PINAR KÖSEOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019

← 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 çalımasına yardımı 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 ..... İİİ
BEYAN ..... İV
İTHAF ..... V
TEŞEKKÜR ..... Vİ
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
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

# TABLOLAR 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 *RAD21* geninin anlatım düzeyi ..... 47
Şekil 4-15. Hücre kültürü materyallerinde *SLC7A11* geninin anlatım düzeyi ..... 48
Şekil 4-16. Hücre kültürü materyallerinde *BNIP3L* geninin anlatım düzeyi ..... 48
Şekil 4-17. Hücre kültürü materyallerinde *ACSL4* geninin anlatım düzeyi ..... 49
Şekil 4-18. Hücre kültürü materyallerinde *TM2D1* geninin anlatım düzeyi ..... 49
Şekil 4-19. Hücre kültürü materyallerinde *GPX4* geninin anlatım düzeyi ..... 50

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

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µL: mikrolitre

µM: mikro molar

ACSL4: Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4

AH : Alzheimer Hastalığı

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid Öncü Protein

Aβ: 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 Serumu

FPN: Ferroportin 1

GBAH: Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

GPX4 : Glutatyon Peroksidaz 4

GSH: Glutatyon

GSSG: Glutatyon Disülfit

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 peroksitleriyle tetiklenen demire bağımlı bir hücre ölümü şeklidir. Ferroptozun düzenlenmesi için birçok yolak ve ilgili gen tanımlanmıştır. Bu genlerden bazıları çeşitli hastalık patogenezleriyle ilişkilendirilmiştir. Alzheimer hastalığı (AH) son yıllarda dünyada prevelansı 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, qRCR 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 qRZR 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 Istanbul 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 ölümlerinin 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 patalojik 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 patogenezine 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 nöropatalog 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

Demasın 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.

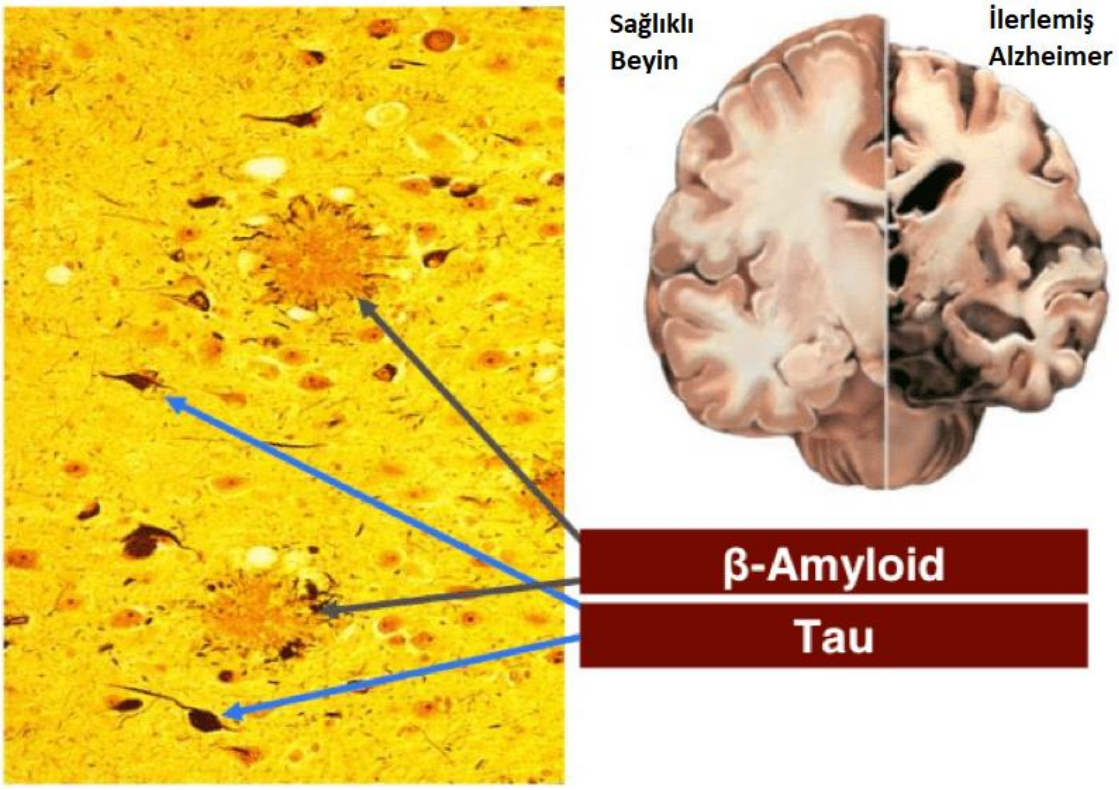
### 2.1.2. Alzheimer Hastalığı Genetiği

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 ciddiyetle 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 ε4 allel taşıyıcılığıdır [6]; ε4 allelini heterozigot olarak taşıyanların AH riski yaklaşık 3 kat artarken, ε4 allelini homozigot olarak taşıyanların riski ise yaklaşık 12 kat yükselir [7]. Ancak, *APOE* ε4 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 tanımlamıştır ve ilişkili genlerin enflamasyon, kolesterol metabolizması ve endositoz yolaklarında 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 (Aβ) birikimi ve hücre içi nörofibriller yumakları (NFY) oluşturan aşırı fosforile mikrotübül ile ilişkili protein tau birikimi (Şekil 2-1) [11, 68].

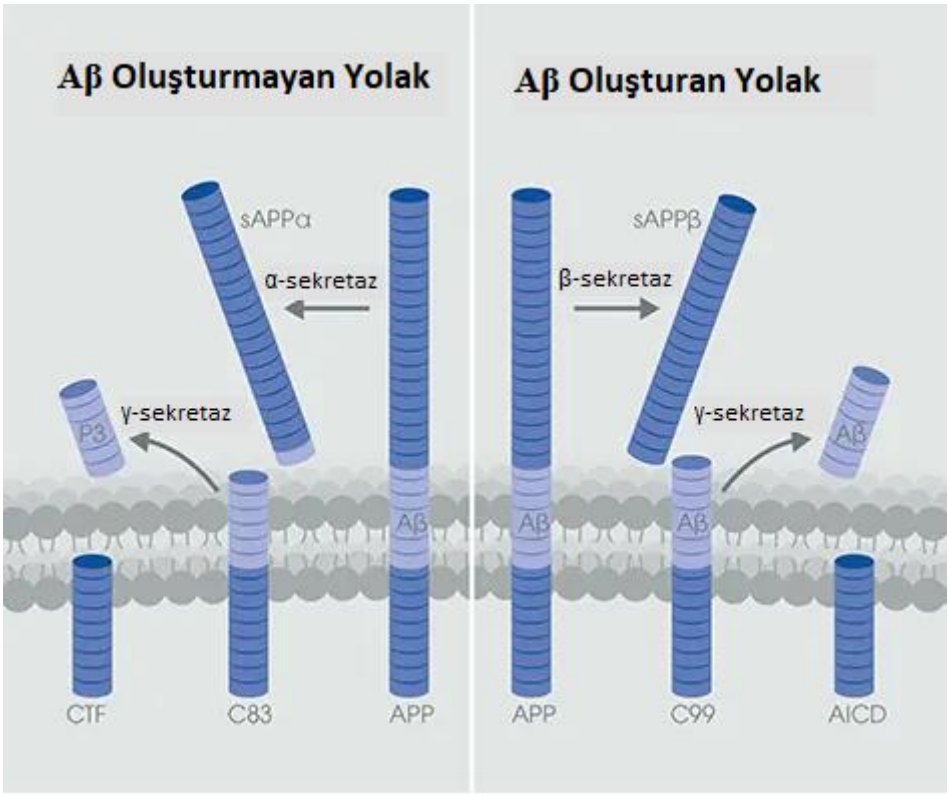



**Şekil 2-1. Alzheimer hastasına ait beyin kesit görüntüsü**

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 (Aβ40 ve Aβ42) anormal şekilde katlanmış amiloid beta (Aβ) 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 proteolik yıkıma uğrar. Toksik Aβ oluşması APP'nin hangi enzimle kesildiğine bağlıdır (Şekil 2-2). APP'nin önce α-sekretaz ardından γ-sekretaz ile

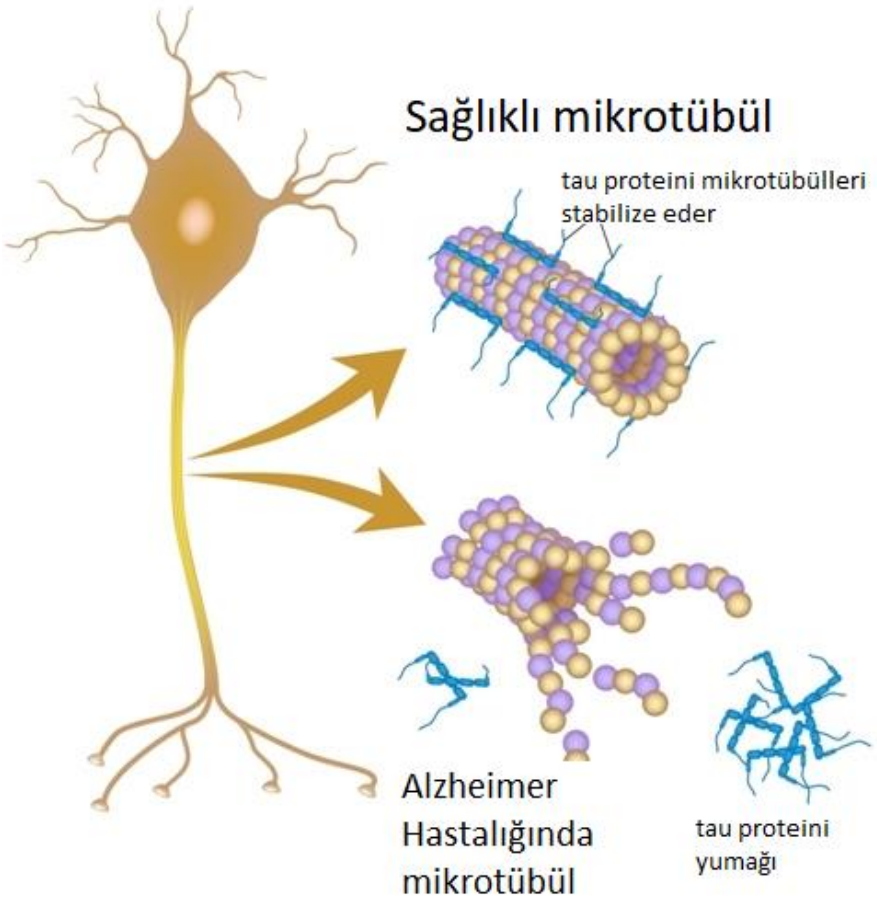
kesiminde Aβ proteini oluşmazken, önce β-sekretaz sonrasında γ-sekretaz ile kesilmesi Aβ proteininin oluşmasına yol açar [6].




**Şekil 2-2. Amiloid Precursor Proteinin Proteolitik Yıkımı**

Şekilde sol tarafta APP'nin önce α-sekretaz sonra γ-sekretaz ile kesilmesiyle Aβ oluşturmayan yolak gösterilirken sağ tarafta APP'nin önce β-sekretaz sonra γ-sekretaz ile kesilmesiyle Aβ oluşturan yolak gösterilmiştir [13].

Nörofibriler yumaklar (NFY) esas olarak hiperfosforile tau proteininden oluşan çift sarmal liflerden oluşmaktadır. Tau proteini 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 nörofibriller 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].

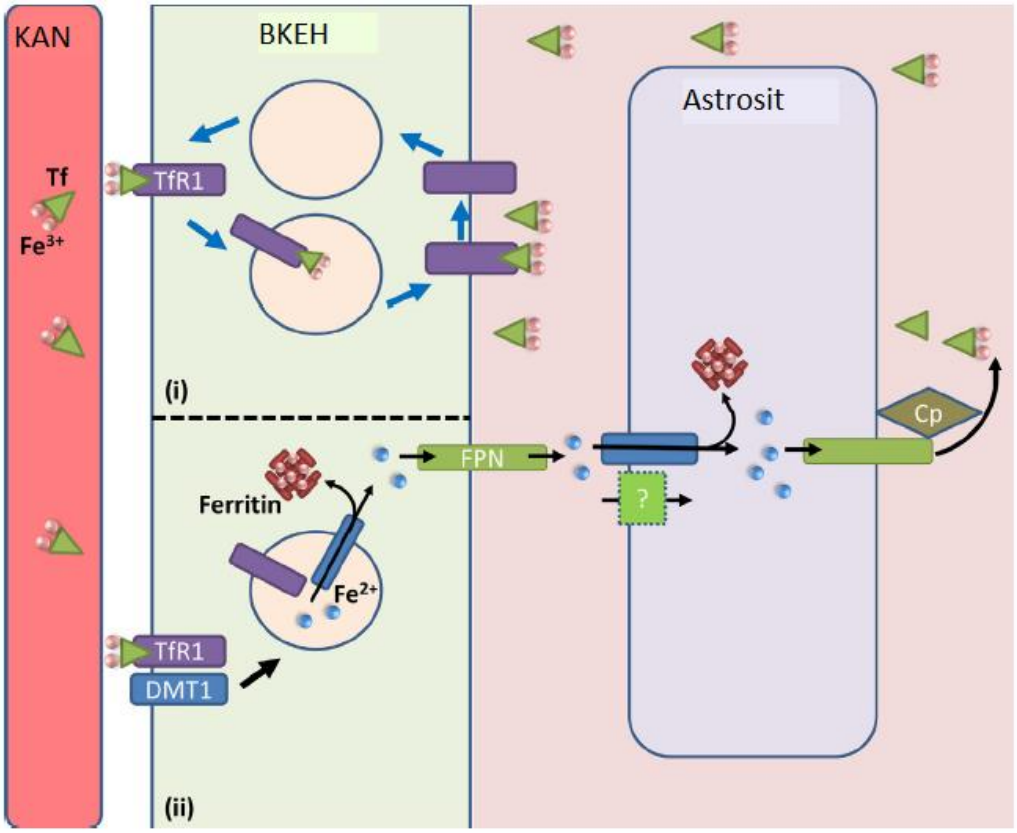
Hücresel hasar ve oksidatif stres ile ilişkili demir metabolizmasının düzensizliği, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ortak bir olay olarak bildirilmektedir [14]. Yaşlanmanın nörodejeneratif hastalıklar için ana risk faktörü olduğu kabul edilmektedir. 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. Feroptoz 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.

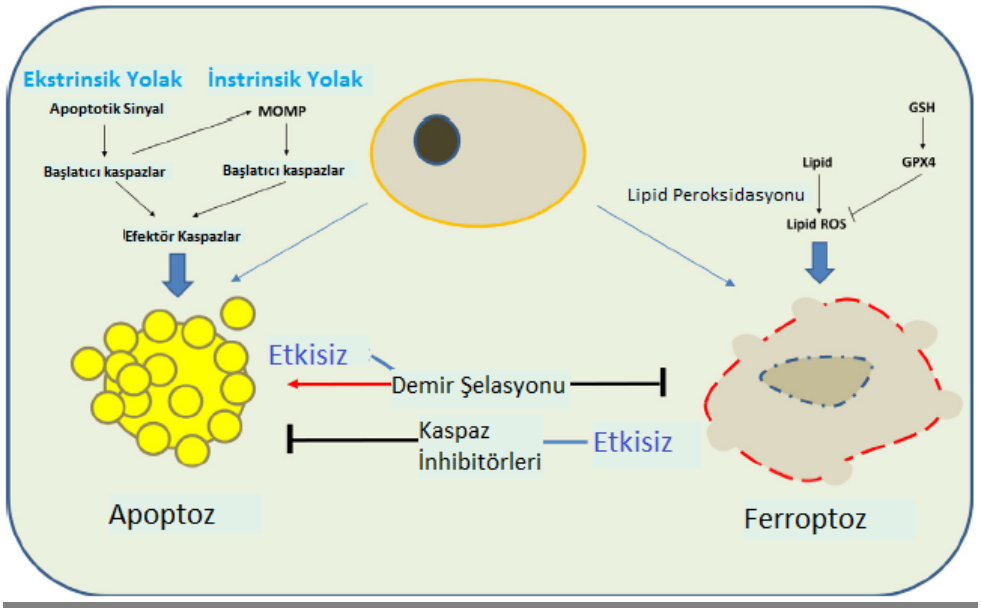
Hücrelerde ferroptoz ve apoptoz gibi hücre ölümleri, morfolojik ve biyokimyasal olarak ayırt edilebilir (Tablo 2-1). Ferroptoz görülen hücrelerde, kromozomal yoğunlaşma ve apoptotik cisimler gibi apoptoz ile ilişkili özellikler yoktur. Ferroptoz mekanizmasından apoptozdan farklı olduğu farklı olduğu 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 yolaklar, 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 membranın tomurcuklanması, hücresel hacmin azalması, nüklear | Çift zarlı otolizozomların oluşumu | Plazma zarının parçalanması, organellerin şişmesi |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | zarının azalması ya da yok olması | fragmasyon | | |
| **Anahtar Genler** | *GPX4, Nrf2, LSH, TFR1, xCT* | *Kaspaz, P53, Fas, Bcl-2, Bax* | *ATG5, ATG7, DRAM3, TFEB* | *LEF1, RIP1, RIP3* |
| **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 | TNFα, 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 | TNFa, 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**

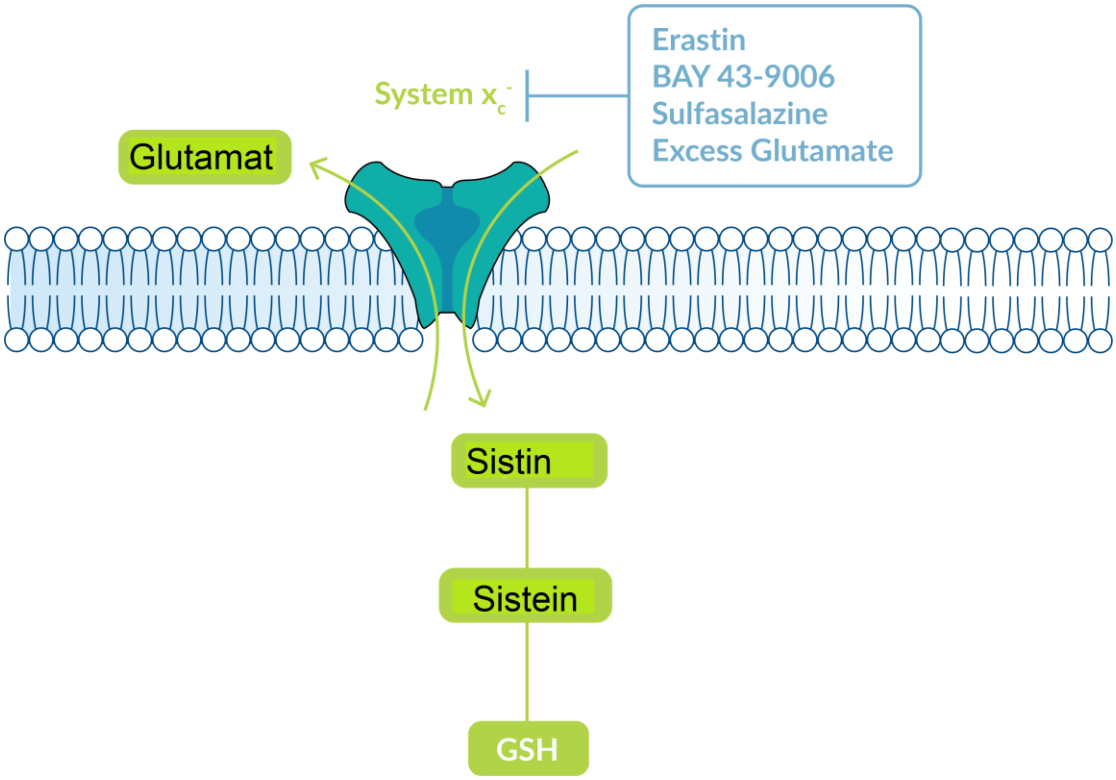
Demir şelatörleri apoptoza etki etmezken ferroptozu inhibe eder. Aynı şekilde kaspaz inhibitörleri ise apoptozu inhibe ederken ferroptoz sürecini etkilemez [1].

### 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 glutamatı 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

glutatyon 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 glutatyonu kullanarak fosfolipid peroksidaz aktivitesini sağlayarak lipid peroksitlerin indirgenmesini katalizler [26]. Erastin glutamat/sistin antiportu sistem $Xc^-$'yi inhibe eder [27]. Erastin bu sistemi baskıladığı için hücre içindeki glutatyon seviyesinin düşmesine ve hücrenin oksidatif hasara hassasiyetinin artmasına neden olur. Glutatyon 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 glutatyonu oksitlenmiş formu olan glutatyon disülfite (GSSG) çevirir [29].




**Şekil 2-6. Sistem $X_c^-$ işlevi**

Sistem $Xc^-$, hücre membranında bulunan $Na^+$ bağımlı bir sistein-glutamat antiporterıdır. Hücre içinde bulunan glutamatı hücre dışına atarken, hücre dışında bulunan sistini hücre içine taşır. Hücre içine alınan sistin daha sonra glutatyon (GSH) sentezinde kullanılmak üzere sisteine dönüştürülür. Sistein, glutamat ve glisinle birleşerek glutatyonu oluşturur. Glutatyon, lipid tamir enzimi olan glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX4) aktivitesi için gereklidir. GPX4, lipid hidroperoksitlerini alkole ve serbest hidrojen peroksitlerini suya dönüştürmek için glutatyonu oksitlenmiş formu olan glutatyon 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 aktitivitesini geri dönüşümsüz bir inhibe 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 reaksiyonuyla doğrudan katalize edebilir. Lipid peroksidler hücre içinde zamanında detoksifiye edilmezse, lipid alkoksi (RO•) radikallerine dönüşerek hücrede birikir ve bu birikim ferroptoza 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 proteinidir. Ferritinofaji olarak adlandırılan ferritinin NCOA4 ile otofajik degradasyona uğraması, hücre içine serbest demir saldığı için ferroptoz duyarlılığını arttırır (Şekil 2-7) [33].

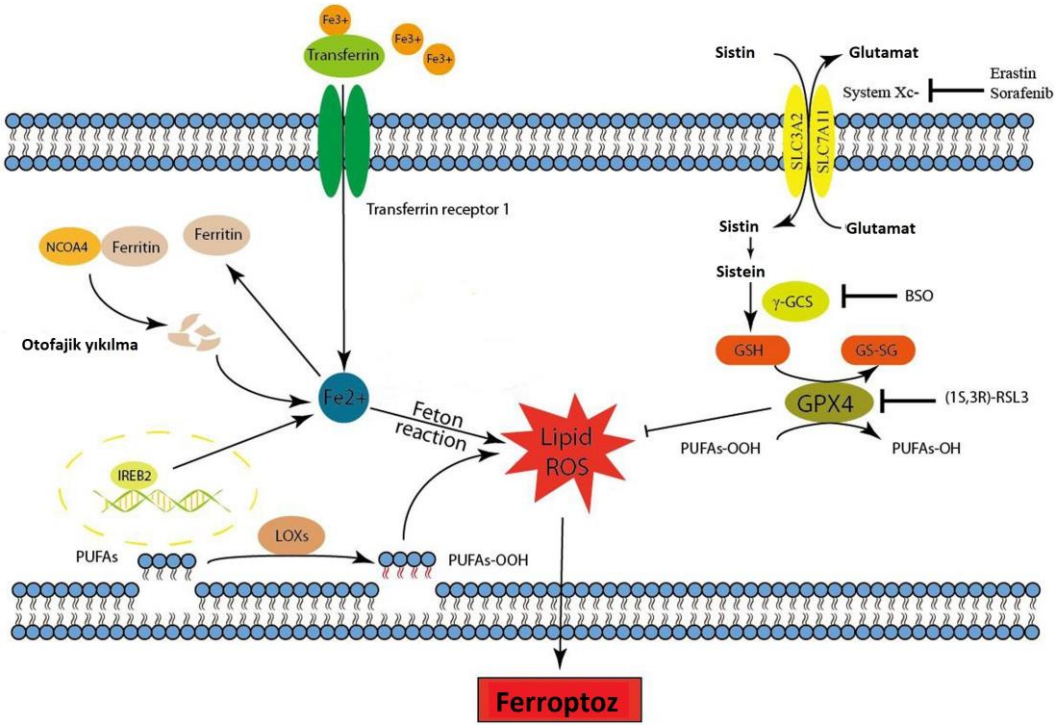
Demir, transferrin reseptörü 1 (TfR1) aracılığıyla transferrin (Tf) proteinine bağlı olarak endositoz ile hücre içine taşınır [32]. Yapılan çalışmalar, Tf'nin ferroptotik hücre ölümünün indüksiyonu için önemli bir bileşen olduğunu göstermiştir [34]. Hücre içinde bulunan sebest demir havuzunun tolere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

Feroptoz aktivatörlerinin tanımlanması 2003 yılında feroptozun keşfinden önce olmuştur. İlk tanımlanan feroptotik 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 moleküllü 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, glutatyon 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 $CoQ_{10}$ degredasyonu | GPX4 proteinini hedef alır ve aynı zamanda SQS-mevalonate yolağı aracılığıyla $CoQ_{10}$ degredasyonuna sebep olur |
| **Sınıf 4** | FINO2 | Lipid peroksidasyonunu arttırması | Demirin oksidasyonunu sağlayarak lipid peroksidasyonuna neden olur, dolaylı olarak GPX4 aktivitesini inhibe eder |

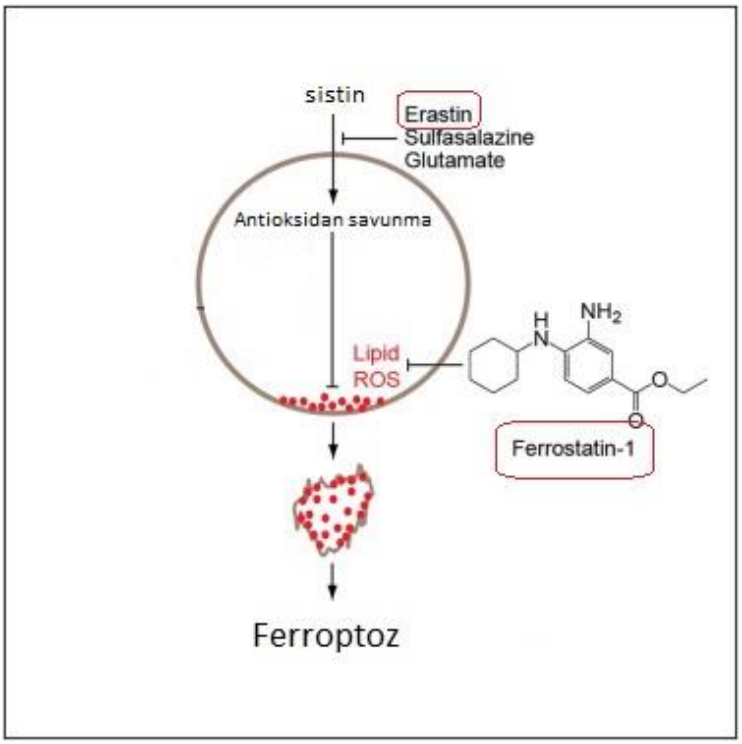
Yapılan çalışmalarda belirli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek çeşitli ferroptoz inhibitörleri tanımlanmıştır [31] (Tablo 2-3). Sınıf 1 inhibitörü olan demir şelatörleri, lipoksijenazları (LOX'ler) inhibe ederek lipid peroksidasyonunun başlamasını engellerken aynı zamanda Fenton reaksiyonunu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

Ferroptoz aktivatörü olarak seçilen erastin 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 yakalayarak detoksifiye eder. Hücreyi lipid peroksidasyonundan koruyarak ölüme gitmesini engeller [31].

### 2.2.3. Ferroptoz ile İlişkili Genler

Bugüne kadar ferroptozu düzenleyen ya da feroptoz 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 |
|---|---|---|
| ***ACSL4*** | Acyl-Coa synthetase long-chain family member 4 | Serbest yağ asitlerini açil-coA esterlerine dönüştürür. Lipid biyosentezinde kilit rol oynar. Ferroptoz için gereklidir. |
| ***ALOX*** | Lipoxygenases | Ferroptozda çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda rol oynar |
| ***CISD1*** | CDGSH iron sulfur domain 1 | Mitokondriyal demir havuzunu düzenler |
| ***DPP4*** | Dipeptidyl-dippeptidase-4 | Lipid peroksidasyonunu indükler |
| ***GCLC/GCLM*** | Glutamate-cysteine ligase | Glutatyon biyosentezinde görevlidir |
| ***GLS2*** | Glutaminase 2 | Glutaminin parçalanması ve ferroptoz için gereklidir |
| ***GPX4*** | Glutathione peroxidase 4 | Ferroptozu baskılamak için membran fosfolipid hidroperoksitlerini azaltır |
| ***GSS*** | Glutathione synthetase | Glutatyon biyosentezinde görevlidir |
| ***PTGS2*** | Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 | Prostoglandin biyosentezinde görevlidir ve GPX4 inhibitörleri tarafından indüklenir |
| ***SAT1*** | Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1 | Lipid peroksidasyonunu indükler |
| ***SLC7A11*** | Solute carrier family 7 member 11 | Sistem Xc-'yi oluşturun alt birimlerden birini oluşturur, hücre içine sistin alınmasında görevlidir. |
| ***TFRC*** | 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 ferroptoza 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 hücresel 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 açil-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 bulanan lipidlerin ve dolayısıyla lipid peroksidasyonu için gerekli olan substratın azalması sağlayarak hücreyi ferroptoza 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. Sistin hücre içinde sisteine 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 monoksid, 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 sığır serumu (FBS) ve %1'lik antibiyotik bulunan solüsyonda %5 $CO_2$ ve 37$^{o}$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 |
| Ferrostatin-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 konsatrasyonu 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 çözüldükten 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 Çözülmesi**

Hücreler buz üzerinde sıvı azottan çıkartıldıktan sonra 37°C su banyosunda 5 dakika bekletildi. Çözülen 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 çözündü. Elde edilen hücreler 8 mL %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren EMEM kültür medyumu ile T-25'lik flaska ekilip %5 $CO_2$ 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 üzeindeki 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 santrüfüj 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 ayırıldı.

**Hücrelerin Dondurulması**

Daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere hücreler dondurulduu. Bunun için hücreler kaldırılıp gerekli miktarda ekimi yapıldıktan sonra kalan hücreler tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. İki farklı dondurma medyumu 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 medyumu damla damla hücrelerin üzerine eklendi ve arada pipetaj yapıldı. Bittikten sonra ikinci dondurma medyumu 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 konsantasyon triplike 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 çözündükten 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 akış 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 $CO_2$ 37 ºC 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 ºC'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 içerisinden çıkan 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 ºC'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 $dH_2O$ ile sulandırıldı. Her bir RNA örneği için aşağıdaki gibi karışım hazırlandı.

| | |
|---|---|
| RNA+dH2O | :15 µL |
| 5X iScript Reaksiyon Miksi | :4 µL |
| iScript Ters Transkriptaz | :1 µL |
| Toplam | :20 µL |

Hazırlanan tüpler BioRAD T100™ Thermal Cycler 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 hesaplamanması 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 $C_t$ ($\Delta C_t$) değeri elde edildi. $\Delta C_t$ değerlerinden çalışmada kullanılan ve elde edilen $C_t$ değerlerinin normalizasyonunu sağlamak için bir kalibratör oluşturuldu. Bu kalibratör değeri elde edilen $C_t$ değeri delta $C_t$ ($\Delta C_t$) 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 Analizi | 95°C 5 saniye<br>65°C 1 dakika<br>97°C sürekli | |
| Soğutma | 40°C 20 saniye | |

**Tablo 3-6. qRT-PZR'de kullanılan primerler**

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

# 4. BULGULAR

## 4.1. Hasta Grubunun Özelliklerinin Değerlendirilmesi

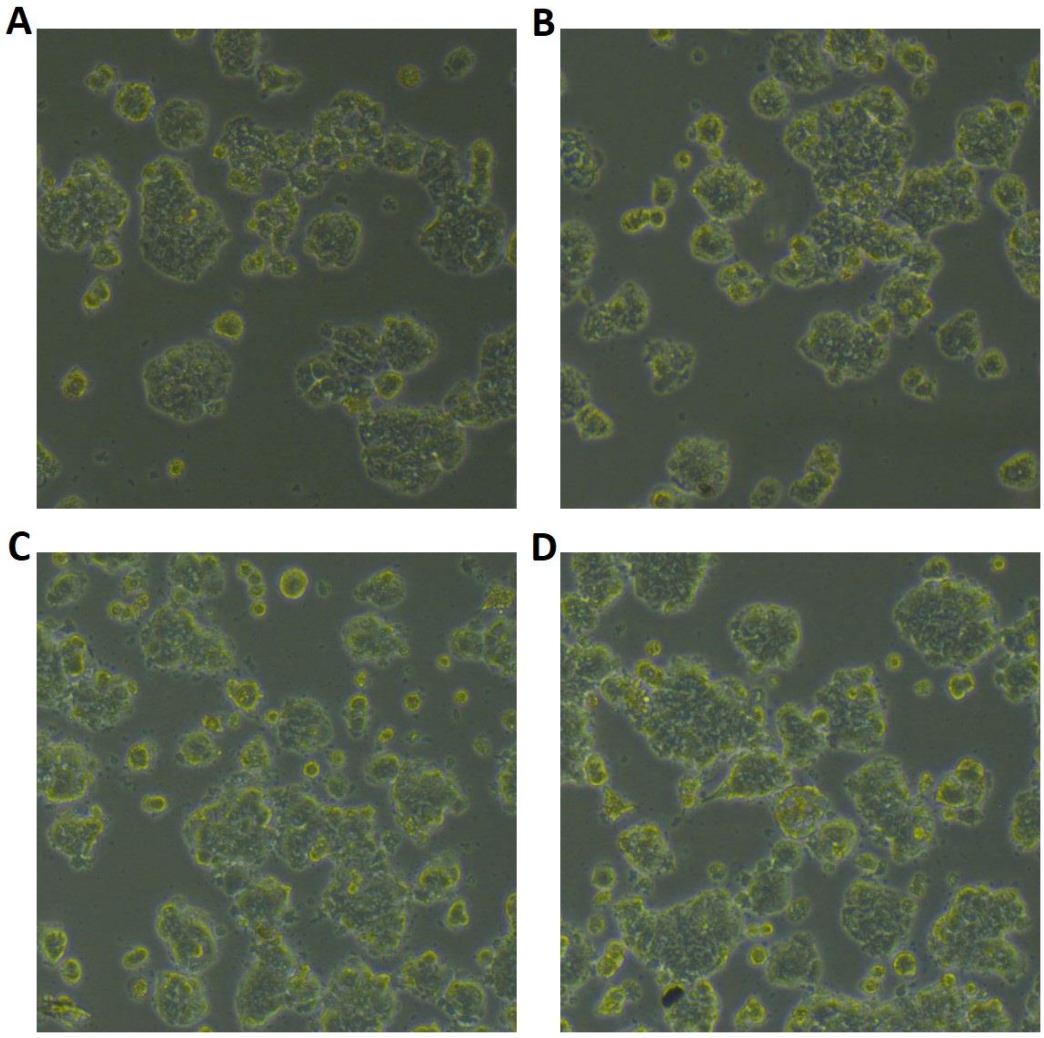
Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrollerin özellikleri Tablo 4-1'de verilmiştir.

**Tablo 4-1. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri**

| **ÖZELLİKLER** | **Gruplar** | |
|---|---|---|
| | **Alzheimer (n=25)** | **Kontrol (n=21)** |
| **Cinsiyet, N (%)**<br>**Kadın**<br>**Erkek** | <br>12 (%48)<br>13 (%52) | <br>9 (%42,8)<br>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

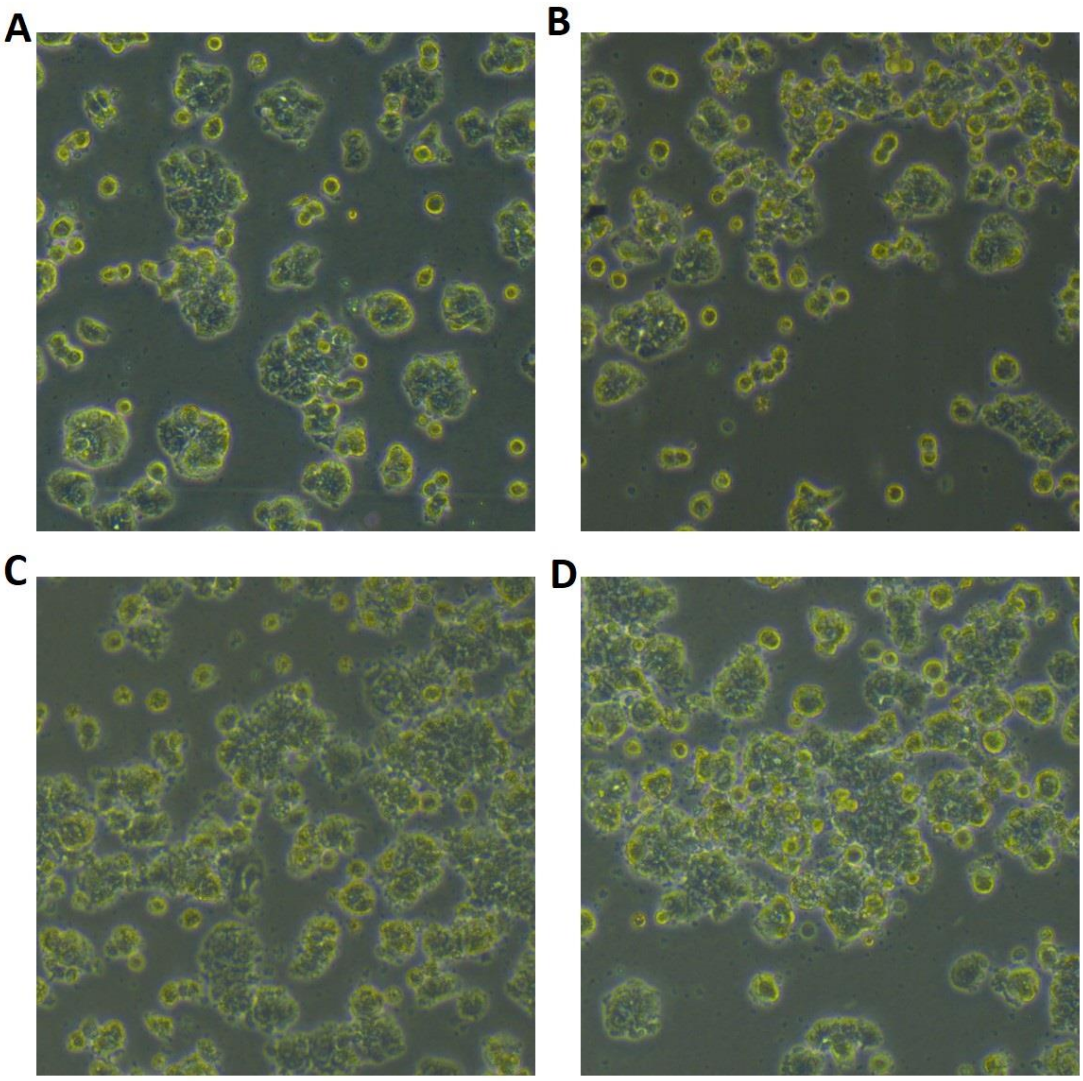
Ferroptozu uyaran en düşük optimum erastin konsantrasyonunu bulmak için 10µM, 15µM, 20µM ve 25µM konsantrasyonda denemeler gerçekleştirildi. (Şekil 4-1 / Şekil 4-2). Bunun sonucunda, negatif koşul %100 olarak kabul edildiğinde 10, 15, 20 ve 25 µM konsantrasyonlar için canlılık oranları sırası ile %70,54,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

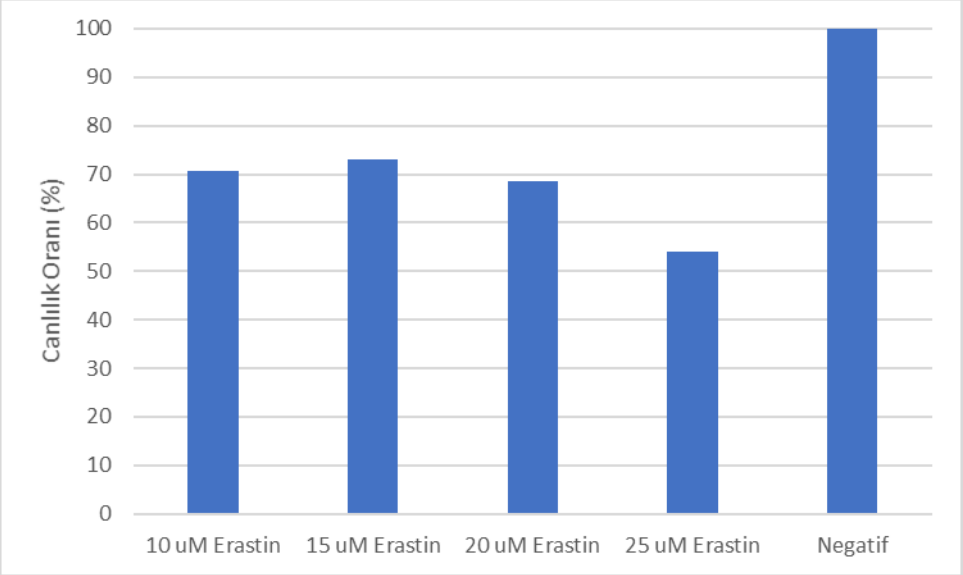
Belirtilen konsantrasyonda erastin ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü




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

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

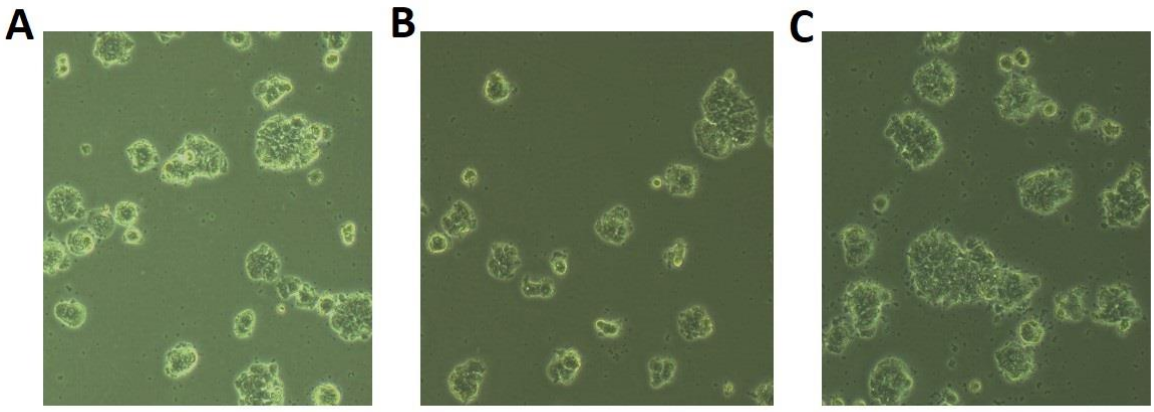
Belirtilen konsantrasyonda erastin ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü




**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.

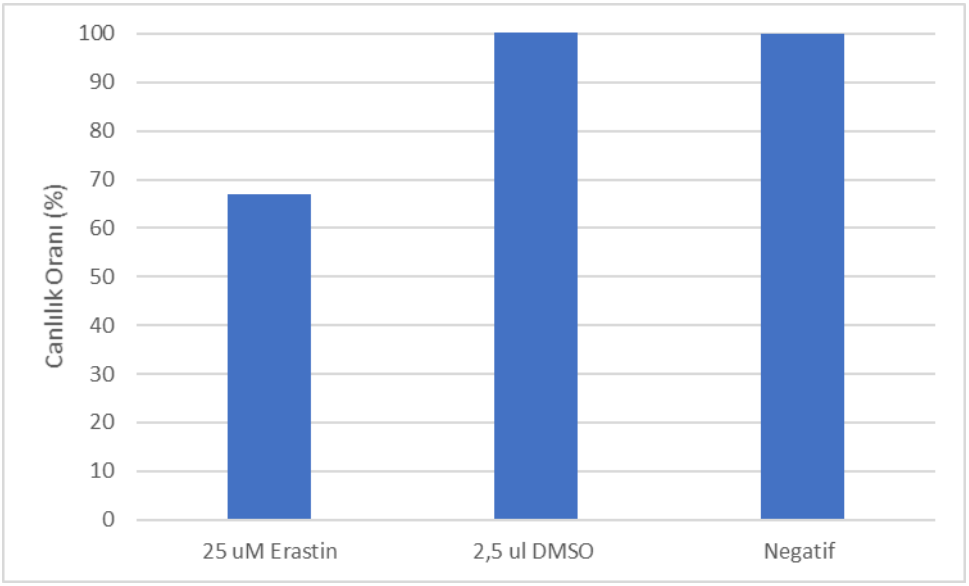
Bu sonuçlara göre optimum Erastin konsantrasyonu 25 µM olarak belirlendi ve deney tekrarlandı (Şekil 4-4). Canlılık oranı negatif koşul %100 kabul edilirse 25µM Erastin eklenen koşulda %66,84, 2,5µL DMSO koşulunda %107,25 olarak hesaplandı (Şekil4-5).




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

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

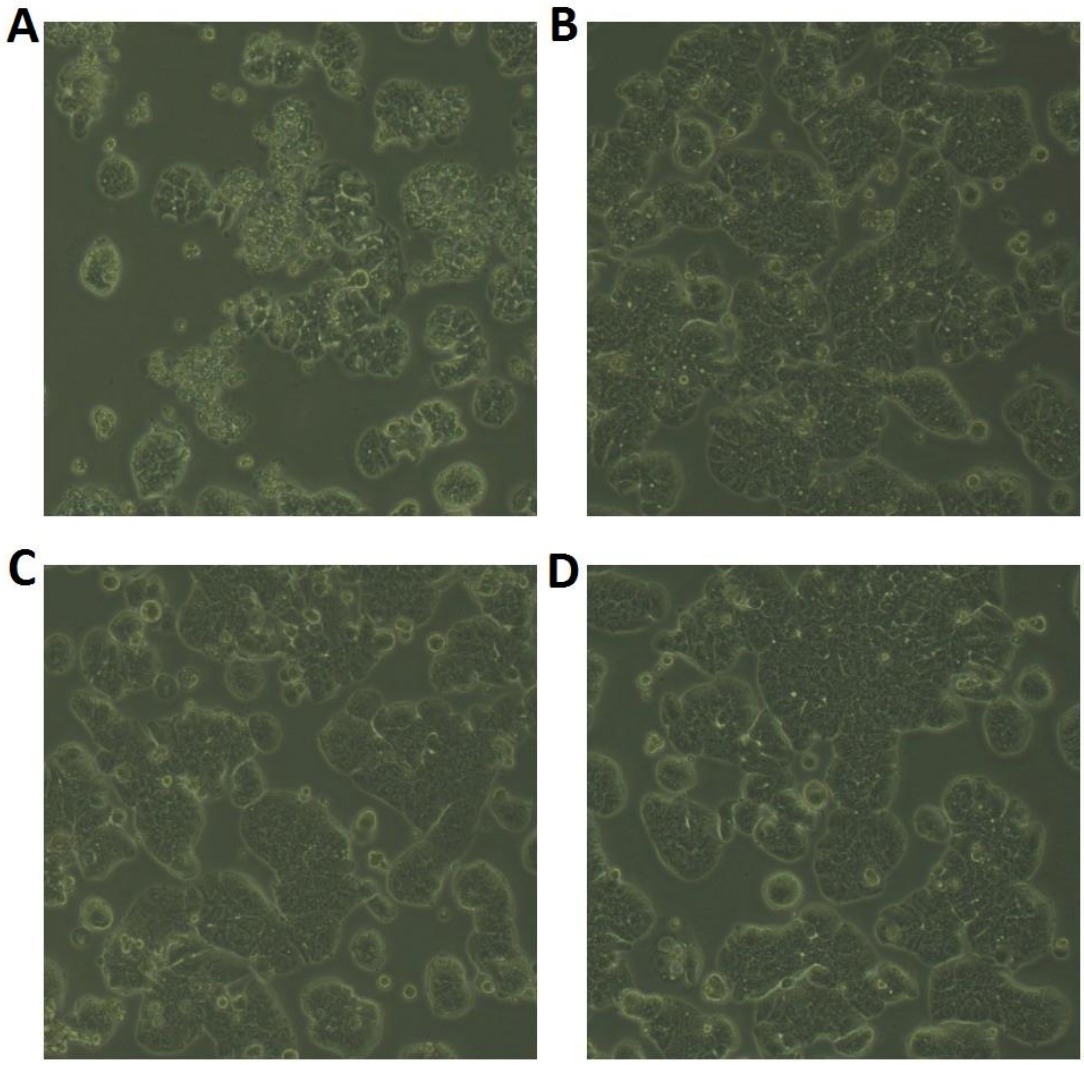
Belirtilen konsantrasyonda erastin ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü




**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).

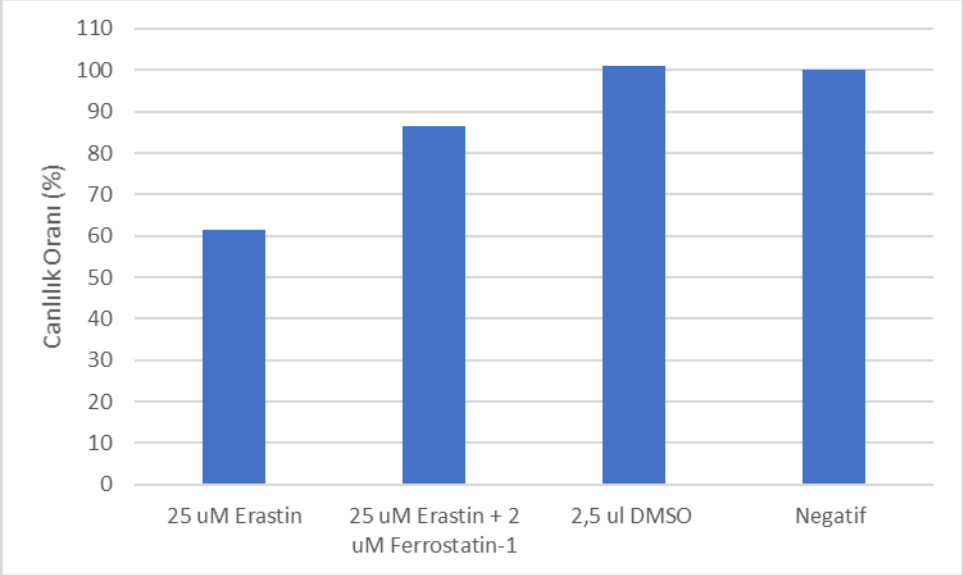



**Şekil 4-6. HEPG2 hücrelerinin 10X objektifteki mikroskopik görüntüsü.**

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

**(D) Negatif**

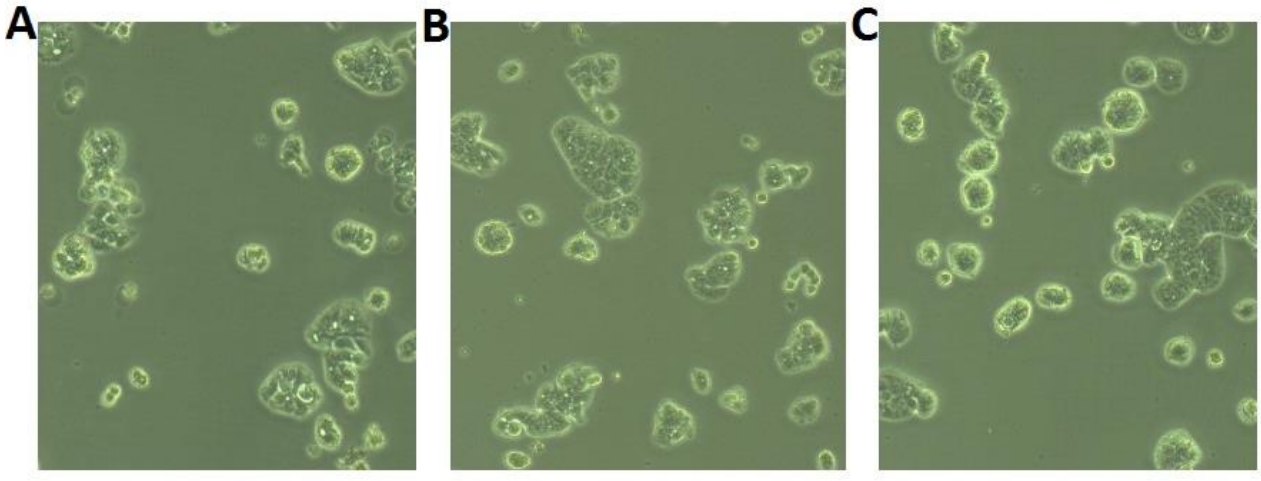
Belirtilen konsantrasyonda erastin, ferrostatin-1 ve DMSO ile 24 saat muamele edilen HEPG2 hücrelerinin mikroskopik görünütüsü




**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.

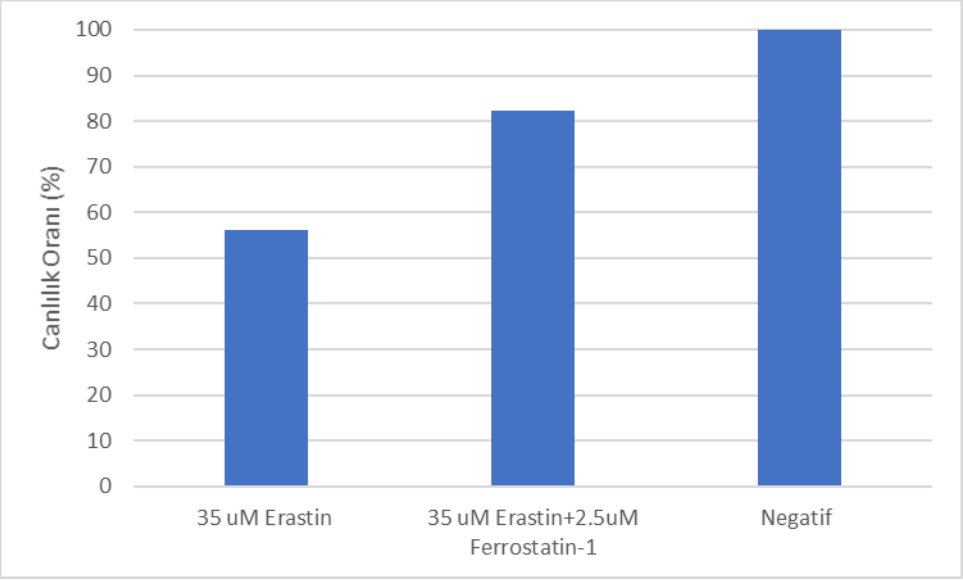
Daha sonra erastin konsantrasyonu arttırılarak 35µM ve ferrostatin-1 konsantrasyonu arttırılarak 2,5 µM olacak şekilde 6-kuyulu kültür plate'i kullanılarak tekrarlandı (Şekil 4-8). DMSO koşulunu aradan kaldırmak için Erastin maddesine kültür medyumu ile ara stok yapıldı. Toplam besiyerinde DMSO oranı 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 objektifteki 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 görünütüsü

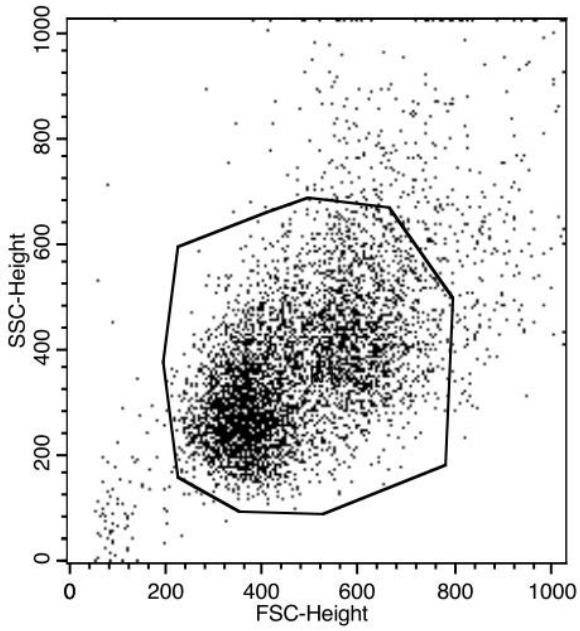



**Şekil 4-9. HEPG2 hücrelerinin 35µM Erastin ve 35µM Erastin +2,5 µM Ferrostatin uygulaması sonunda canlılık oranlarının negatife göre kıyaslanması**

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

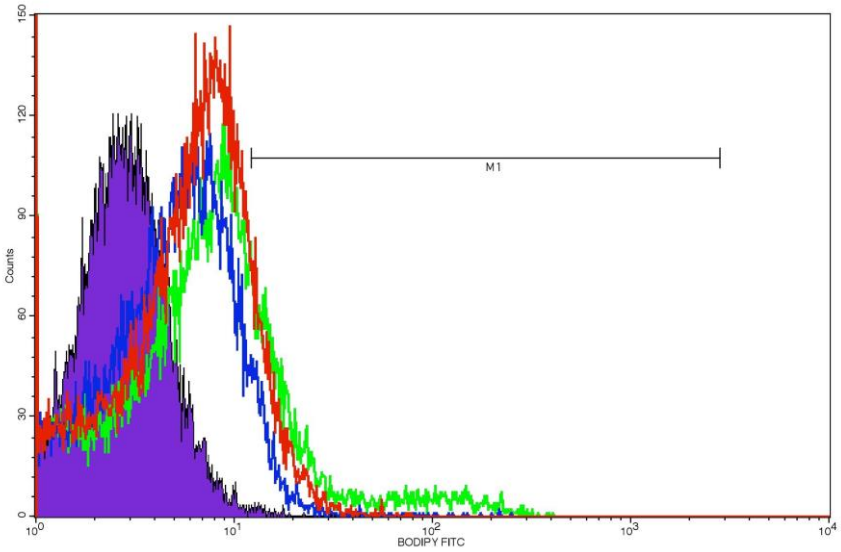
### 4.3. Akım Sitometri Deneyleri

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.

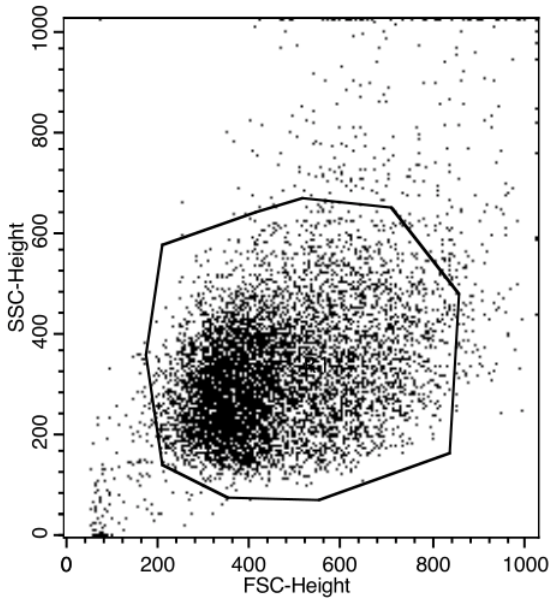



**Şekil 4-11. Akım sitometri sonuçları**

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

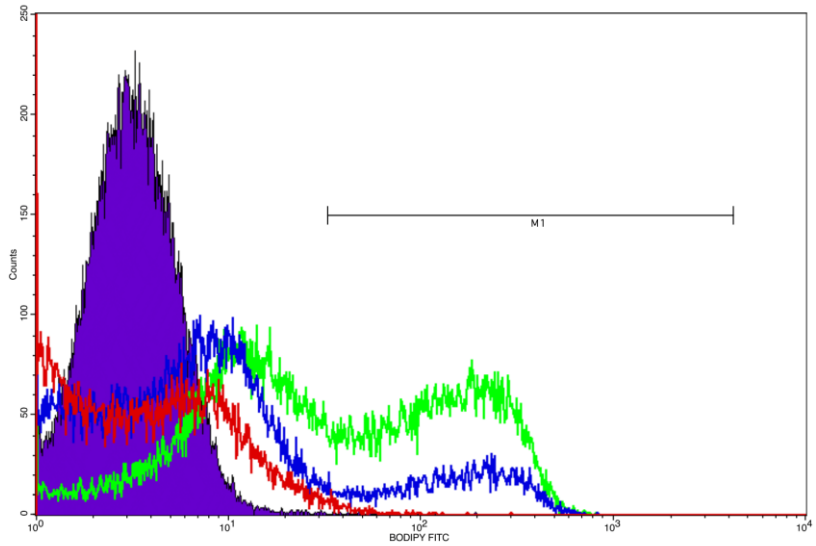
Bu histogram analizinde y ekseni ölçümü yapılan hücrelerin sayısını gösterirken x ekseni lipid peroksidasyonunu ölçen floresanın şiddetini göstermektedir. Bu değerlere göre 25 µM erastin eklenen koşulda lipid peroksidasyonunun %5,43 oranında arttığı ve ferrostatin-1 eklenen koşulda %2,18 oranında arttığı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

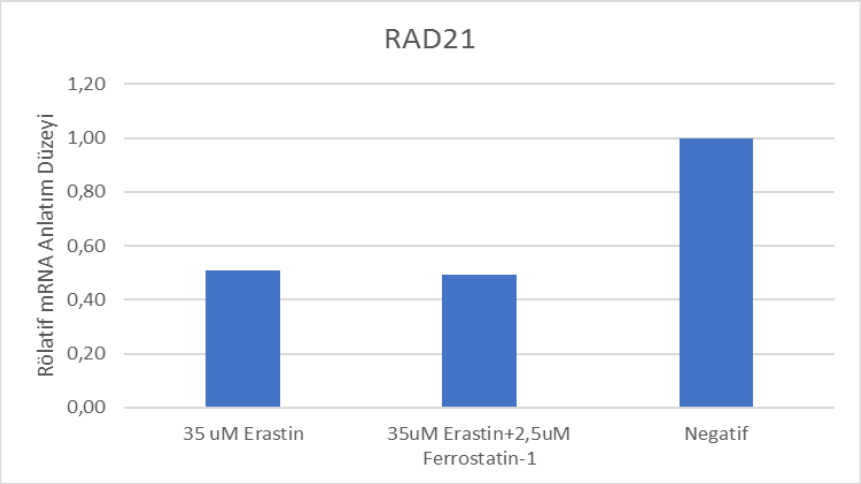
### 4.4. qRT-PZR Sonuçları

Alzheimer hastalığı ve ferroptozla ilişkili genlerin ekspresyon değişimleri hücre kültürü materyalerinde 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.

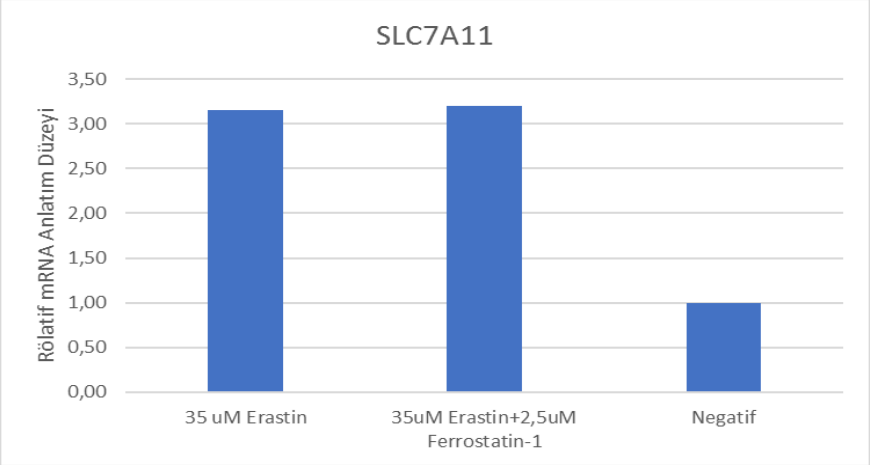
*RAD21* geninin ekspresyon düzeyinin 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,51 kat azaldığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 0,49 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4-14).




**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.

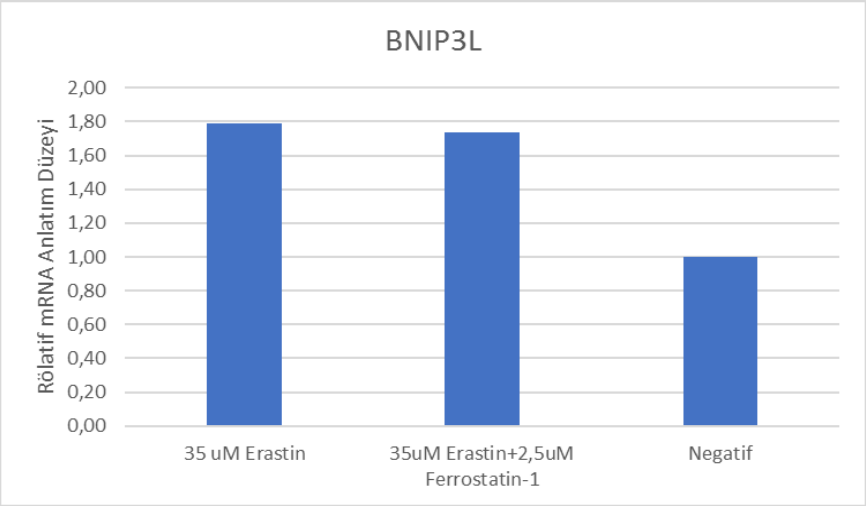
*SLC7A11* ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 3,16 kat arttığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 3,20 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-15).




**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.

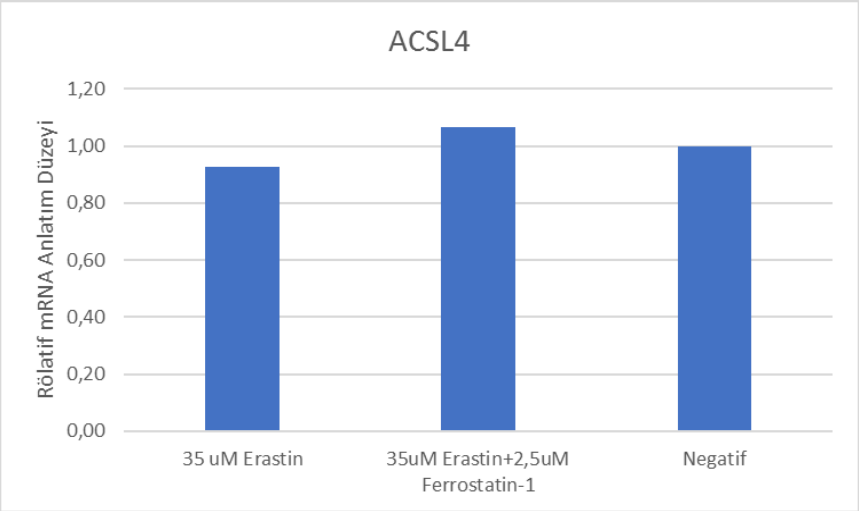
*BNIP3L* ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 1,79 kat arttığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 1,74 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4-16).




**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.

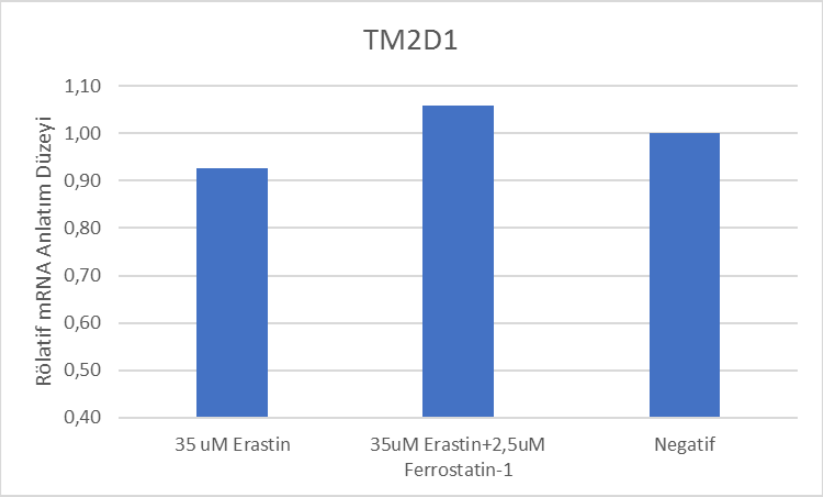
*ACSL4* ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,94 kat azaldığı ancak 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda 1,07 kat arttığı görülmüştür. (Şekil 4-17).




**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.

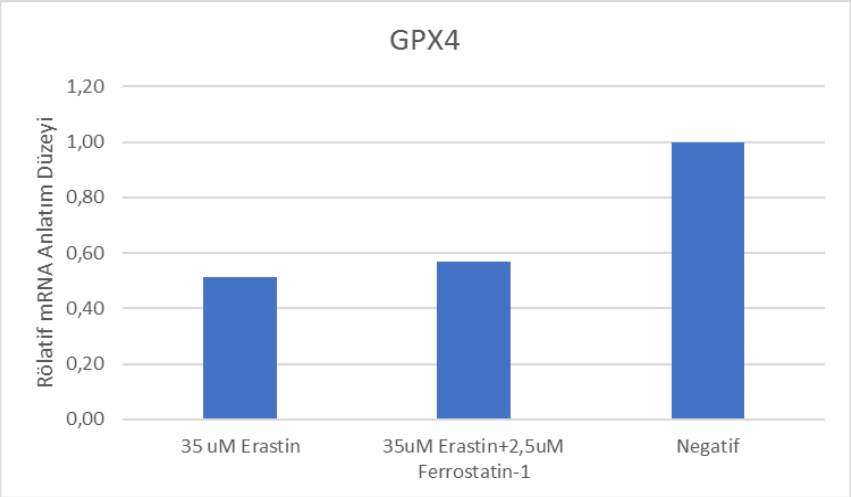
*TM2D1* ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,93 kat azaldığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda ise 1,06 kat arttığı belirlenmiştir. (Şekil 4-18).




**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.

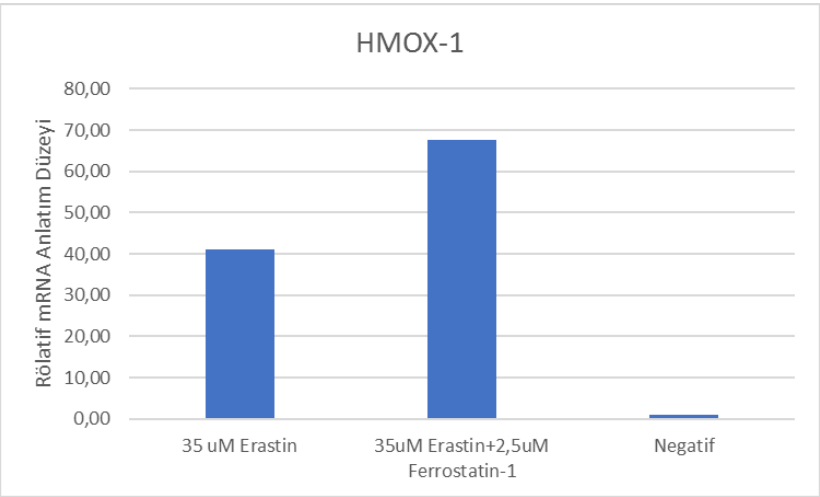
*GPX4* ekspresyonunun 35µM Erastin koşulunda negatife göre 0,51 kat azaldığı 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda 0,57 kat azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4-19).




**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.

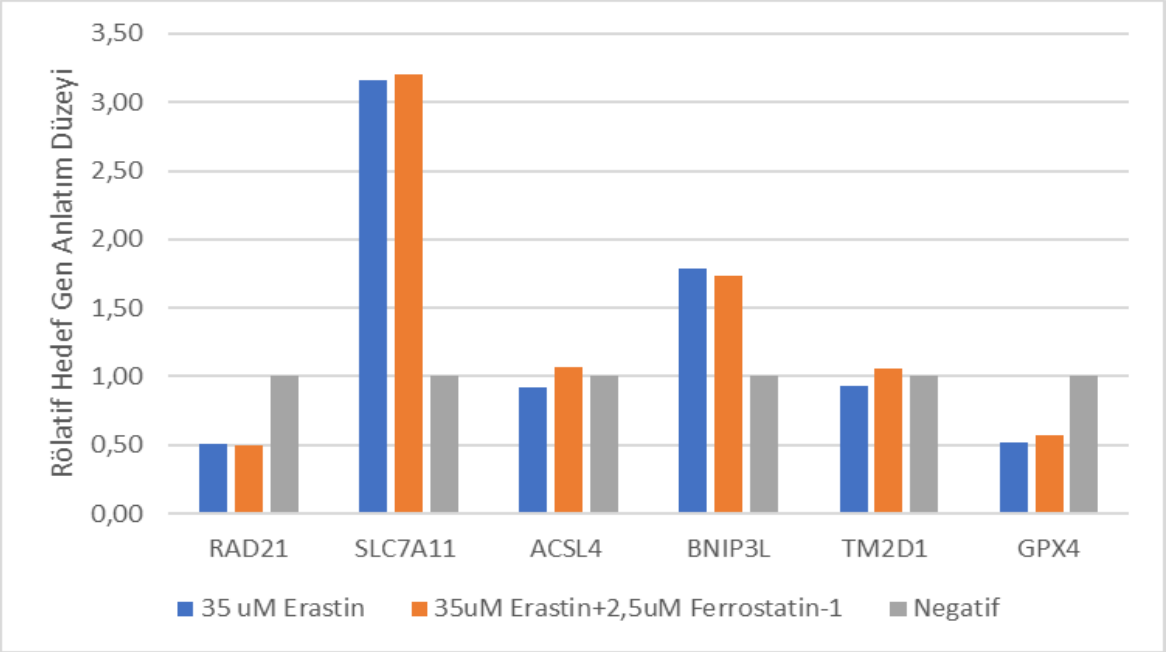
*HMOX-1* geninin ekspresyonunda oldukça dramatik bir değişim gözlenmiştir. 35µM Erastin koşulunda negatife göre 41,14 kat artış görülürken 35µM Erastin+2,5 µM Ferrostatin-1 koşulunda 67,65 kat artış gösterilmiştir (Şekil 4-20).




**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).

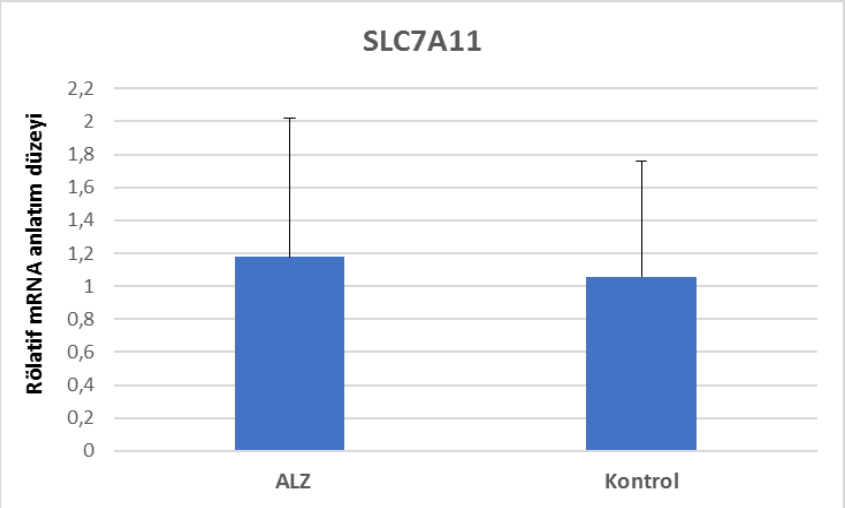



**Şekil 4-21. Hedef genlerin hücre kültüründe anlatım düzeyleri**

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

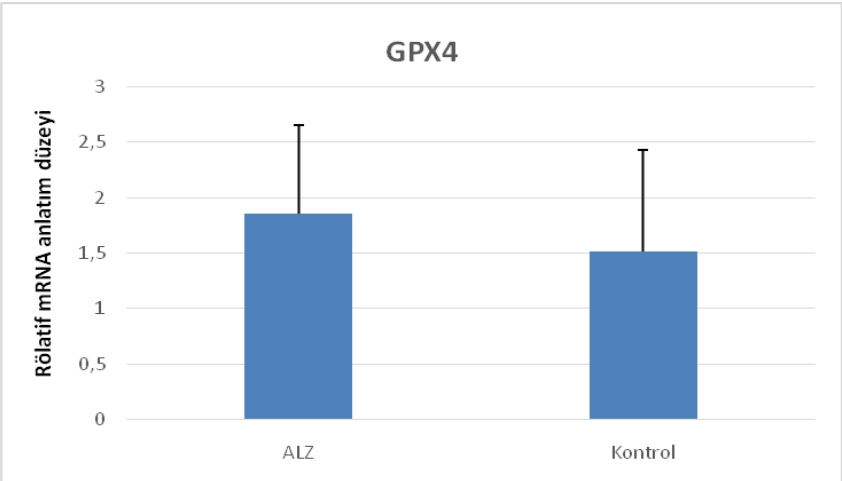
*SLC7A11* ve *GPX4* ekspresyon düzeyleri, 25 Alzheimer hastası ve 21 kontrolde incelenmiştir. *SLC7A11* geninin ekspresyon düzeyinin Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre 1,177 kat arttığı görüldü ancak bu artışın istatiksel olarak anlamlı ($p$=0,783) olmadığı belirlendi (Şekil 4-22).




**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 istatiksel 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 patogenezlerinde 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 peroksasyonunu 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 yakalayarak detoksifiye edilmesini sağlar ve hücreyi ölümden kurtarır [22]. Bu yolakta bir gen ekspresyon değişiminin olmaması muhtemeldir. Bahsedilen mekanizmalar protein veya enzim düzeyinde olan değişikliklerdir. Dolayısıyla sadece erastin eklenen koşulla 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 yanıttan sorumlu mikroglia hücreleri bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada mikroglia 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 yolaktan 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 peroksidayonunun 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 anlatımın 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 ifadesinnde bir değişim görülmemiştir. Genin bu yolaktan 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 monoksid, biliverdin ve demire dönüştürmesiyle hücrede demir kaynağının oluşmasına katkıda bulunur. *HMOX-1* gen ifadesinin arttırılması 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 arttırılması da ferroptoz sürecini hızlandırdığı görülmüştür. Ancak yine aynı deneyde ferrostatin de 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 değiştirmiş olabilir. 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 yolakların farklı olması bir değişim görmememizin sebebi olarak düşünülebilir. Erastin, etkisini ferroptozda sistin/glutamat antiporterını 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 arttırılması ayrıca gen ekspresyon deneylerine eşlik edecek protein deneylerinin de olması bu genlerin AH üzerinde rolünün aydınlatılması açısında 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.biopsych.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
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
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). I Ron S Tatus and N Eural F Unctioning . 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 Fe 2 + 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%0Ahttp://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** **Tarih : 12.11.2018**
**Konu: Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA hk.**

**Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA**
**Tıbbi Genetik**

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

Sorumlu araştırıcılığını 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**

**Eki:** İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

# PATENT HAKKI İZNİ

**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**

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

ORIJINALLIK RAPORU

| %4 | %1 | %1 | %4 |
|---|---|---|---|
| BENZERLIK ENDEKSI | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCI ÖDEVLERI |

BIRINCIL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | Submitted to Istanbul University<br>Öğrenci Ödevi | %2 |
| 2 | Submitted to Hacettepe University<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 3 | Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 4 | docplayer.biz.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 5 | pharmacy.erciyes.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | www.journalagent.com<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 7 | "Encyclopedia of Signaling Molecules", Springer Nature, 2018<br>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** | pinar-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/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

## Özel İlgi Alanları (Hobileri):