanizmasının söz konusu olabileceğini düşündürmektedir [40, 41, 1]. Ferroptozda kilit rol oynayan lipid peroksidasyonunun AH patolojisinde erken bir olay olarak kabul edilmesi nöron ölümlerinin ferroptozla bağlantısını arttırmaktadır [42].

Alzheimer Hastalığı'nda beyinin çeşitli bölgelerinde demirin biriktiği bilinmektedir. Ancak bu demirin nörodejeneratif sürece ve nöron ölümüne nasıl dahil olduğu belirsizliğini korumaktadır. Son yapılan çalışmalar ferroptozun AH'de muhtemel bir ölüm mekanizması olduğunu düşündürmektedir [40, 26].

Deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada, ferroptozda kilit rolü olan *GPX4* geni nöron hücrelerinde inaktive edildiği zaman, 12 haftalık farelerde hipokampal nörodejenerasyon saptanması ferroptozun nöron ölümlerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, farelerde nörodejenerasyona ek olarak ferroptozun diğer bir özelliği olan artmış lipid peroksidasyonu da görülmüştür. Aynı deneyde farelerin güçlü bir antioksidan görevi göstererek ferroptozun inhibisyonunu sağlayan E vitamininden eksik beslendiği durumda, hipokampal nörodejenerasyon ve davranış bozukluğu oranının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar nöronlarının, özellikle *GPX4* aktivitesi kaybında ferroptozu duyarlı olduğunu, ayrıca ferroptozun AH'de önemli bir nörodejeneratif mekanizma olabileceğini öne sürmektedir [40, 26, 43].

Ayrıca Alzheimer hastalığında görülen bilişsel işlevdeki azalma ile birlikte, frontal korteks ve hipokampusta Ferroptoz mekanizmasında lipid peroksidasyonlarının detoksifiye edilmesinden sorumlu olan glutatyon seviyesinin azalması da eşlik etmektedir. Bütün bu veriler birlikte ele alındığında AH'de ferroptozun önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir [44].

2.2.5. Aday Genler

Bu tez projesi kapsamında AH ile ilgili *BNIP3L*, *RAD21* ve *TM2D1* genleri ekspresyon analizi için seçilirken ferroptoz ile ilgili *ACSL4*, *SLC7A11*, *GPX4* ve *HMOX-1* genleri seçilmiştir.

BCL2 Interacting Protein 3 Like (BNIP3L) geni, 8.kromozomda (8p21.2) yer alır. *NIX* olarak da bilinir. *BNIP3L*, BH3 domeinine sahip Bcl-2 ailesinde yer alan proapoptotik proteinlerle etkileşime girebilen bir proteini kodlar. BH3 domeinine sahip bir diğer gen ise *BCL2 Interacting Protein 3 (BNIP3)*'tür. Bu proteinler hücre stresin ardından mitokondrinin dış zarında lokalize olan kararlı kompleksleri oluşturur. Bu da, apoptotik veya apoptotik olmayan hücre ölümünü destekler [45]. Ayrıca Alzheimer hastalığında nöronal hücre ölümünde de rol oynadığı belirtilmiştir. Alzheimer hastalığında amiloid β -plak birikiminin, nöron ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada kültüre edilmiş sıçan kortikal nöronlarının β -amiloid ile muamelesi sonucunda, *BNIP3* ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür. *BNIP3* geninin susturulması ise, amiloid kaynaklı hücre ölümünü inhibe etmiştir. Bu durum, *BNIP3*'ün AH'de nöronal hücre ölümündeki rolüne işaret etmektedir [46]. *BNIP3L*'nin rolü ise bu hastalıklarda bilinmemektedir ve gelecekteki araştırmaların odak noktası olmalıdır. Ayrıca hem *BNIP3* hem de *BNIP3L*'nin, makrofaj hücre ölümünde bir rol oynadığı gösterilmiştir [47]. Yapılan başka bir çalışmada ise *BNIP3L* geninin mitofajiyi indükleyerek Parkinson Hastalığı'nda rol oynadığını göstermiştir [34, 48].

RAD21 Cohesin Complex Component (RAD21) geni, 8.kromozomda (8q24.11) yer alır ve aynı zamanda *SCC1* olarak da bilinir. *RAD21*, mitoz bölünmenin S fazında DNA replikasyonundan sonra kohezin kompleksi oluşturarak kardeş kromatidlerin uygun bir şekilde ayrılmasından sorumludur [49]. Kohezin kompleksinin aynı zamanda kutuplarda iğ iplikçiklerinin oluşmasında da rol oynadığı düşünülmektedir [50].

TM2 Domain Containing 1 (TM2D1) geni, 1.kromozomda (1p31.3) lokalize olmuştur ve *BBP* olarak da bilinir. Bu gen tarafından kodlanan *TM2D1* proteini, β -amiloid peptidi bağlayıcı bir proteindir. *TM2D1*, bir hücre yüzeyi reseptörü olan APP (amiloid prekürsör proteini) ile etkileşime girer [51]. *TM2D1* alt tipinin *in vitro* koşulda insan β -amiloid peptidine yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanır. Yapılan bir çalışmada hücre kültüründe *TM2D1* ekspresyonunun, β -amiloid peptid toksisitesini arttırdığı görülmüştür [52].

Acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), X kromozomunda (Xq23) yer alır ve 17 ekzondan oluşmaktadır. ACSL ailesinin beş üyesinden biri olan ACSL4, karaciğer lipid metabolizmasında görev alır. ACSL ailesi uzun zincirli yağ asitlerinden yağ açıl-CoA oluşumunu gerçekleştirir. Bu metabolik olay yağ asitlerinin hücre içinde kullanabilmesi için önemlidir [53]. ACSL4, hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezi için önemlidir. Hücre için ACSL4 proteininin kaybı membranda bulunan lipidlerin ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu için gerekli olan substratın azalması sağlayarak hücreyi ferroptozla karşı dirençli hale getirir [3, 71].

Glutathione peroxidase 4 (GPX4), glutatyon peroksidaz ailesinin sekiz üyesinden birisi olup 19.kromozomda (19p13.3) yer almaktadır. Hidrojen peroksit, organik hidroperoksitlerin ve lipid hidroperoksitlerin detoksifiye edilmesini sağlar ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GPX4, esterleştirilmiş okside yağ asitlerini ve kolesterol hidroperoksitlerini azaltabilen tek enzim olduğu için GPX izoformları arasında benzersizdir. Membran lipid peroksidasyonunu önleyerek hücreleri oksidatif hasara bağlı hücre ölümünden korur [54]. Ferroptozu baskılamak için membran fosfolipid hidroperoksitlerini azaltır.

Solute Carrier Family 7 Member 11 (SLC7A11), 4.kromozomda (4q28.3) bulunan ferroptoz mekanizmasında önemli sistein ve glutamat için oldukça spesifik olan heteromerik, sodyumdan bağımsız, anyonik bir amino asit taşıma sistemi olan sistem Xc-'nin bir üyesini kodlar. Bu sistemde sistein hücre içine alınarak glutamat hücre dışına atılır. Sistein hücre içinde sistine dönüşür. Daha sonra glutamik asit ve glisin ile birleşerek glutatyon tripeptidini oluşturur. Glutatyon hücre içinde antioksidan görevi görmektedir ve oluşan lipid peroksidasyonların detoksifikasyonundan sorumludur [55].

Heme oxygenase 1 (HMOX-1) ise 22.kromozomda (22q12.3) bulunur. Hemoglobin yapısında bulunan serbest hem bileşiğini, karbon monoksit, demir ve billuribine çevirir. Hücre içi demiri arttırdığı için ferroptozda etkili bir gen olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda erastin eklenen koşulda ekspresyonun arttığı ve aşırı eksprese edildiği durumlarda ferroptozun hızlandığı gösterilmiştir [56]. Kritik hastalıklarla ilişkili çeşitli uyaranlarla indüklenen önemli bir anti-enflamatuar enzimdir. İnsanlarda eksikliği, özellikle endotel hücrelerini ve retiküloendotel sistemini etkiler ve büyük ölçüde azaltılmış yaşam beklentisi ile sonuçlanır [57]. HMOX-1 ayrıca hücre strese girdiği zaman antioksidan görevi yapmaktadır [58].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında ferroptoz modeli oluşturmak için uygun HEPG2 (ATCC® HB-8065™) hücre hattı kullanılmıştır. Seçilen hücre hattının özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

3.1.1.1. HEPG2 hücre hattı

HEPG2 hücreleri, hepatosellüler kanserine sahip 15 yaşındaki Kafkas erkek hastadan elde edilen karaciğer hücrelerine ait bir hücre hattıdır. Işık mikroskobu ile küçük, köşeli ve çoğunlukla birbirlerine tutunmuş halde görünür. Hücrelerin yaklaşık iki katına çıkma süresi 48 saattir. HEPG2 hücre hattı adhesive özelliğe sahiptir. Hücre hattı Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) içinde %10'luk fetal sıgır serumu (FBS) ve %1'lik antibiyotik bulunan solüsyonda %5 CO₂ ve 37°C ortam şartlarında kültüre edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3-1'de listelenmiştir.

Tablo 3-1 : Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası	Katalog Numarası
Antibiyotik-Antimiyotik	İnvitrogen	15240062
Dimethyl Sulfoksit (DMSO)	Sigma	472301
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Wisent Inc.	320-012-CL
Phosphate Buffered Saline 1X without/Calcium&Magnesium (PBS 1X)	Wisent Inc.	311-010-CL
Fetal Bovine Serum Advanced Heat	Capricorn Scientific	FBS-HI-11B

Inactivated (FBS)		
Trypsin-EDTA	Wisent Inc.	325-542-EL
Hank's Balanced Salt Solution 1X (HBSS)	Wisent Inc.	311-511-CL
Erastin	Sigma	E7781-5MG
Ferostatin-1	Sigma	SML0583-5MG
BODIPY™ 581/591 C11 (Lipid Peroxidation Sensor)	Thermo Scientific™	D3861
Etanol	Merck	1.00983.2511
İzopropanol	Sigma	24137-2.5L-R
Kloroform	Sigma	24216-2.5L-R
Trypan Blue	Beckman Coulter Inc.	383260

3.1.3. Kullanılan Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kitler Tablo 3-2'de listelenmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan kitler

Kit Adı	Markası	Katalog Numarası
iScript cDNA Sentez Kiti	Biorad	170-8891
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche	04 707 516 001
Vi-Cell Single Pak Hücre Sayım Kiti	Beckman Coulter Inc.	383260
High Pure RNA İzolasyon Kiti	Roche	11828665001

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3-3’de listelenmiştir.

Tablo 3-3 : Kullanılan cihazlar

Cihaz	Markası
Buzdolabı	-80°C Thermo, -20°C Uğur, +4°C Sanyo
Etüv	Thermo Scientific™
Buz Makinası	Cornelius
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific™
Nanodrop	Thermo Scientific™
Masaüstü Santrifüj	Thermo Scientific™
İnkübatör	Thermo Scientific™
LightCycler 480	Roche
PCR Cihazı	BioRAD
Laminer Akış Kabini	Thermo Scientific™
Distile Su Cihazı	Millipore
Otomatik Pipetler	Eppendorf
BD FACSCalibur™ Akış Sitometri Cihazı	BD Biosciences

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

3.1.5.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Kültür Medyumu

450 ml Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) içine ısı inaktivasyonu yapılmış 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) ve 5 ml Antibiyotik-Antimiyotik (100x) eklendi. Final FBS konsantrasyonu %10 olurken antibiyotik-antimiyotik konsantrasyonu %1 olarak ayarlandı.

Phosphate Buffered Saline (PBS) Solüsyonu

Ticari olarak satın alınan kullanıma hazır, steril solüsyon kullanıldı. Mg^{+2} ve Ca^{+2} içermeyen PBS solüsyonu hücrelerin sayılması ve pasajlanması aşamasında hücreleri yıkama amacıyla kullanıldı.

HEPG2 Dondurma Medyumu

Hücrelerin dondurulması için iki farklı medyum hazırlandı. İlk dondurma medyumunun içeriğinde %60 EMEM ve %40 FBS olurken ikinci dondurma medyumunun içeriğinde %40 EMEM, %40 FBS ve %20 DMSO bulunmaktadır.

Erastin ve Ferrostatin İçeren Kültür Medyumu

Moleküler ağırlığı 547,04 olan 5 mg Erastin, 10mM olacak şekilde 914µL DMSO ile çözüldü. Moleküler ağırlığı 262,35 olan 5 mg Ferrostatin-1, 10mM olacak şekilde 1905µL DMSO ile çözüldü. Final konsantrasyonu 35µM olacak şekilde erastin ve konsantrasyonu 2,5µM olacak şekilde ferrostatin-1 içeren EMEM kültür medyumu hazırlandı.

ROS Ölçümü İçin Kullanılan Solüsyon

Moleküler ağırlığı 504,4255 olan 1 mg C11 BODIPY 581/591, 1 mM olması için 1982,5 µL DMSO ile çözüldü. Final konsantrasyonu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) içinde 2,5 µM olacak şekilde C11 BODIPY 581/591 floresan boyası içeren solüsyon hazırlandı.

3.1.6. Hasta ve kontrol grubu

Daha önce çalışma grubumuz tarafından yürütülen TÜBİTAK 1001 projesi (214S340) kapsamında toplanan 25 Alzheimer hastası ve 21 kontrol bu tez projesine dahil edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. HEPG2 Hücre Kültürü

Hücre kültürü deneylerinde sıvı azotta bekletilen hücreler çözöldükten sonra morfolojileri, yoğunlukları ve kontaminasyon açısından her gün kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu %70'e ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Fazla hücreler daha sonra tekrar kullanılmak üzere dondurularak sıvı azotta saklanması sağlandı. Ferroptoz koşulu oluşturmak için hücreler erastin ve ferrostatin-1 ile muamele edildi.

Hücrelerin Çözölmesi

Hücreler buz üzerinde sıvı azottan çıkartıldıktan sonra 37°C su banyosunda 5 dakika bekletildi. Çözölen hücreler 15 mL'lik falkona alındı ve üzerine damla damla 8 mL kültür medyumu eklendi ve bolca pipetaj yapıldı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant atılıp taze 2 mL kültür medyumu eklendi ve bolca pipetaj yapılarak hücreler çözöndü. Elde edilen hücreler 8 mL %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren EMEM kültür medyumu ile T-25'lik flaska ekilip %5 CO₂ ve 37°C şartlarında inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin Takibi

Hücreler yoğunluk, morfoloji ve olası bir kontaminasyon açısından her gün ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Kültür medyumu haftada iki kez tazelendi. Bu işlem flask içerisindeki kültür medyumunun çekilip, aynı miktarda taze kültür medyumunun flask içerisine verilmesiyle gerçekleştirildi.

Hücrelerin Pasajlanması

Flask içerisinde hücrelerin yoğunluğu %70'e ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Hücrelerin üzerindeki eski kültür medyumu çekilip atıldı. 2 mL 1X PBS ile hücreler yıkandı ve PBS atıldı. Flask içerisindeki kültür medyumunun tamamen temizlenmesi için bu işlem tekrarlandı. T-25'lik flask için 1,5 mL Tripsin-EDTA solüsyonu hücrelerin üzerine damla damla eklendi. 37°C inkübatörde yaklaşık 8 dakika bırakıldı. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı ışık mikroskobunda kontrol edilip doğrulanmasının ardından tripsini inaktive etmek için 3 mL kültür medyumu eklendi. Hücreler 15 mL'lik falkona alınıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjü takiben eski medyum yavaşça çekilip atıldı ve 2 mL taze kültür medyumu yavaşça falkona eklendi. Bolca yapılan pipetajdan sonra içinden 100 µL alınıp 900 µL PBS ile

dilüe edilip hücre sayımı için hazırlandı. Hücrelerin sayımı *The Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer* cihazı ile yapıldı. Yoğunluğa göre hücrelerin ekimi 1:2 veya 1:3 oranında yapıldı. Fazla kalan hücreler dondurulmak üzere ayrıldı.

Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere hücreler donduruldu. Bunun için hücreler kaldırılıp gerekli miktarda ekimi yapıldıktan sonra kalan hücreler tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. İki farklı dondurma medyumunu hazırlandı. İlk medyumun içeriği %60 EMEM ve %40 FBS olurken ikinci medyumun içeriği %40 EMEM, %40 FBS ve %20 DMSO'dan oluşmaktadır. Santrifüj sonrası eski medyum atıldı. Birinci dondurma medyumunu damla damla hücrelerin üzerine eklendi ve arada pipetaj yapıldı. Bittikten sonra ikinci dondurma medyumunu da aynı şekilde damla damla hücrelerin üzerine pipetajla eklendi. Hücreler 2 mL'lik kriyotüplere alınarak önceden -20°C'de bekletilen izopropanollü dondurma kabına konuldu ve gece boyunca -80°C'de bekletildi. Bir sonraki gün -80°C'den alınarak sıvı azota kaldırıldı.

Erastin Uygulaması

Çalışmada HEPG2 hücre hattı ile ferroptoz indükleyici madde olan erastin ve ferroptoz inhibitörü olan ferrostatin-1 kullanıldı. 24 saat öncesinden 12-kuyulu kültür plate'lerine 50.000 hücre ekildi ve hücrelerin yapışması sağladı. Öncelikle literatüre göre seçilen 10µM, 15µM, 20 µM, 25µM, 35µM erastin ile konsantrasyon denemeleri yapıldı. Ferrostatin-1 için ise 2µM ve 2,5µM deneme konsantrasyonları olarak seçildi. Daha sonra erastin ve ferrostatin belirlenen konsantrasyonlarda kültür ortamına eklendi. Her konsantrasyon triplicate olarak çalışıldı. Bütün koşullar için inkübasyon süresi 24 saat olarak sabitlendi. Çalışma tasarımı Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

Tablo 3-4 : Ferroptoz çalışma tasarımı

Kimyasal	Erastin	Erastin+Ferrostatin-1	Negatif
Doz	35 µM	35 µM Erastin + 2,5 µM Ferrostatin-1	Madde uygulanmamış HEPG2 hücresi
Zaman	24 saat	24 saat	24 saat

24 saat inkübasyonun ardından hücreler kaldırıldı ve canlılık için hemositometre yardımıyla sayıldı ve 3.2.2.1’de anlatıldığı gibi hücrelerin RNA izolasyonu yapıldı.

Hemositometre ile Hücre Sayımı

Hücre ölümünün gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak amacı ile hemositometre ile hücre sayımı yapılarak hücre sayısındaki değişim gözlemlendi. Tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılan hücreler santrifüj edilip 200 µL taze medyumla çözüldükten sonra 10 µL alınarak 0,2 mL’lik tüpe alındı. Yine aynı miktarda 10 µL tripan mavisiyle iyice karıştırıldı. Karışım içerisinden tekrar 10 µL çekilerek lamel ile kapatılan hemositometre içersine yayıldı. Işık mikroskobu altında 10X objektifle hücreler sayıldı.

(Dilüsyon faktörü x 4 kare içerisinde sayılan toplam hücre sayısı x 10000)/4 formülü kullanılarak elde edilen toplam hücre sayısı hesaplandı.

3.2.2. Akım Sitometri Deneyleri

Hücre içinde bir ferroptoz belirteci olan lipid peroksidasyonunu ölçmek için akım sitometri deneyleri yapıldı. Yapay lipid gibi davranarak hücre içine giren BODIPY 581/591 yıkıma uğradığı zaman floresan özelliği nedeniyle ışıma vermektedir. Akım sitometri cihazı bu ışımaların miktarını ölçerek hücrede gerçekleşen lipid peroksidasyon durumunun belirlemektedir. Çalışmada HEPG2 hücre hattı ile ferroptoz indükleyici madde olan 25µM ve 35µM erastin ile 2µM ve 2,5µM ferroptoz inhibitörü olan ferrostatin-1 ve floresan boya olan C11 BODIPY 581/591 kullanıldı. 24 saat öncesinden 6-kuyulu kültür plate’lerine 150.000 hücre ekildi ve hücrelerin yapışması sağladı. 20 saat %5 CO₂ 37 °C ortamında inkübasyonun ardından hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldı. Santrifüj sonrasında üst sıvı atıldı ve hücreler 500 µL HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile çözüldü. Örnekler akım sitometri için kullanılan 5 mL’lik polistiren tüplere alındı. Tekrar 1500 rpm hızda 6 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı. Her bir koşula daha önceden ROS ölçümü için hazırlanan 2,5 µM C11 BODIPY 581/591 floresan boyası içeren HBSS solüsyonundan 390 µL eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra örnekler alındı ve BD FACSCalibur™ akım sitometri cihazına götürülerek 488 nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı.

3.2.3. Seçilen Hedef Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Hedef genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi için hücre kültüründe erastin ve ferrostatin ile inkübe edilen hücrelerden önce *High Pure RNA Isolation Kit (Roche)* ile total RNA izolasyonu yapılmış kalite ve miktar tayini yapıldıktan sonra *iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)* ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar ile kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (qPZR) deneylerine geçilmiştir. Çıkan sonuçlar ile istatistiksel analiz yapılmıştır.

3.2.3.1. RNA İzolasyonu

HEPG2 hücreleri tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırıldıktan sonra total RNA izolasyonu *High Pure RNA Isolation Kit (Roche)* ile yapıldı. Kitin çalışma protokolü aşağıdaki gibidir:

- 1- Hücreler 200 µL 1X PBS içerisinde çözüldü.
- 2- Üzerlerine 400 µL parçalama solüsyonu eklendi ve 15 saniye vorteks yapıldı.
- 3- Örnekler kitin içerisinde bulunan filtreli kolonlara alındı. 8000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- 4- Daha sonra alt sıvı atıldı. DNaz uygulamasında her bir tüp için 90 µL DNaz inkübasyon buffer ve 10 µL DNazI karıştırılarak eklendi. 15 dakika enzimin etki etmesi beklendi.
- 5- 500 µL yıkama solüsyonu I eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 6- Altta toplanan sıvı atıldı ve 500 µL yıkama solüsyonu II eklendi. Aynı şekilde 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 7- Altta toplanan sıvı atıldı ve tekrar 200 µL yıkama solüsyonu II eklenerek en yüksek hızda 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 8- Filtreli kolon temiz 1,5 mL'lik eppendorf tüpe alınarak 30 µL elüsyon buffer eklendi ve 2 dakika beklendi.
- 9- 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek elde edilen RNA örnekleri kalite ve miktar tayini yapıldıktan sonra -80 °C'de saklanmak üzere kaldırıldı.

3.2.3.2. RNA Kalite ve Miktar Tayini

RNA örneklerinin kalite ve miktar tayini NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Cihaz 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yüklenen örneğin absorbansına göre ölçüm yapmaktadır. 1 µL yüklenen RNA örneğinin konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü. Kaliteli RNA örneği için 260 nm/280 nm oranı 1,9-2,0 olarak belirlendi.

3.2.3.3. cDNA Sentezi

Ferroptoz koşulu oluşturulmuş hücrelerden ve Alzheimer hastalarının periferik kanlarından elde edilen total RNA, *iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)* ile daha kararlı yapı olan cDNA'ya çevrildi. RNA örneklerinin son konsantrasyonu 30 ng olacak şekilde dH₂O ile sulandırıldı. Her bir RNA örneği için aşağıdaki gibi karışım hazırlandı.

RNA+dH ₂ O	:15 µL
5X iScript Reaksiyon Miksi	:4 µL
iScript Ters Transkriptaz	:1 µL
Toplam	:20 µL

Hazırlanan tüpler BioRAD T100™ Thermal Cyclers cihazında Tablo 3-5'de gösterilen programa uygun şekilde inkübe edilerek protokol sonlandırıldı.

Tablo 3-5 : cDNA sentez protokolü

	Sıcaklık	Süre
Primer Bağlanması	25°C	5 dakika
Ters Transkripsiyon	42°C	30 dakika
Ters Transkriptaz İnaktivasyonu	85°C	5 dakika
Soğutma	4°C	10 dakika

3.2.4. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Kantitatif PZR

Hedef genlerin anlatım düzeyleri SYBR Green I boyası kullanılarak qRT-PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilerin normalizasyonda referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Seçilen genlerin primer dizileri Tablo 3-6'da verilmiştir. qRT-PZR yöntemi her döngüde üretilen DNA miktarıyla beraber floresan sinyalinin artışının ölçülmesine dayanmaktadır. Floresan sinyalinin hesaplanabilmesi için gereken minimum döngü sayısına eşik döngüsü (C_t) adı verilir. Hedef genlerdeki ekspresyon düzeyinin rölatif olarak hesaplanması için Delta Delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metodu kullanıldı. Hedef genin C_t değerlerinden referans olarak seçilen genin C_t değeri çıkartılarak Delta C_t (ΔC_t) değeri elde edildi. ΔC_t değerlerinden çalışmada kullanılan ve elde edilen C_t değerlerinin normalizasyonunu sağlamak için bir kalibratör oluşturuldu. Bu kalibratör değeri elde edilen C_t değeri delta C_t (ΔC_t) değerinden çıkarılarak delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) değeri elde edildi. Kontrol ve hasta örneklerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında non-parametrik Mann-Whitney testi kullanıldı.

qPZR aşağıda verilen protokolle yapılmıştır.

Predenatürasyon 95°C 1 dakika

Denatürasyon	95°C 10 saniye	} 45 döngü
Bağlanma	65°C 20 saniye	
Uzama	72°C 10 saniye	

Çözülme Eğrisi 95°C 5 saniye

Analizi 65°C 1 dakika

97°C sürekli

Soğutma 40°C 20 saniye

Tablo 3-6. qRT-PZR’de kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Dizisi
<i>TM2D1</i>	F: 5’-ACTGTACAAACTACACAGCTCATGTTT-3’ R: 5’-CCAACTTCGTTCCCAGTAAAA-3’
<i>BNIP3L</i>	F: 5’-GATGCACAACATGAATCAGGA-3’ R: 5’-CCATCTTCTTGTGGCGAAG-3’
<i>GPX4</i>	F: 5’-TGCATCGTCACCAACGTGGC-3’ R: 5’-CTTCACCACGCAGCCGTTCT-3’
<i>SLC7A11</i>	F: 5’-TCTCCAAAGGAGGTTACCTGC-3’ R: 5’-AGACTCCCCTCAGTAAAGTGA-3’
<i>ACSL4</i>	F: 5’-CATCCCTGGAGCAGATACTCT-3’ R: 5’-TCACTTAGGATTTCCCTGGTCC-3’
<i>RAD21</i>	F: 5’-AGCCACTGCCTGACTTAGATG-3’ R: 5’-TGGTTATCTCTTCCACTCTACTCTGAT-3’
<i>HMOX-1</i>	F: 5’-GACTCCCGCAGTCAGGCAGA-3’ R: 5’-CGTGAGGGGCTCTGGTCCTT-3’
<i>GAPDH</i>	F: 5’-GATGCTGGTGCTGAGTATGT-3’ R: 5’-GAGATGATGACCCTTTTGGC-3’

4. BULGULAR

4.1. Hasta Grubunun Özelliklerinin Değerlendirilmesi

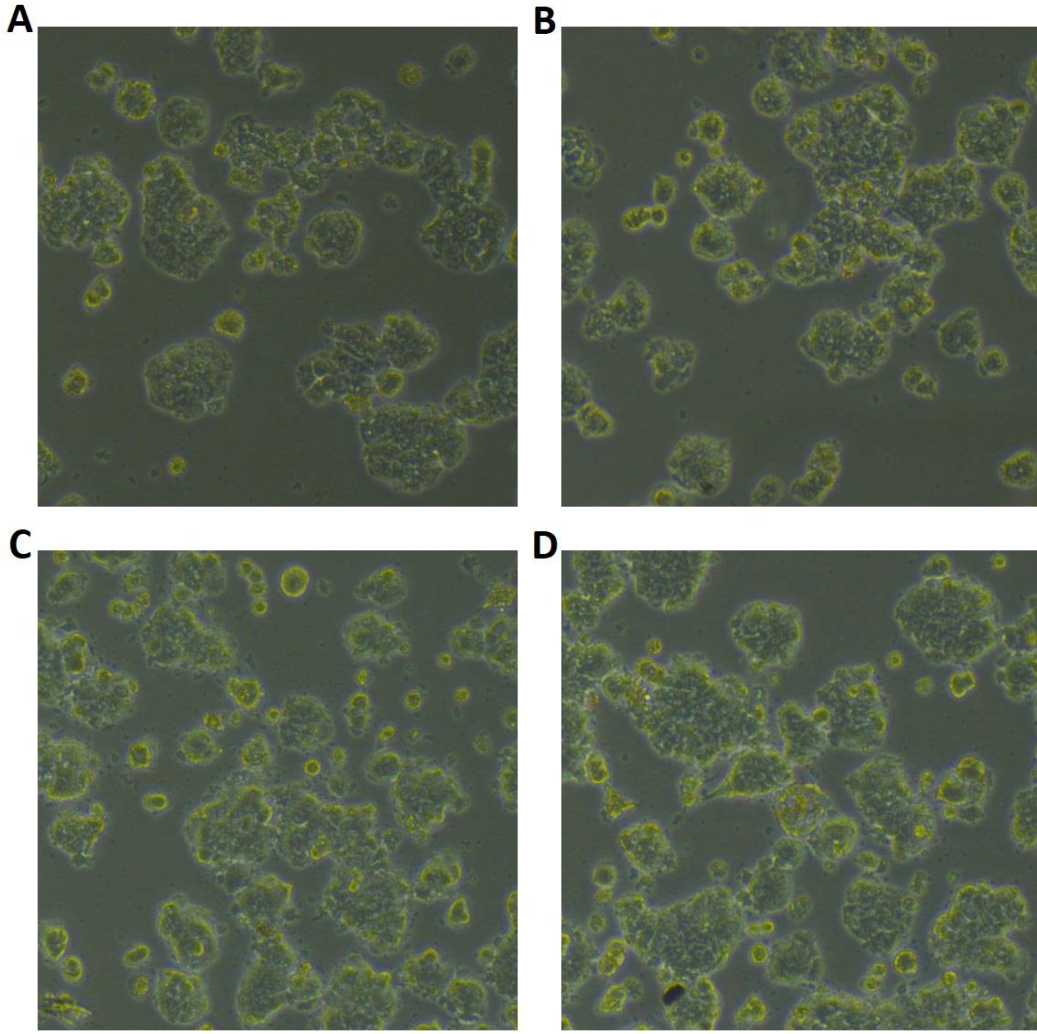
Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrollerin özellikleri Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri

ÖZELLİKLER	Gruplar	
	Alzheimer (n=25)	Kontrol (n=21)
Cinsiyet, N (%)		
Kadın	12 (%48)	9 (%42,8)
Erkek	13 (%52)	12 (%57,2)
Yaş (Ort.±SD)	76.8±5.18	72.53±6.18
Başlangıç Yaşı (Ort.±SD)	71.25±4.51	

4.2. HEPG2 Hücre Hattında Erastin ve Ferrostatin-1 Konsantrasyonlarının Optimizasyonu

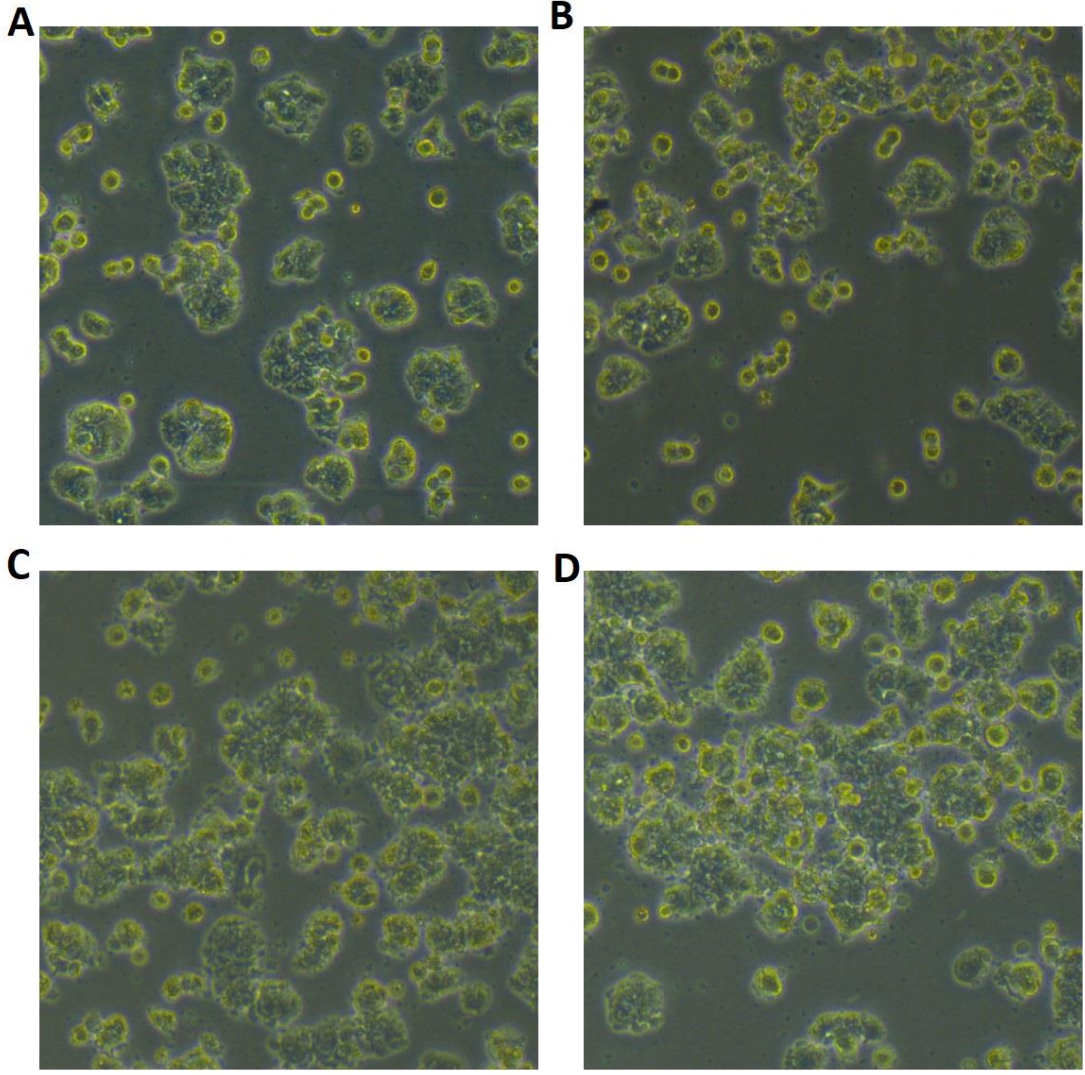
Ferroptozu uyaran en düşük optimum erastin konsantrasyonunu bulmak için 10µM, 15µM, 20µM ve 25µM konsantrasyonda denemeler gerçekleştirildi. (Şekil 4-1 / Şekil 4-2). Bunun sonucunda, negatif koşul %100 olarak kabul edildiğinde 10, 15, 20 ve 25 µM konsantrasyonlar için canlılık oranları sırası ile %70,54, %72,92, %68,45 ve %54,15 olarak hesaplandı (Şekil 4-3).



Şekil 4-1. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.

(A) 10µM Erastin, (B) 15µM Erastin, (C) 1µL DMSO ve (D) 1,5µL DMSO

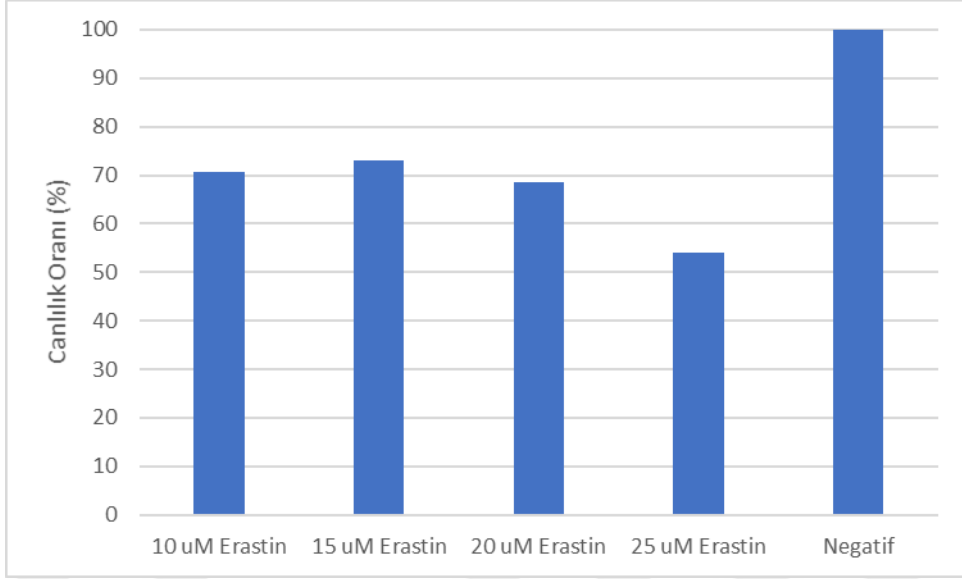
Belirtilen konsantrasyonda erastin ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü



Şekil 4-2. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.

(A) 20µM Erastin, (B) 25µM Erastin, (C) 2µL DMSO ve (D) 2,5µL DMSO

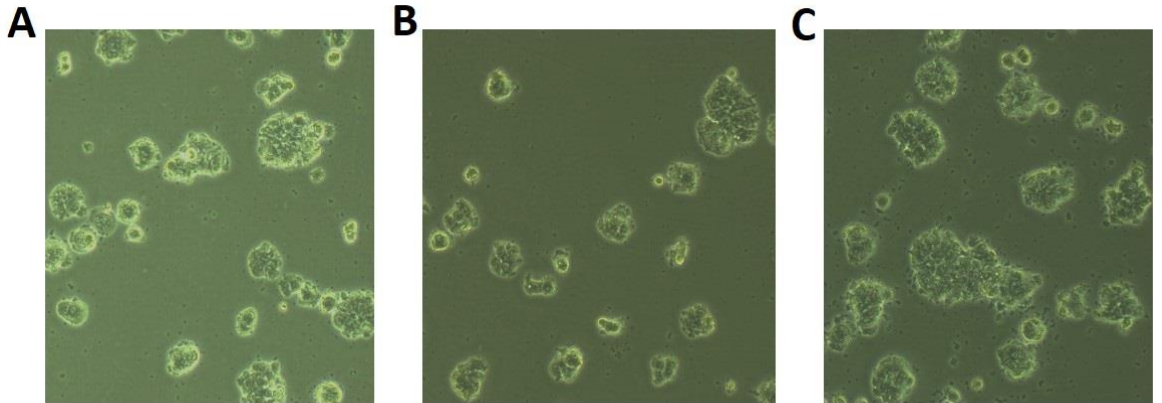
Belirtilen konsantrasyonda erastin ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü



Şekil 4-3. HEPG2 hücrelerinin 10, 15, 20 ve 25µM Erastin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması

10, 15, 20 ve 25 µM konsantrasyonlar için canlılık oranları sırası ile %70,54, %72,92, %68,45 ve %54,15 olarak hesaplandı.

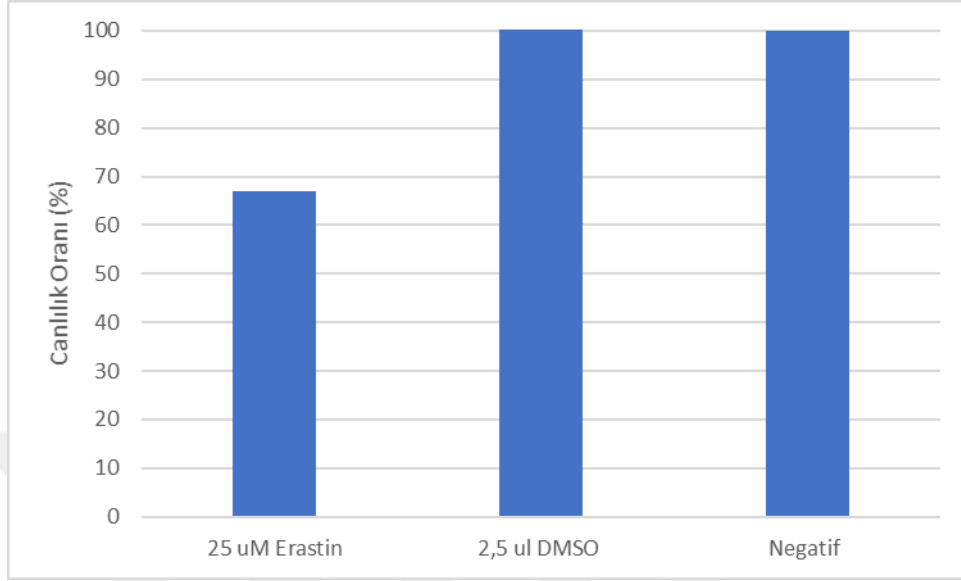
Bu sonuçlara göre optimum Erastin konsantrasyonu 25 µM olarak belirlendi ve deney tekrarlandı (Şekil 4-4). Canlılık oranı negatif koşul %100 kabul edilirse 25µM Erastin eklenen koşulda %66,84, 2,5µL DMSO koşulunda %107,25 olarak hesaplandı (Şekil4-5).



Şekil 4-4. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü

(A) 2.5µL DMSO, (B) 25µM Erastin ve (C) Negatif

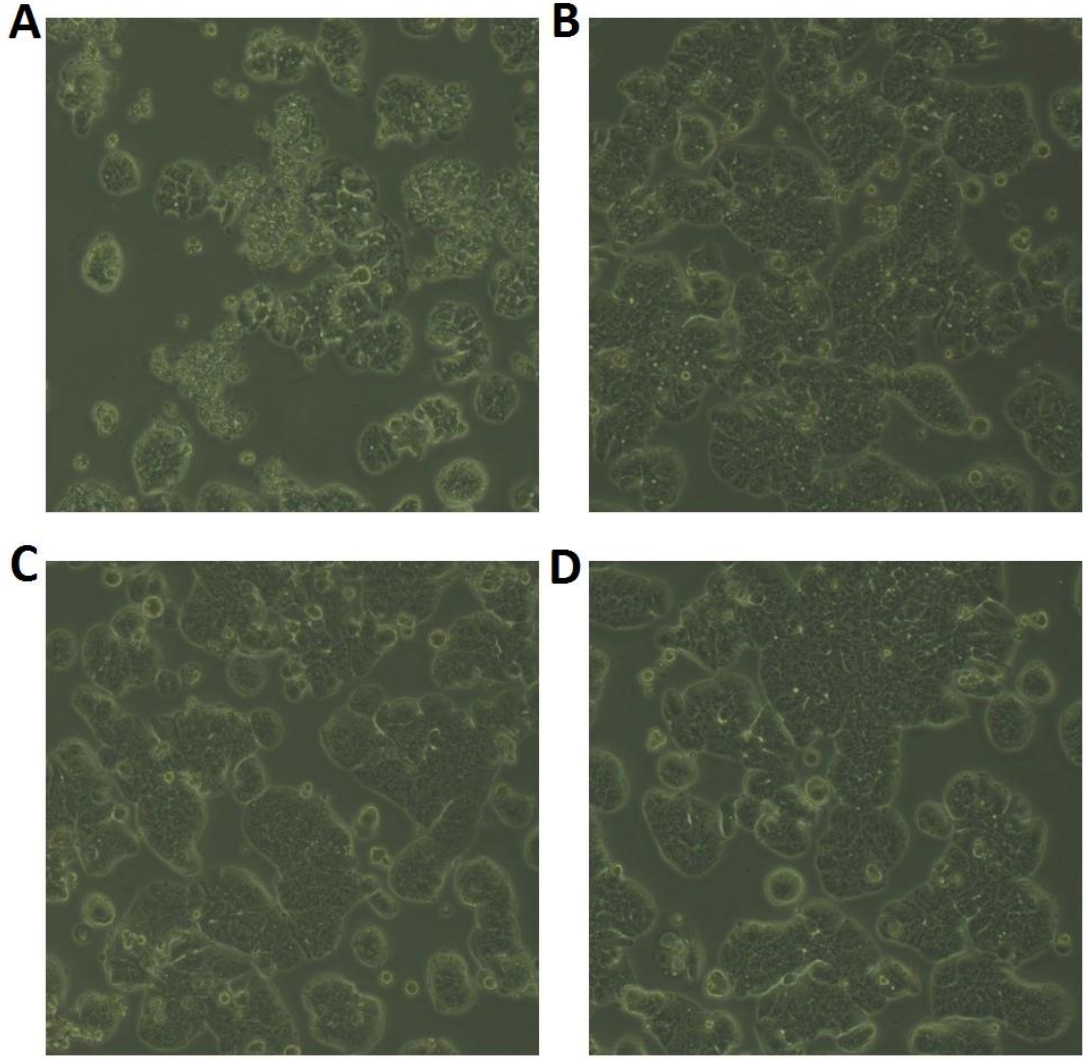
Belirtilen konsantrasyonda erastin ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü



Şekil 4-5. HEPG2 hücrelerinin 25µM Erastin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması

Canlılık oranı negatif koşul %100 kabul edilirse 25µM Erastin eklenen koşulda %66,84 olurken, 2,5µL DMSO koşulunda %107,25 olarak hesaplandı.

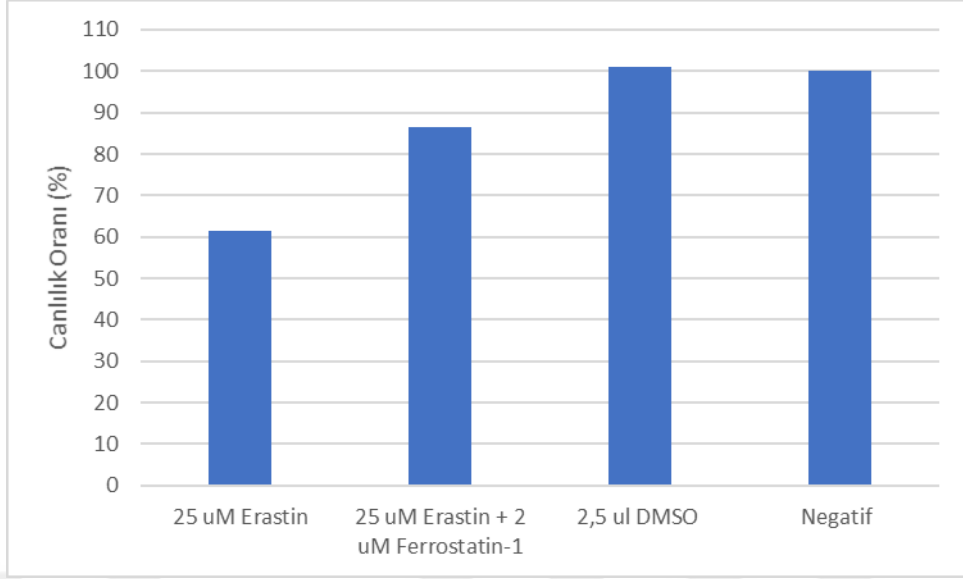
Optimum Erastin konsantrasyonunun belirlenmesi sonrasında inhibitör madde olan Ferrostatin-1 konsantrasyonunun belirlenmesine geçildi. Ferrostatin-1 için literatüre uygun olarak 2µM seçildi (Şekil 4-6). Canlılık oranı negatif koşul %100 kabul edilirse 25µM Erastin eklenen koşulda %61,48 olurken, 25µM Erastin+2µL Ferrostatin-1 eklenen koşulda %86,54 ve 2,5µL DMSO koşulunda %101,16 olarak hesaplandı (Şekil 4-7).



Şekil 4-6. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.

**(A) 25µM Erastin, (B) 25µM Erastin + 2µM Ferrostatin-1 eklenen (C) 2,5µL DMSO
(D) Negatif**

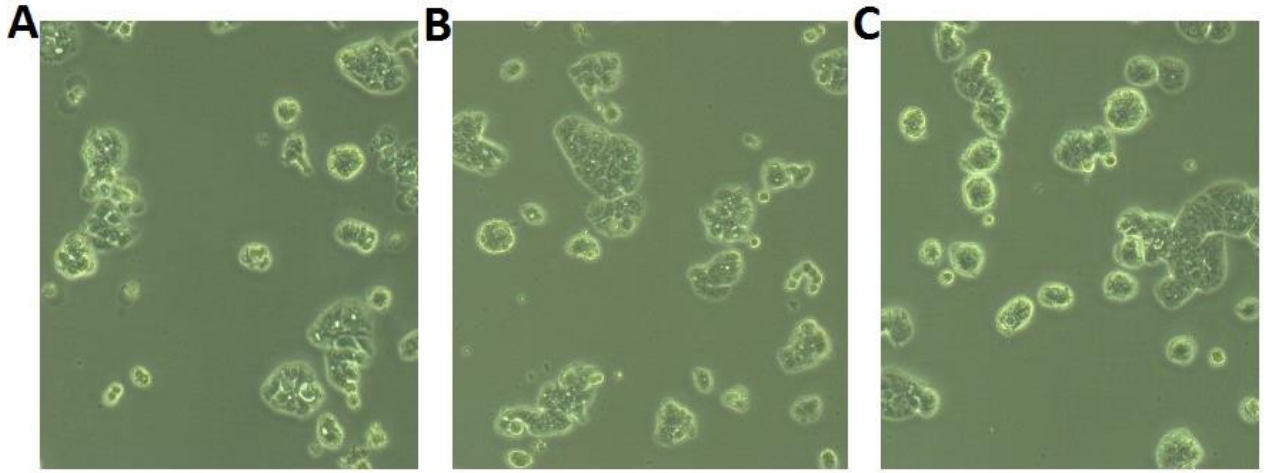
Belirtilen konsantrasyonda erastin, ferrostatin-1 ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü



Şekil 4-7. HEPG2 hücrelerinin 25µM Erastin ve 25µM Erastin +2 µM Ferrostatin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması.

Canlılık oranı negatif koşul %100 kabul edilirse 25µM Erastin eklenen koşulda %61,48 olurken, 25µM Erastin+2µL Ferrostatin-1 eklenen koşulda %86,54 ve 2,5µL DMSO koşulunda %101,16 olarak hesaplandı.

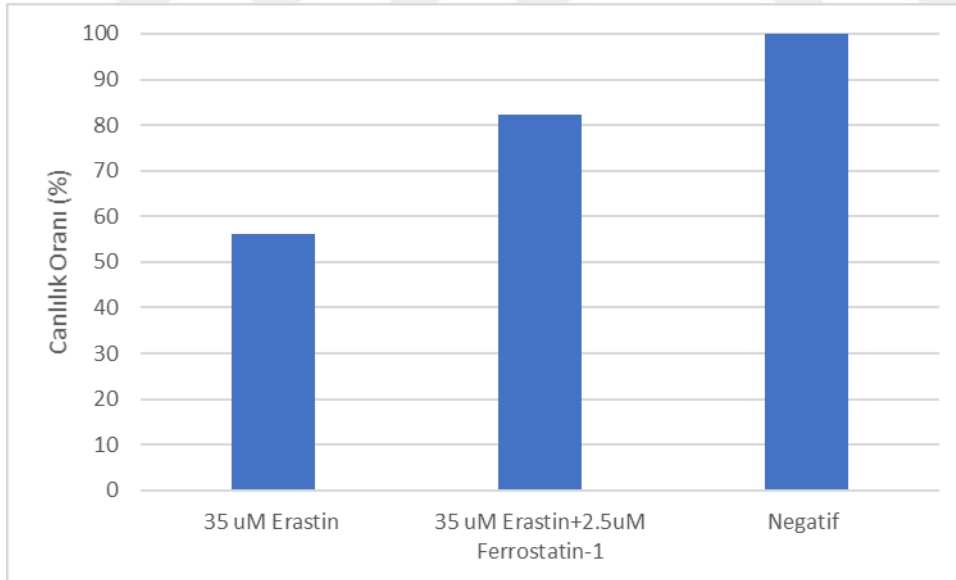
Daha sonra erastin konsantrasyonu arttırılarak 35µM ve ferrostatin-1 konsantrasyonu arttırılarak 2,5 µM olacak şekilde 6-kuyulu kültür plate'i kullanılarak tekrarlandı (Şekil 4-8). DMSO koşulunu aradan kaldırmak için Erastin maddesine kültür medyumu ile ara stok yapıldı. Toplam besiyerinde DMSO oranı ihmal edilebilecek düzeye getirildi. Canlılık oranı sadece negatif koşula göre hesaplandı (Şekil 4-9). Negatife göre canlılık oranı 35µM Erastin eklenen koşulda %56,27 olurken, 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 eklenen koşulda %82,15 olmuştur.



Şekil 4-8. HEPG2 hücrelerinin 10X objektiftteki mikroskopik görüntüsü.

(A) 35µM Erastin, (B) 35µM Erastin + 2,5 µM Ferrostatin-1 eklenen (C) Negatif

Belirtilen konsantrasyonda erastin, ferrostatin-1 ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

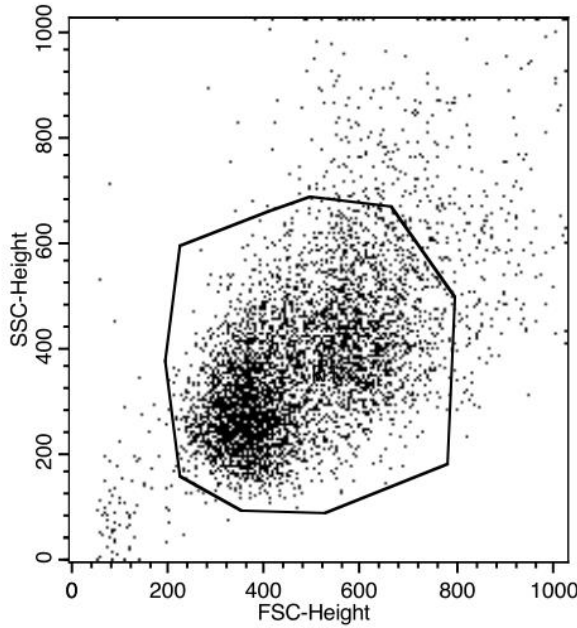


Şekil 4-9. HEPG2 hücrelerinin 35µM Erastin ve 35µM Erastin +2,5 µM Ferrostatin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması

Negatife göre canlılık oranı 35µM Erastin eklenen koşulda %56,27 olurken, 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 eklenen koşulda %82,15 olmuştur.

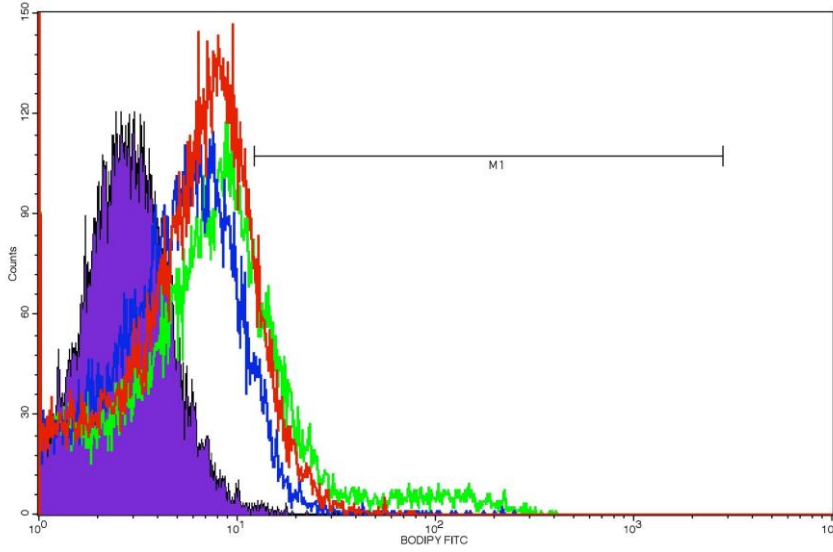
4.3. Akım Sitometri Deneyleri

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü İmmunoloji anabilim dalında bulunan BD FACSCalibur™ cihazı kullanılarak akım sitometri deneyleri gerçekleştirildi. Bütün örnekler 488 nm dalga boyunda C11 BODIPY 581/591 floresan boyası kullanılarak ölçüldü. İlk önce 25µM Erastin + 2µM Ferrostatin-1, 2,5µL DMSO ve negatif koşullarıyla ölçümler tamamlandı. Lipid peroksidasyon miktarının ölçüldüğü bu deneyde ferroptozun indüklendiği erastin koşulunda artış, inhibitör olan ferrostatin-1 eklendiğinde düşüş beklenmektedir. Örneklerin yaydığı floresan ışımaya göre koşullar arası anlamlı bir değişim görülmemiştir. 25 µM Erastin uygulanan hücrelerin akım sitometri cihazında dağılımı Şekil 4-10'da gösterilmiştir. Yapılan ölçümlere göre erastin koşulunda lipid peroksidasyonu negatife göre %5,43 artarken, erastin+ferrostatin-1 koşulunda %2,18 artmıştır. Lipid peroksidasyon oranlarında koşullar arası bir değişim olmamıştır (Şekil 4-11).



Şekil 4-10. Akım sitometride hücrelerin dağılımı

Şekildeki her nokta ölçümü yapılan bir hücreyi temsil etmektedir. Hücrelerin dağılımı boyutlarına göre değişir. Hücre yoğunluğunun tek bir yerde olması tek bir hücre hattı olduğu anlamına gelmektedir. Seçilen bölge akım sitometri analizi için gereken kapı almayı temsil etmektedir.

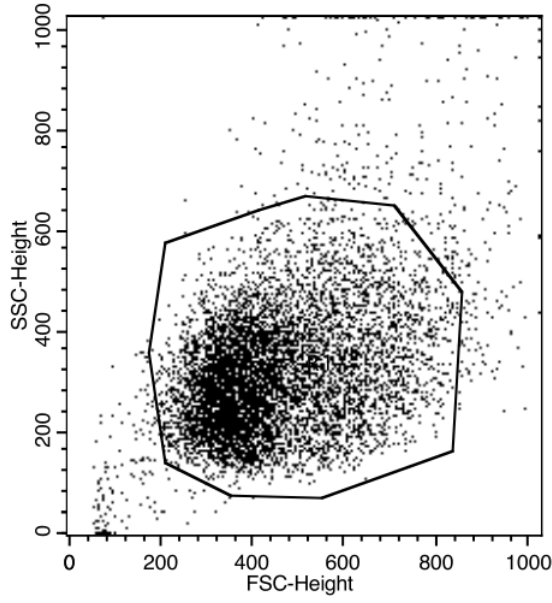


Şekil 4-11. Akım sitometri sonuçları

Mor – kontrol, yeşil- 25µM Erastin, mavi- 25µM Erastin+2µM Ferrostatin, kırmızı- 2,5µL DMSO

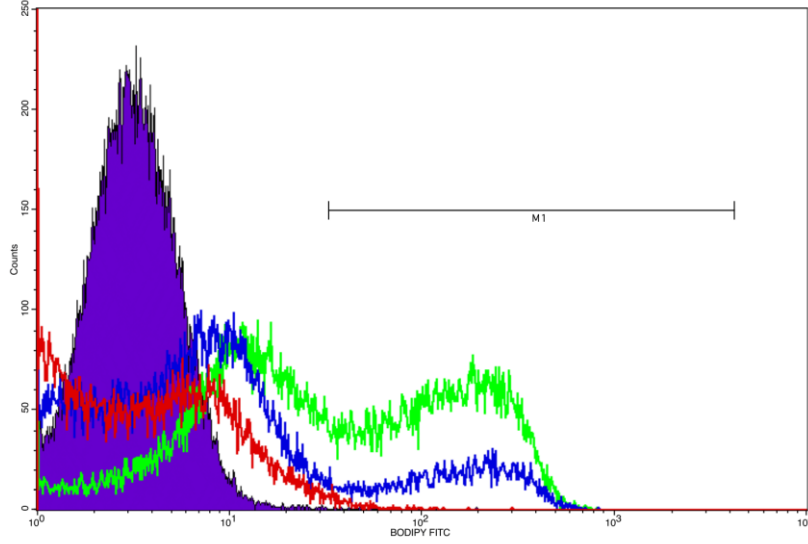
Bu histogram analizinde y eksenini ölçümü yapılan hücrelerin sayısını gösterirken x eksenini lipid peroksidasyonunu ölçen floresanın şiddetini göstermektedir. Bu değerlere göre 25 µM erastin eklenen koşulda lipid peroksidasyonunun %5,43 oranında arttığı ve ferrostatin-1 eklenen koşulda %2,18 oranında arttığı gösterilmiştir.

Daha sonra 35µM Erastin ve 2,5 µM Ferrostatin-1 konsantrasyonu kullanılarak akım sitometri deneyi tekrarlandı. Hücrelerin dağılımı Şekil 4-12’de gösterilmiştir. Bu deney sonucunda 35µM Erastin koşulunda kontrole göre lipid peroksidasyon %46,93 olurken 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda bu artış %14,15 olmuştur (Şekil 4-13). İnhibitör madde uygulanan koşula göre sadece erastin uygulanan hücrelerde lipid peroksidasyonu 3 kat artış gösterilmiştir.



Şekil 4-12. Akım sitometride hücrelerin dağılımı

Şekildeki her nokta ölçümü yapılan bir hücreyi temsil etmektedir. Hücrelerin dağılımı boyutlarına göre değişir. Hücre yoğunluğunun tek bir yerde olması tek bir hücre hattı olduğu anlamına gelmektedir. Seçilen bölge akım sitometri analizi için gereken kapı almayı temsil etmektedir.



Şekil 4-13. Akım sitometri grafiği

Mor – kontrol, yeşil- 35µM Erastin, mavi- 35µM Erastin+2,5µM Ferrostatin, kırmızı- 3,5µL DMSO

Bu histogram analizinde y eksenini ölçümü yapılan hücrelerin sayısını gösterirken x eksenini lipid peroksidasyonunu ölçen floresanın şiddetini göstermektedir. Bu değerlere göre 35 µM erastin eklenen koşulda lipid peroksidasyonunun %46,93 oranında arttığı ve ferrostatin-1 eklenen koşulda %14,15 oranında arttığı gösterilmiştir.

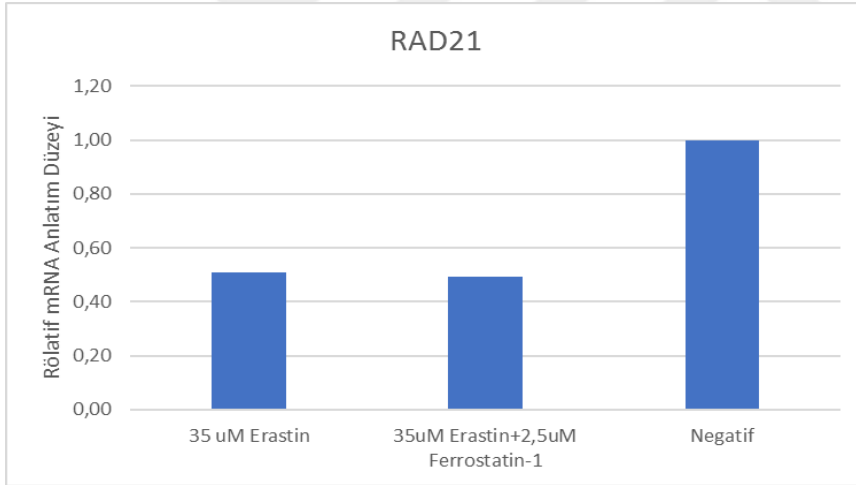
4.4. qRT-PZR Sonuçları

Alzheimer hastalığı ve ferroptozla ilişkili genlerin ekspresyon değişimleri hücre kültürü materyallerinde incelenmiştir. *BNIP3L*, *TM2D1*, *ACSL4*, *RAD21* ve *HMOX-1* genleri bu tez projesi kapsamında sadece hücre kültürü materyallerinde bakılmıştır. *SLC7A11* ve *GPX4* genleri ise hem hücre kültüründen elde edilen cDNA'larda hem de hasta gruplarında değerlendirilmiştir.

4.4.1. Hücre Kültürü Ekspresyon Sonuçları

Hücre kültürü materyallerinden elde edilen cDNA'lar ile AH ve ferroptoz ile ilişkili aday genlerin 35µM Erastin, 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 ve negatif koşullarındaki ekspresyon değişimleri incelenmiştir.

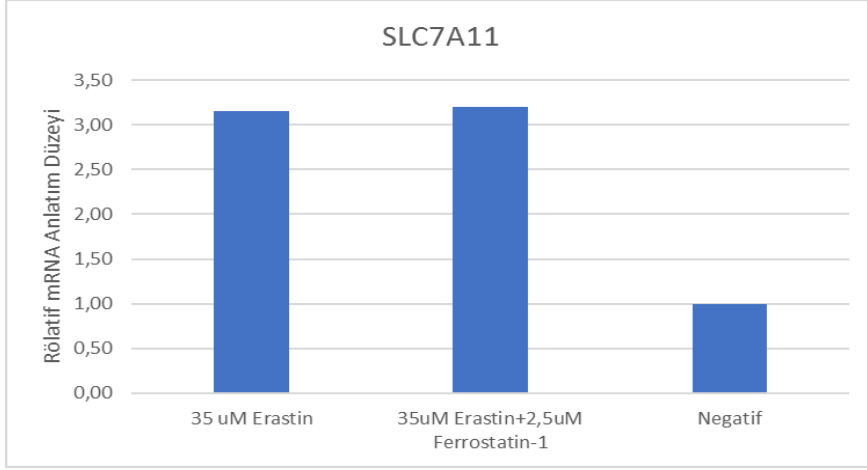
RAD21 geninin ekspresyon düzeyinin 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,51 kat azaldığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 0,49 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4-14).



Şekil 4-14. Hücre kültürü materyallerinde *RAD21* geninin anlatım düzeyi

RAD21 gen anlatımı 35µM Erastin ve 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullarında sırasıyla 0,51 kat ve 0,49 kat azalmıştır.

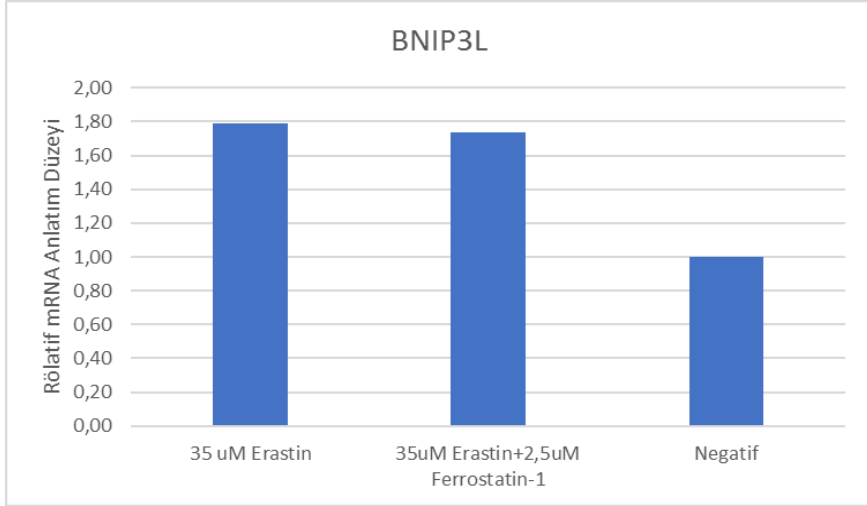
SLC7A11 ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 3,16 kat arttığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 3,20 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-15).



Şekil 4-15. Hücre kültürü materyallerinde *SLC7A11* geninin anlatım düzeyi

SLC7A11 gen anlatımı 35µM Erastin ve 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullarında sırasıyla 3,16 kat ve 3,20 kat artmıştır.

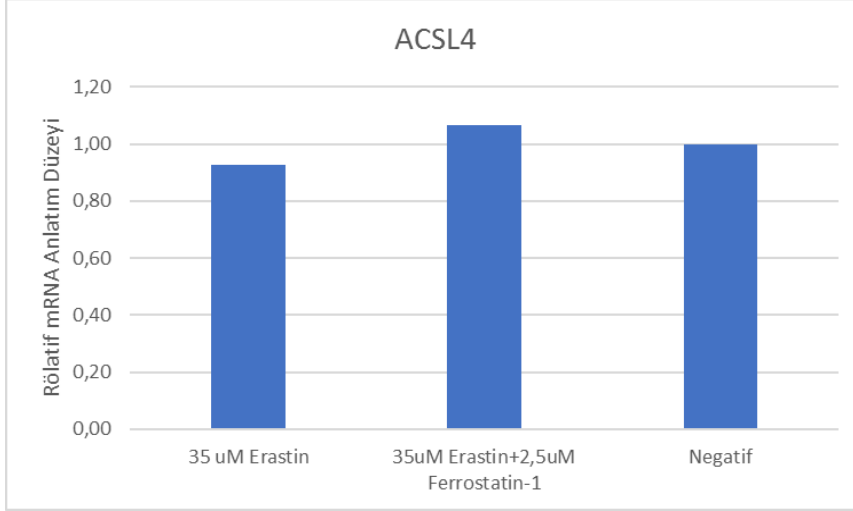
BNIP3L ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 1,79 kat arttığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 1,74 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-16).



Şekil 4-16. Hücre kültürü materyallerinde *BNIP3L* geninin anlatım düzeyi

BNIP3L gen anlatımı 35µM Erastin ve 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullarında sırasıyla 1,79 kat ve 1,74 kat artmıştır.

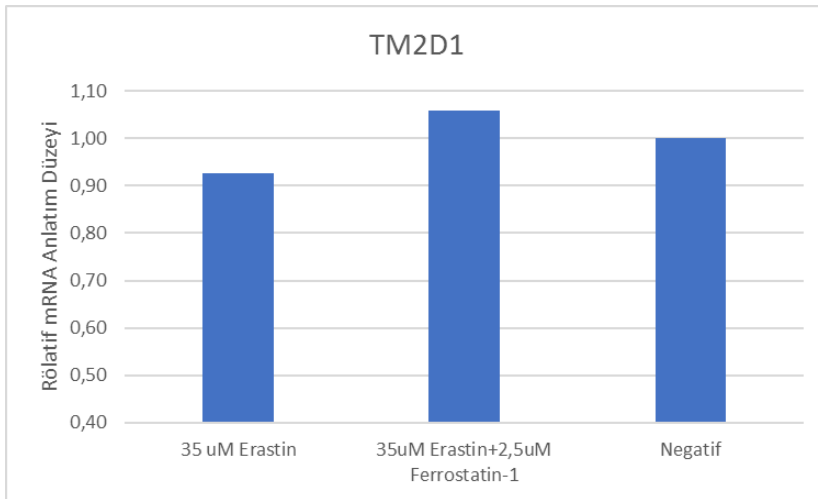
ACSL4 ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,94 kat azaldığı ancak 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda 1,07 kat arttığı görülmüştür. (Şekil 4-17).



Şekil 4-17. Hücre kültürü materyallerinde *ACSL4* geninin anlatım düzeyi

ACSL4 gen anlatımı 35µM Erastin koşulunda 0.94 kat azalırken 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullunda 1,07 kat artmıştır.

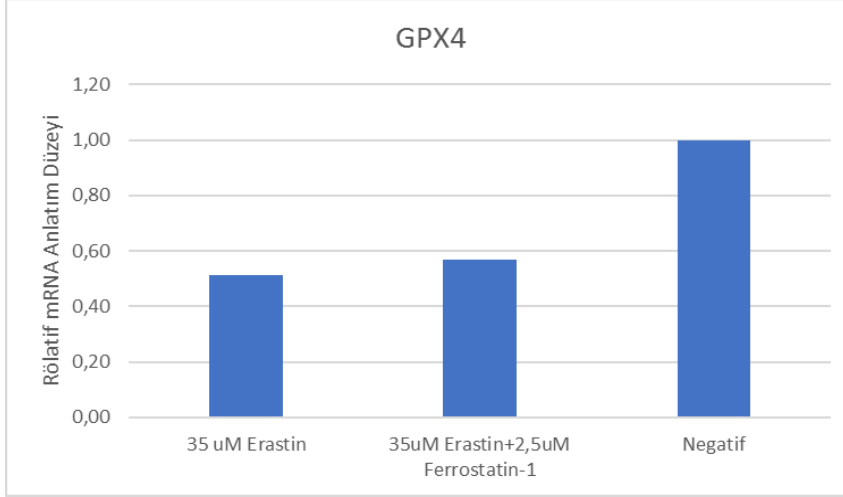
TM2D1 ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,93 kat azaldığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 1,06 kat arttığı belirlenmiştir. (Şekil 4-18).



Şekil 4-18. Hücre kültürü materyallerinde *TM2D1* geninin anlatım düzeyi

TM2D1 gen anlatımı 35µM Erastin koşulunda 0.93 kat azalırken 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullunda 1,06 kat artmıştır.

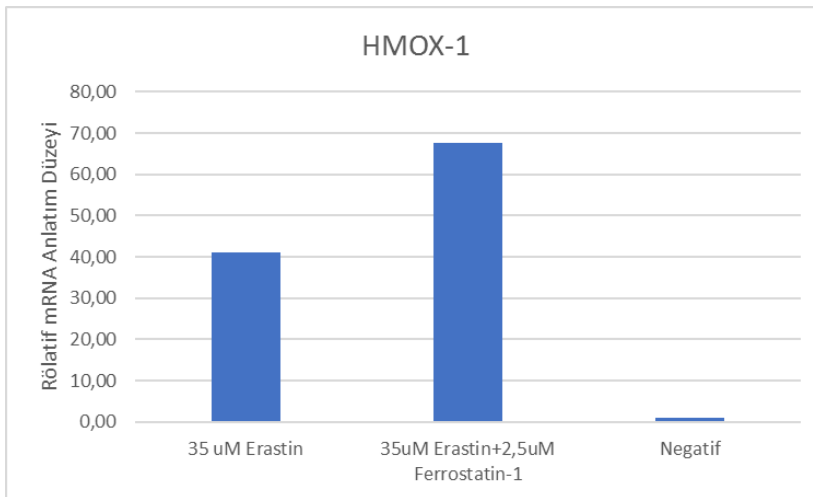
GPX4 ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,51 kat azaldığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda 0,57 kat azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4-19).



Şekil 4-19. Hücre kültürü materyallerinde *GPX4* geninin anlatım düzeyi

GPX4 gen anlatımı 35µM Erastin ve 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullarında sırasıyla 0,51 kat ve 0,57 kat azalmıştır.

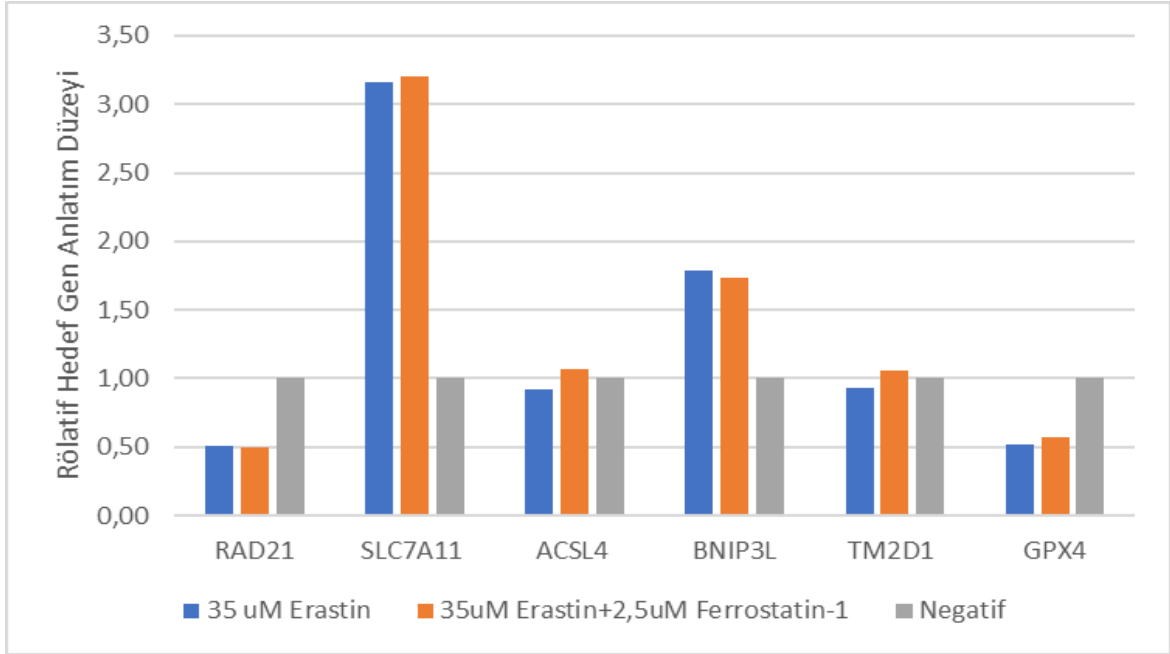
HMOX-1 geninin ekspresyonunda oldukça dramatik bir değişim gözlenmiştir. 35µM Erastin koşulunda negatife göre 41,14 kat artış görülürken 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda 67,65 kat artış gösterilmiştir (Şekil 4-20).



Şekil 4-20. Hücre kültürü materyallerinde *HMOX-1* geninin anlatım düzeyi

HOMX-1 gen anlatımı 35µM Erastin ve 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşullarında sırasıyla 41,14 kat ve 67,65 kat artmıştır.

HMOX-1 hariç diğer hedef genlere bakıldığında negatife göre ekspresyon düzeyinde en büyük artışın *SLC7A11* geninde en büyük düşüşün ise *RAD21* geninde olduğu görülmüştür. Ayrıca erastin ve erastin+ferrostatin eklenen koşullarda gen anlatım düzeyi değişimlerinin aynı yönde olması dikkat çekmektedir (Şekil 4-21).

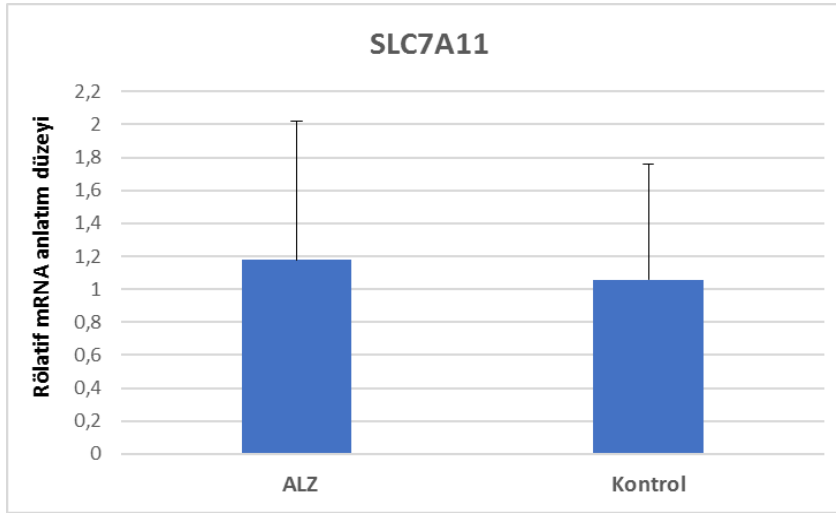


Şekil 4-21. Hedef genlerin hücre kültüründe anlatım düzeyleri

Hücre kültüründe 35µM Erastin (mavi), 35µM Erastin+2,5µM Ferrostatin-1 (turuncu) ve negatif (gri) koşullarında hedef genlerin anlatımları şekildeki grafikte gösterilmiştir.

4.4.2. Hasta – Kontrol Grubunun Ekspresyon Sonuçları

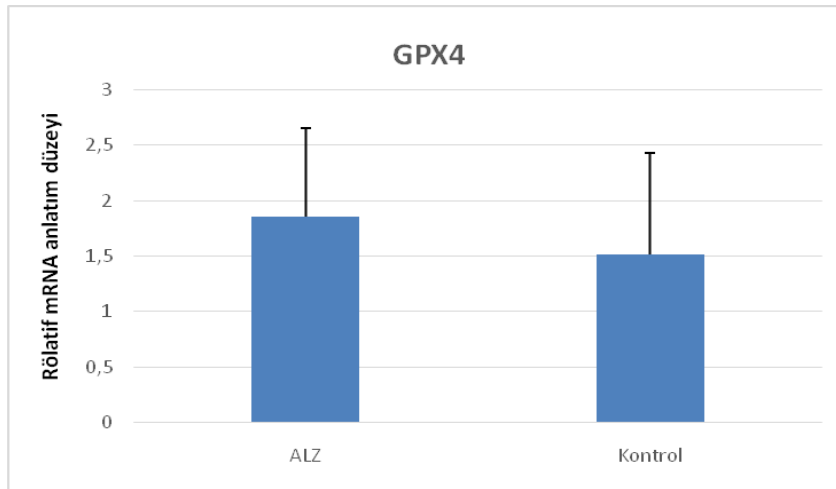
SLC7A11 ve *GPX4* ekspresyon düzeyleri, 25 Alzheimer hastası ve 21 kontrolde incelenmiştir. *SLC7A11* geninin ekspresyon düzeyinin Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre 1,177 kat arttığı görüldü ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,783$) olmadığı belirlendi (Şekil 4-22).



Şekil 4-22. Hasta-kontrol grubunda *SLC7A11* geninin anlatım düzeyi

SLC7A11 gen anlatımı hasta grubunda kontrole göre 1,177 kat artmıştır.

GPX4 ekspresyon düzeyinin Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre 1,22 artmış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,361$) olmadığı görülmüştür (Şekil 4-23).



Şekil 4-23. Hasta-kontrol grubunda *GPX4* geninin anlatım düzeyi

GPX4 gen anlatımı hasta grubunda kontrole göre 1,22 kat artmıştır.

5. TARTIŞMA

Hücre ölümleri hastalıkların patogenezi içinde rol oynayan ciddi bir mekanizmadır. Araştırmacılar tarafından uzun yıllar boyunca hücre ölüm şekli olarak otofaji, nekroz ve apoptoz çalışmaları yapılmıştır. Ferroptotik hücre ölümünün tanımlanmasından sonra araştırmalar da yön değiştirmiştir [22]. Ferroptoz yeni keşfedilen kompleks bir mekanizmaya sahip hücre ölüm şeklidir. Ferroptoz belirteci olan lipid peroksidasyonu ve demir metabolizmasındaki bozukluklar, Alzheimer hastalarının beyin dokusunda gösterilmiştir [42]. Ancak ferroptozun AH'de nöron ölümüne giden süreçte nasıl bir rol oynadığı henüz net olarak bilinmemektedir.

Tez çalışmamız kapsamında HEPG2 hücre hattında oluşturulan ferroptoz modelinde, AH ile ilişkili genlerinin anlatım düzeylerindeki farklılıkların belirlenmesi ve saptanacak olası farklılıkların ferroptoz ile ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir.

RAD21, *SLC7A11*, *BNIP3L* ve *GPX4* genlerinin HEPG2 hücre hattındaki ekspresyonlarının erastin ve erastin ile ferrostatin-1'in birlikte uygulandığı koşullarda aynı yönde değiştiği görülmüştür. Bu sonuçlar, söz konusu genlerin ekspresyonlarının erastinden etkilendiğini ancak ferrostatin-1'den etkilenmediğini göstermektedir. Ferrostatin-1 gen ekspresyonunu doğrudan değil ancak lipid peroksidasyonunu düşürerek etkileyebileceği düşünülmektedir. Erastin, bir ferroptoz uyarıcısıdır. Hücrede sistem Xc-'yi inhibe ederek lipid peroksidasyonunu önleyen GPX4 enziminin aktivitesini azaltır. Lipid peroksidler hücrede birikerek membrada bulunan lipidlere saldırırlar [23]. Membranın yapısı bozulur ve hücre ölüme gider. Ferrostatin-1'in etkisi ise bu mekanizma üzerinden değildir. Oluşan lipid peroksidleri yakalayıp detoksifiye edilmesini sağlar ve hücreyi ölümden kurtarır [22]. Bu yolla bir gen ekspresyon değişiminin olmaması muhtemeldir. Bahsedilen mekanizmalar protein veya enzim düzeyinde olan değişikliklerdir. Dolayısıyla sadece erastin eklenen koşullarda erastin+ferrostatin-1 eklenilen koşulun gen ifadesinin benzer şekilde değişmesi kabul edilebilir bir sonuçtur. Ferrostatin-1 koşulu sadece hücre kültüründe lipid peroksidasyonunu düşürerek erastinin ferroptozu indüklediğinin doğrulanması için eklenmiştir. Ferrostatin-1'in hücre içinde yaptığı değişiklikler gen ekspresyonu çalışmalarıyla değil post-translasyonel deneylerle saptanabilir.

SLC7A11 ekspresyonunun erastin eklenen koşulda ekspresyonun artmış olduğu görülmüştür. Bu durum erastinin sistem Xc⁻'yi inhibe etmesi ile açıklanabilir. Erastin sistem Xc⁻'yi inhibe ederek sistinin hücre içine alınmasını engeller ve bu durumda hücre sistein ihtiyacını kompanse etmek için negatif geribildirim mekanizması ile *SLC7A11* genin ekspresyonunu arttırarak bu ihtiyacı karşılamaya çalışır. *SLC7A11* ekspresyonunun erastin ve ferrostatinin birlikte uygulandığı koşulda sadece erastin uygulanan koşula göre değişmemesi, bu genin ekspresyonunun lipid peroksidasyonundaki düşüşten etkilenmediğini göstermektedir. Bu durum ferrostatinin lipid peroksidasyonunu farklı bir yolak üzerinden etkilemesi ile açıklanabilir. AH patogenezinde Aβ birikiminin anahtar rolü olduğu bilinmektedir. Aβ fibrillerinin etrafında enflamasyon yanıtı sorumlu mikrogliya hücreleri bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada mikrogliya hücrelerinde bulunan sistem Xc⁻'den salınan glutamatın Aβ toksisitesini arttırdığı gösterilmiştir [59]. Bu bağlamda hasta grubumuzda bakılan ve sistem Xc⁻'nin üyesi olan *SLC7A11* gen ifadesi kontrol grubuna göre 1,177 kat arttığı görülmüştür. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ancak daha geniş hasta grubunda taranıp bakılması gerekmektedir.

Daha önce TÜBİTAK 1001 (214S340) projesi kapsamında AH hasta-kontrol çalışma grubumuzda yapılan *BNIP3L* gen ifadesinin AH hastalarında kontrole göre arttığı gösterilmiştir. Bu tez projesi kapsamında hücre kültüründe yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında da *BNIP3L* gen ifadesinin arttığı görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda, *NIX* olarak da bilinen *BNIP3L* geninin *BNIP3* ile birlikte hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir. Otofaji ve apoptoz üzerinde yapılan bu çalışmalarda, *BNIP3L*'nin mitokondri membranında bulunan sitokrom c'nin salınımına yol açarak oksidatif stresi arttırdığı ve hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştur. Bu durumun temelinde yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamış olsa da bu ölümün tek bir yoldan gerçekleşmediği ve birden fazla yolağı tetikleyebildiği belirtilmiştir. *BNIP3L* gen anlatımının, erastin eklenen koşullarda artması genin ferroptotik hücre ölümünde rol alıyor olabileceğini ya da ferroptozdan etkilendiğini düşündürmektedir [45, 60, 48, 61]. İleri fonksiyonel çalışmalarla genin ferroptozdaki rolü aydınlatılabilir.

GPX4 lipid peroksidasyonunun engelleyen bir enzimdir [73]. Bu yüzden lipid peroksidasyonu arttığı erastin içeren koşullarda *GPX4* ekspresyonunun azalması beklenmektedir. Sistem Xc⁻'nin inhibisyonu ile hücre için glutatyon düzeyi azalmakta

ve bu durum GPX4 aktivitesinin düşmesine sebep olmaktadır. Bu tez çalışmasında HEPG2 hücrelerinin erastin ile inkübe edilmesi sonucunda *GPX4* anlatımının düştüğü gözlemlenmiş ve sonuç çalışma hipotezi ile uyumlu bulunmuştur. Ferrostatin-1'in görevi daha önce de bahsedildiği gibi lipid peroksidazları detoksifiye etmektir. Sistem Xc^- , ferrostatin-1'in doğrudan hedefi olmadığından hücre içi glutatyon seviyelerini etkilemesi beklenmemektedir. Bu sebeple *GPX4* anlatımının ferrostatin-1 içeren koşulda da, ferroptotik hücre ölümünün indüklendiği koşula benzer olarak azalması beklenmektedir. Hücre kültüründe ferrostatin-1 koşulu tek başına denenmemiş erastin ile birlikte eklenmiştir. Ferrostatin-1'in bu genin anlatımı üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için sadece Ferrostatin-1 içeren koşulun bakılması gerekmektedir. Rocha ve ark.'nın AH üzerinde yaptığı çalışmada oksidatif stresteki görevi nedeniyle, beyinde GPX4 protein ifadesinin arttığından bahsedilmiştir [62]. Ayrıca Hambright ve ark.'nın yaptığı çalışmada *GPX4* geninin nöron hücrelerinde inaktive edilmesiyle, 12 haftalık farelerde hipokampal nörodejenerasyon saptanmıştır [40]. AH hasta ve kontrol grubunda *GPX4* gen anlatımının kontrole göre arttığı görülmüştür. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması nöronda gerçekleşen değişimlerin periferik kandaki gen ifadesine yansımıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Bir nükleik fosfoprotein olan RAD21'in hücre içinde DNA'daki çift zincir kırıklarını onarmada ve mitoz bölünme sırasında kardeş kromatidleri bir arada tutmakta görevli olduğu bilinmektedir. Apoptoz sürecinde kaspazlar DNA yıkımından sorumludur. Chen ve ark. yaptığı çalışmada RAD21'in de kaspazların substratı olduğu gösterilmiştir. Özellikle RAD21 proteininin kaspaz-3 ve kaspaz-7 ile yıkıma uğradığı bulunmuştur [63]. Daha önce TÜBİTAK 1001 (214S340) projesi kapsamında AH hasta-kontrol çalışma grubumuzda yapılan *RAD21* gen ifadesinin AH hastalarında kontrole göre arttığı gösterilmiştir. Tez projesi kapsamında yapılan hücre kültüründe erastin ve erastin+ferrostatin eklenen her iki koşulda da *RAD21* azalmış olduğu görülmüştür. Bu durum DNA tamirinden sorumlu olan RAD21'in ferroptozda da benzer bir mekanizmayla yıkıma uğrayıp uğramadığı sorusunu akıllara getirmektedir. Diğer yandan hücre ölümünün gerçekleştiği erastin koşulu hariç hücrenin ölümden kurtulduğu ferrostatin-1 eklenen koşulda da gen ifadesinin azalması beklenmeyen bir sonuç olmuştur. Diğer genlerde açıkladığı gibi ferroptozun kompleks bir yapıda olması ve erastinle ferrostatininin süreci farklı yerlerden etkilemesi *RAD21* geninin ifadesindeki

düşüşe neden olabilir. Erastinin her iki hücre koşulunda da bulunması ve erastinin hücre içinde etkilediği muhtemel bir yıkım mekanizması olması ihtimal dahilindedir.

TM2D1, β -amiloid peptidene bağlanır. Daha önce laboratuvarımızda yapılan TÜBİTAK 1001 (214S340) projesi kapsamında AH mekanizmasında etkili olduğu düşünülüp ekspresyon analizi yapılmış ancak bir fark görülmemiştir. Hücre kültürü çalışmalarında da aynı şekilde erastin, erastin+ferrostatin-1 eklenen koşullarda *TM2D1* gen ifadesinde bir değişim görülmemiştir. Genin bu yoldan etkilenmediği sonucu çıkartılabilir.

Hücre kültürü materyallerinde yapılan gen ifadesi analizlerine göre en büyük artış *HMOX-1* geninde görülmüştür. *HMOX-1* gen ifadesi negatif koşula göre erastin eklenen hücrelerde 41,14 kat, erastin ve ferrostatinin beraber eklendiği hücrelerde ise 67,65 kat artmıştır. *HMOX-1* hücre içindeki hem bileşiğini karbon monoksit, biliverdin ve demire dönüştürmesiyle hücrede demir kaynağının oluşmasına katkıda bulunur. *HMOX-1* gen ifadesinin artırılması ya da sürekli hale getirilmesi çeşitli hücre hatlarında demir metabolizmasını oldukça etkilemektedir [75]. Kwon ve ark. HT-1080 fibrosarkoma hücrelerinde yaptığı bir çalışmada aynı şekilde ferroptoz erastin ile indüklenmiştir. Yapılan çalışmada, bizim sonuçlarımızla paralel olarak *HMOX-1* ekspresyonda artış gösterilmiştir. *HMOX-1* geninin ekspresyonunun artırılması da ferroptoz sürecini hızlandırdığı görülmüştür. Ancak yine aynı deneyde ferrostatin denenmiş ve negatif koşula göre *HMOX-1* gen ifadesini arttırdığı ancak sadece erastin eklenen koşuldan az olduğu gösterilmiştir [56]. Hücre tipinin değişik olması ve eklenen ferrostatin-1 konsantrasyonunun değişik olması gen ifadesinin artışını değiştirebilir. Yine de yapılan çalışmada sonuçlarımızla paralel olarak her iki koşulda da gen ifadesinde artış gösterilmiştir.

Son olarak ferroptozla ilgili olan genlerden *ACSL4* açısından her iki koşulda da değişim görülmemiştir. *ACSL4* ve erastinin etkilediği yolların farklı olması bir değişim görmememizin sebebi olarak düşünülebilir. Erastin, etkisini ferroptozda sistin/glutamat antiporterini inhibe ederek gösterirken *ACSL4* lipid metabolizmasında görev almaktadır. Hücrede membranda bulunan lipidlerin sentezini yapan ve lipid peroksidasyon için substrat sağlayan *ACSL4*'ün ferroptoz mekanizması için çok önemli olduğu bilinmektedir ancak yapılan çalışmalarda ferroptoz sonrası *ACSL4*'ün

değişimine protein düzeyinde bakıldığında anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [64, 65, 66].

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında laboratuvarımızda ferroptotik hücre ölümü HEPG2 hücre hattında başarıyla oluşturulmuştur. Hücre kültüründen elde edilen materyallerden yapılan ekspresyon sonucunda *BNIP3L* ve *RAD21* genlerinin ferroptoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ferroptoz metabolizmasında rol oynayan genlerin değişimi hücre kültüründe beklenildiği gibi olmuştur. Bu projeyi destekleyecek devam çalışmalarında hasta-kontrol grubunun ve bakılacak gen sayısının artırılması ayrıca gen ekspresyon deneylerine eşlik edecek protein deneylerinin de olması bu genlerin AH üzerinde rolünün aydınlatılması açısından önemlidir.



KAYNAKLAR

1. Masaldan, S., Bush, A. I., Devos, D., Rolland, A. S., & Moreau, C. (2019). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 133(July), 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.033>
2. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quím. Nova* [online]. 2009, vol.32, n.1, pp.169-174. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
3. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017 Oct 5;171(2):273-285. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021. Review. PubMed PMID: 28985560; PubMed Central PMCID: PMC5685180.
4. Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease: Abstract and Introduction. *Natural Rview Neurology*, 7(3), 1–18. Retrieved from <http://www.medscape.org/viewarticle/736977>
5. Alzheimer, A. (1906). Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Zentralblatt*, 23, 1129–1136. <https://doi.org/10.1145/1658550.1658558>
6. Lane, D. J. R., Ayton, S., & Bush, A. I. (2018). Iron and Alzheimer's Disease: An Update on Emerging Mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1), S379–S395. <https://doi.org/10.3233/JAD-179944>
7. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011 Mar;10(3):241-52. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70325-2. Review. PubMed PMID: 21349439; PubMed Central PMCID: PMC3132088.
8. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*. 2015 Jan 1;77(1):43-51. doi:

- 10.1016/j.biopsycho.2014.05.006. Epub 2014 May 17. Review. PubMed PMID: 24951455; PubMed Central PMCID: PMC4234692.
9. Lin, G. G., & Scott, J. G. (2012). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*, 100(2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. *Investigations*
 10. Qizilbash, N., Gregson, J., Johnson, M. E., Pearce, N., Douglas, I., Wing, K., ... Pocock, S. J. (2015). BMI and risk of dementia in two million people over two decades: A retrospective cohort study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 3(6), 431–436. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00033-9)
 11. Belaidi, A. A., & Bush, A. I. (2016). Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *Journal of Neurochemistry*, 139, 179–197. <https://doi.org/10.1111/jnc.13425>
 12. Koen Dewaele) <https://biovox.eu/insights/detail/alzheimer-s-can-be-predicted-early> Erişim Tarihi: 27.05.2019
 13. <https://www.abcam.com/neuroscience/beta-amyloid-in-alzheimers-disease-app-processing> Erişim Tarihi: 27.05.2019
 14. Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 377(9770), 1019–1031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)
 15. <https://alzheimersnewstoday.com/2014/11/03/tau-protein-leads-to-neuronal-death-in-alzheimers/> Erişim Tarihi: 28.05.2019
 16. Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., & Youdim, M. B. H. (2002). Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases *Journal of Neurochemistry*, 63(3), 793–807. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63030793.x>
 17. Beard, J. L., & Connor, J. R. (2003). Iron Status and Neural Functioning . *Annual Review of Nutrition*, 23(1), 41–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.020102.075739>
 18. Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R., & Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(11), 863–873. <https://doi.org/10.1038/nrn1537>
 19. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*. 2014 Oct;13(10):1045-

60. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70117-6. Review. PubMed PMID: 25231526; PubMed Central PMCID: PMC5672917.
20. Moos, T., Nielsen, T. R., Skjørringe, T., & Morgan, E. H. (2007). Iron trafficking inside the brain. *Journal of Neurochemistry*, 103(5), 1730–1740. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04976.x>
21. Wong, B. X., Ayton, S., Lam, L. Q., Lei, P., Adlard, P. A., Bush, A. I., & Duce, J. A. (2014). A comparison of ceruloplasmin to biological polyanions in promoting the oxidation of Fe²⁺ under physiologically relevant conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(12), 3299–3310. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.08.006>
22. Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 May;15(5):348-66. doi: 10.1038/nrd.2015.6. Epub 2016 Jan 18. Review. PubMed PMID:26775689.
23. Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y., & Chen, G. (2017). Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(4), 648–657. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13008>
24. Mou, Y., Wang, J., Wu, J., He, D., Zhang, C., Duan, C., & Li, B. (2019). Ferroptosis , a new form of cell death : opportunities and challenges in cancer. 1–16.
25. Bridges, R. J., Natale, N. R., & Patel, S. A. (2012). System x^c-cystine/glutamate antiporter: An update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British Journal of Pharmacology*, 165(1), 20–34. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x>
26. Lu B, Chen XB, Ying MD, He QJ, Cao J, Yang B. The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 12;8:992. doi: 10.3389/fphar.2017.00992. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 29375387; PubMed Central PMCID: PMC5770584
27. Fearnhead, H. O., Vandenabeele, P., & Berghe, T. Vanden. (2017). How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death? *Cell Death and Differentiation*, 24(12), 1991–1998. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.149>
28. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW,

- Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1-2):317-331. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010. PubMed PMID: 24439385; PubMed Central PMCID: PMC4076414.
29. Liang, H., Yoo, S. E., Na, R., Walter, C. A., Richardson, A., & Ran, Q. (2009). Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 30836–30844. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032839>.
 30. Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(34), E4966–E4975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>
 31. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
 32. Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., and Tsuji, Y. (2016). Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem. Sci.* 41, 274–286. doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.012
 33. Hou, W., Xie, Y., Song, X., Sun, X., Lotze, M. T., Zeh, H. J., ... Tang, D. (2016). Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*, 12(8), 1425–1428. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1187366>
 34. Gao, F., Chen, D., Si, J., Hu, Q., Qin, Z., Fang, M., & Wang, G. (2015). The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1/PARK2 pathway. *Human Molecular Genetics*, 24(9), 2528–2538. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv017>
 35. Bertrand, R. L. (2017). Iron accumulation, glutathione depletion, and lipid peroxidation must occur simultaneously during ferroptosis and are mutually amplifying events. *Medical Hypotheses*, 101, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.02.017>
 36. Kagan, V. E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J. P. F., Doll, S., Croix, C. S., ... Bayır, H. (2017). Oxidized arachidonic/adrenic phosphatidylethanolamines navigate

- cells to ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 81–90.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2238.Oxidized>
37. Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chemical Biology*, 10(7), 1604–1609. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00245>
 38. Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., ... Tang, D. (2016). Ferroptosis: Process and function. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 369–379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
 39. Feng, H., & Stockwell, B. R. (2018). Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis *PLoS Biology*, 16(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006203>
 40. Hambright, W. S., Fonseca, R. S., Chen, L., Na, R., & Ran, Q. (2017). Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biology*, 12(January), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.021>
 41. Raina, A. K., Hochman, A., Zhu, X., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Siedlak, S. L., Smith, M. A. (2001). Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 101, 305–310. <https://doi.org/10.1007/s004010100378>
 42. Praticò, D., & Sung, S. (2004). Lipid Peroxidation and Oxidative imbalance: Early functional events in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 6(2), 171–175. <https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6209>
 43. Chen, L., Hambright, W. S., Na, R., & Ran, Q. (2015). Ablation of the ferroptosis inhibitor glutathione peroxidase 4 in neurons results in rapid motor neuron degeneration and paralysis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28097–28106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680090>
 44. Mandal, P. K., Saharan, S., Tripathi, M., & Murari, G. (2015). Brain Glutathione Levels - A Novel Biomarker for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 78(10), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.005>
 45. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB. BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions.

- Oncogene. 2008 Dec;27 Suppl 1:S114-27. doi: 10.1038/onc.2009.49. Review. PubMed PMID: 19641497; PubMed Central PMCID: PMC2925272.
46. Zhang, J., & Ney, P. A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), 939–946. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.16>
47. Ha, S. D., Ng, D., Lamothe, J., Valvano, M. A., Han, J., & Sung, O. K. (2007). Mitochondrial proteins Bnip3 and Bnip3L are involved in anthrax lethal toxin-induced macrophage cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26275–26283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703668200>
48. Chen, F., Kamradt, M., Mulcahy, M., Byun, Y., Xu, H., McKay, M. J., & Cryns, V. L. (2002). Caspase proteolysis of the cohesin component RAD21 promotes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16775–16781. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201322200>
49. Hauf, S., Waizenegger, I. C., & Peters, J. M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*, 293(5533), 1320–1323. <https://doi.org/10.1126/science.1061376>
50. Gregson, H. C., Schmiesing, J. A., Kim, J. S., Kobayashi, T., Zhou, S., & Yokomori, K. (2001). A Potential Role for Human Cohesin in Mitotic Spindle Aster Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47575–47582. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103364200>
51. Armañanzas, R., Larrañaga, P., & Bielza, C. (2012). Ensemble transcript interaction networks: A case study on Alzheimer's disease. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 108(1), 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2011.11.011>
52. Kajkowski, E. M., Lo, C. F., Ning, X., Walker, S., Sofia, H. J., Wang, W., Ozenberger, B. A. (2001). β -Amyloid Peptide-induced Apoptosis Regulated by a Novel Protein Containing a G Protein Activation Module. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18748–18756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011161200>
53. Vurgun, E., Diker, İ. Y., Çoban, N., Geyik, F., Güven, G., & Erginel Ünaltuna, N. (2018). ACSL4 gen polimorfizminin (rs7886473) metabolik sendrom ve lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Cukurova Medical Journal*, 43(Ek 1), 151–157. <https://doi.org/10.17826/cumj.407589>

54. Conrad M, Friedmann Angeli JP. Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about it? *Mol Cell Oncol.* 2015 Jan 30;2(3):e995047. doi: 10.4161/23723556.2014.995047. eCollection 2015 Jul-Sep. PubMed PMID: 27308484; PubMed Central PMCID: PMC4905320
55. Koppula, P., Zhang, Y., Zhuang, L., & Gan, B. (2018). Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Communications (London, England)*, 38(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0288-x>
56. Kwon, M.-Y., Park, E., Lee, S.-J., & Chung, S. W. (2015). Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. *Oncotarget*, 6(27). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5162>
57. Walther, M., de Caul, A., Aka, P., Njie, M., Amambua-Ngwa, A., Walther, B., Conway, D. J. (2012). HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS Pathogens*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002579>
58. Poss, K. D., & Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10925–10930. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380736> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC23533>
59. Qin, S. (2006). System Xc- and Apolipoprotein E Expressed by Microglia Have Opposite Effects on the Neurotoxicity of Amyloid-beta Peptide 1-40. *Journal of Neuroscience*, 26(12), 3345–3356. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5186-05.2006>
60. Zhang, Z., Yang, X., Zhang, S., Ma, X., & Kong, J. (2007). BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke*, 38(5), 1606–1613. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.475129>
61. Kitsis, R. N., & Molkentin, J. D. (2010). Apoptotic cell death “Nixed” by an ER-mitochondrial necrotic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9031–9032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003827107>
62. da Rocha, T. J., Silva Alves, M., Guisso, C. C., de Andrade, F. M., Camozzato, A., de Oliveira, A. A., & Fiegenbaum, M. (2018). Association of GPX1 and GPX4 polymorphisms with episodic memory and Alzheimer’s disease.

- Neuroscience Letters, 666(December 2017), 32–37.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.026>
63. Chen, F., Kamradt, M., Mulcahy, M., Byun, Y., Xu, H., McKay, M. J., & Cryns, V. L. (2002). Caspase proteolysis of the cohesin component RAD21 promotes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16775–16781.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M201322200>
 64. Bai, Y. T., Chang, R., Wang, H., Xiao, F. J., Ge, R. L., & Wang, L. S. (2018). ENPP2 protects cardiomyocytes from erastin-induced ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(1), 44–51.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.113>
 65. Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1338–1343.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.124>
 66. Chu, B., Kon, N., Chen, D., Li, T., Liu, T., Jiang, L., Gu, W. (2019). ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway. *Nature Cell Biology*, 21(5), 579–591. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0305-6>
 67. Angeli, J. P. F., Shah, R., Pratt, D. A., & Conrad, M. (2017). Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(5), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.005>
 68. Barragán Martínez, D., García Soldevilla, M. A., Parra Santiago, A., & Tejeiro Martínez, J. (2019). Alzheimer's disease. *Medicine (Spain)*, 12(74), 4338–4346.
<https://doi.org/10.1016/j.med.2019.03.012>
 69. Cao, J. Y., & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11–12), 2195–2209.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2194-1>
 70. Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gelé, P., Pétrault, M., Devedjian, J. C. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiology of Disease*, 94, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.05.011>
 71. Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular

- lipid composition. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 91–98.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>
72. Latunde-Dada, G. O. (2017). Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861(8), 1893–1900. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019>
73. Seok, W., 1, Y., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Stockwell, B. R. (2014). 16 Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4 NIH Public Access. *Cell* January, 1612(1560), 317–331.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>
74. Xu, W., Tan, L., Wang, H. F., Jiang, T., Tan, M. S., Tan, L., Yu, J. T. (2015). Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 86(12), 1299–1306.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-310548>
75. Zhu, X., Huang, S., Zeng, L., Ma, J., Sun, S., Zeng, F., Cheng, X. (2017). HMOX-1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 breast cancer cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 411–417. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3027>

HAM VERİLER



FORMLAR



ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1531

Konu: Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA hk.

Tarih : 12.11.2018

Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA
Tıbbi Genetik

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 25/10/2018 gün ve 302815 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Pınar KÖSEOĞLU' nun yürüteceği 2018/1498 dosya numaralı "Alzheimer Hastalığında Rolü Olduğu Düşünülen Aday Gen(lerin) Fonksiyonel Analizi" başlıklı çalışma, kurulumuzun 09/11/2018 tarih ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

PATENT HAKKI İZİNİ



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ALZHEİMER HASTALIĞINDA ROLÜ OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN ADAY GEN(LERİN) FONKSİYONEL ANALİZİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**1**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**4**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%**2**

2

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam
University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

4

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

pharmacy.erciyes.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.journalagent.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

"Encyclopedia of Signaling Molecules",
Springer Nature, 2018

Yayın

<%**1**

8

Submitted to University of Queensland

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Pınar	Soyadı	Köseoğlu
Doğ.Yeri	Şişli/İstanbul	Doğ.Tar.	04.05.1994
Email	pınar-kos@hotmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2016
Lise	Ataköy Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi	70.00	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	76.00		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):