

## ÖZET

Nörodejeneratif hastalıklar, beynin spesifik bölgelerindeki nöronların progresif ve geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize edilen bir grup patolojiyi içermektedir. Nörodejeneratif hastalıklar göreceli olarak sıklıkla görülmekte, medikal ve sosyal açıdan önemli problemler yaratmaktadır. Bu patolojiler esas olarak hayatın ileri dönemlerinde nörolojik olarak normal bireylerde ortaya çıkmaktadır. Alzheimer hastalığı da en sık rastlanılan nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Alzheimer hastalığında hipokampal ve kortikal nöronların kaybına bağlı kognitif (bilinç) fonksiyonlarda ve hafızada bozulma olmaktadır. Tau olgun nöronlarda bulunan mikrotübül uyumlu bir proteindir. Taupatiler, nörofibrillerde ya da gliafibrillar formlarında Tau proteinin patolojik birikimi ile uyumluluk gösteren nörodejeneratif hastalık grubuna verilen addır. Taunun hiperfosforile olması Tau'nun biyolojik aktivitesini baskılar ve sonuçta Tau kümelenmeleri meydana gelir. Bu çalışmanın amacı, sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan roskovitin glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) temelli taupatilerdeki etkisinin insan sinir hücre modelinde araştırılmasıdır. Roskovitin nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS hücrelerindeki terapötik etkisi önce hücre sağ kalımı ve apoptotik parametrelerle araştırıldıktan sonra Taupati açısından roskovitin rolünü anlayabilmek için Alzheimer belirteçleri parametre olarak kullanıldı. Araştırmanın en son aşamasında da roskovitin GSK-3 $\beta$  sinyal yolağı ve GSK-3 $\beta$  substratı olan  $\beta$ -kateninle ve ayrıca ROS oluşumu ile olan ilişkileri ortaya konmaya çalışıldı.

Bu çalışmada roskovitin uygulamasının hücre canlılığında azalmaya ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Roskovitin 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarının hücre canlılığını sırasıyla % 20 ve 50 oranında azaltmıştır. Bu sonuçlara bakılarak SK-N-AS hücrelerinin CDK inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu ortaya konulmuş olmaktadır. 10  $\mu$ M roskovitin uygulamasında hücre sağ kalımının kayda değer bir şekilde azaldığı belirlendi. Ayrıca SK-N-AS hücrelerinde roskovitin uygulamasının koloni oluşumuna etkisi araştırıldı ve 10  $\mu$ M roskovitin uygulamasının koloni oluşumunu azalttığı bulundu, buna ilave olarak 1 ve 10  $\mu$ M

roskovitin uygulaması ile soft agar içinde oluşan kolonilerin çaplarında kayda değer azalma bulundu. Bütün bu veriler roskovitin hücre ölümünü teşvik ettiğini açıkça ortaya koymaktadır.

Araştırmanın bundan sonraki aşamasında roskovitin ile tetiklenen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik biyobelirteçler irdelendi ve SK-N-AS hücre hattında mitokondri membran potansiyelinde oluşan kaybın mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu tetiklediği saptandı. Ayrıca SK-N-AS hücre hatlarında 1 µM roskovitin uygulamasının Tau proteininin anlatımında azalmaya sebep olduğu belirlenirken, 10 µM roskovitin uygulamasında Tau protein ifadesinde kontrole oranla bir değişiklik saptanmadı. Ayrıca kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1 µM roskovitin uygulaması ile Alzheimer hastalığının belirteci Amiloid β peptidinde azalma belirlenirken, 10 µM roskovitin uygulamasında protein ifadesinde artış saptandı. Bir diğer Alzheimer biyobelirteci APP protein ifade düzeyi incelendiğinde 1 ve 10 µM roskovitin uygulamaları sonucunda kontrol hücrelerine oranla azalmaya sebep olduğu saptandı, buna karşın, 1 ve 10 µM roskovitin uygulamaları kontrol hücrelerine oranla nörofilament protein ifadesinde artışa neden oldu. Diğer Alzheimer biyobelirteçleri BACE ve α-sinukleine 1 ve 10 µM roskovitin uygulandığında, BACE protein ifade düzeyinde artış olduğu ve α-sinukleine ifadesinde ise değişiklik olmadığı belirlendi. Özetle Alzheimer'ın biyokimyasal belirteçlerinden olan Amiloid β ve Tau' nun 1 µM roskovitin uygulaması sonucu protein ifadelerindeki azalışa neden olarak apoptozu tetiklemektedir. Böylelikle anti- ve pro-apoptotik biyobelirteçlerin değişimi ile beraber roskovitin apoptoz üzerindeki teşvik edici etkisi onaylanmış olmaktadır. Ayrıca roskovitin, GSK-3β ve β-katenini inhibe ederek apoptozu teşvik ettiği de bu çalışmada belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında elde edilen bulgulara göre, nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS'da roskovitin apoptotik mekanizmayı tetiklediği açıkça ortaya konmuştur. Bu durumda roskovitin Taupatik değil de apoptotik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Roskovitin taupatilerdeki etkisinin CDK5 ve GSK-3β ilişkili sinyal yolları ile ilişkili olarak daha detaylı araştırmalar yapılması hedeflenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer, Nörodejenerasyon, Tau, Roskovitin, Apoptoz, GSK-3β, Reaktif Oksijen Türevleri

## SUMMARY

Neurodegenerative diseases are characterized by a group of pathology including progressive and irreversible loss of neurons at specific spaces in human brain. Neurodegenerative diseases are increasing relatively and create medical and social problems. These pathologies basically arise neurologically at old ages of normal people these pathologies are diverse and Alzheimer disease is the leading neurodegenerative disease. Alzheimer disease is cognitive and memory loss disorder related to the hippocampal and cortical neuron cells loss. Tau is microtubule-associated protein found mostly in mature neurons. Tauopathies are a class of neurodegenerative diseases associated with the pathological aggregation of Tau protein in neurofibrillary or gliofibrillary tangles in the human brain. Hyperphosphorylation of Tau suppresses the biological activity of Tau and causes formation of Tau aggregates. The aim of this study is to investigate the effect of CDK inhibitor roscovitine on GSK-3 $\beta$  based tauopathies in SK-N-AS neuroblastoma cell lines.

To detect the therapeutic effects of roscovitine, cell survival parameters and apoptotic markers were investigated in SK-N-AS neuroblastoma cell lines. Later we tried to reveal the role of roscovitine on Alzheimer markers. At the last step of this research we also searched to be able to show the roscovitine relation with GSK-3 $\beta$  signaling pathway and also GSK-3 $\beta$  substrate  $\beta$ -catenine and ROS formation.

Roscovitine decreased the cell viability and induced apoptosis in this study. Roscovitine at 1 and 10  $\mu$ M concentrations decreased the cell viability by 20 and 50 % respectively. Therefore we established the sensitivity of SK-N-AS cells against CDK inhibitors. 10  $\mu$ M roscovitine treatment resulted the significant decrease in cell viability and the colony formation. In addition 1 and 10  $\mu$ M roscovitine treatments decreased the colony diameters significantly. All these findings showed the apoptosis inducing effect of roscovitine in SK-N-AS cells.

Therefore we focused on the investigation of cell death type which is triggered by the treatment of roscovitine. We used apoptotic parameters by this purpose and we established that mitochondrial apoptotic pathway caused the cell death in SK-N-AS cells by the application of roscovitine. Besides we also observed the decrease in Tau protein expression with 1 mM roscovitine treatment compared to control samples, but not with 10  $\mu$ M roscovitine concentration. In addition, Alzheimer marker Amyloid  $\beta$  peptid expression level decreased by the treatment of 1  $\mu$ M roscovitine but not 10  $\mu$ M roscovitine. Another Alzheimer biomarker APP protein expression level decreased by 1 and 10  $\mu$ M roscovitine treatments compared to control cells. Conversely, 1 and 10  $\mu$ M roscovitine treatments caused the increase in neurofilament protein expression level. Another Alzheimer biomarker BACE protein expression level increased and  $\alpha$ -synuclein exhibited no changes compared to control cells at same experimental conditions.

In summary 1  $\mu$ M roscovitine treatment triggered the apoptosis by decreasing Alzheimer biomarkers Amyloid  $\beta$  and Tau expression levels at SK-N-AS cell line. Therefore we confirmed that roscovitine induces apoptosis by altering both anti- and pro- apoptotic proteins as well as Alzheimer biomarkers. Besides we also established that apoptosis induction due to roscovitine treatment was associated by the modulation of GSK-3 $\beta$  and its substrate  $\beta$ -catenine in SK-N-AS neuroblastoma cell line.

In conclusion, according to our findings obtained at this study, roscovitine induced the apoptotic mechanism in SK-N-AS neuroblastoma cell line. In this case roscovitine did not exert a significant effect on Alzheimer markers. It is necessary to repeat this experiment at *in vivo* conditions. Study on the roscovitine effect on tauopathies in relation with CDK5 and GSK-3 $\beta$  signaling pathway in detail was targeted in future experiments.

**Key Words:** Alzheimer, Neurodegeneration, Tau, Roscovitine, Apoptosis, GSK-3 $\beta$ , Reactive Oxygen Species