

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Makale No: 54

Alzheimer Hastalarında Genel Transkripsiyon Faktörlerinin mRNA Düzeylerinin Amiloid Beta 1-42 Etkisiyle Değişimi

The mRNA Expression Levels of General Transcription Factors Altered in Alzheimer Cases Possibly Due to Amyloid Beta 1-42 Exposure

İD Nazlıcan İLHAN¹, İD Ebru KESKİN¹, İD Erdi ŞAHİN², İD Merve ALAYLIOĞLU¹, İD Bedia SAMANCI², İD Tugay ÇAMOĞLU¹, İD Zuhal YURTTAŞ¹, İD Pelin SORDU¹, İD Sümeyra İLDİZ¹, İD Gülsel AYAZ³, İD Büşra ŞENGÜL YEDİEL⁴, İD Shahd Sahl AZZOUZ⁵, İD Başar BİLGİÇ², İD Haşmet Ayhan HANAĞASI², İD İbrahim Hakan GÜRVİT², İD Duygu GEZEN AK¹, İD Erdinç DURSUN¹

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarları, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Davranışsal Nöroloji ve Hareket Bozuklukları Birimi, İstanbul, Türkiye

³Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Namık Kemal Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Nöroimmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵Alfaisal Üniversitesi, Riyad, Tıp Fakültesi, Suudi Arabistan

ÖZ

Giriş ve Amaç: Alzheimer hastalığı (AD) patolojisinin bir özelliği olan amiloid beta (Aβ) ile ilişkili global gen ekspresyonu değişiklikleri göz önüne alındığında, bu çalışma Aβ'nin spesifik transkripsiyon faktörlerini (TF'ler) düzenlenmesi yoluyla gen ekspresyonunu modüle edebilmesindeki potansiyel rolünü araştırmayı amaçlamıştır.

Yöntemler: Protein-protein etkileşimi tahmin araçları ve transkripsiyonel düzenleyici etkileşimleri veritabanlarının bir kombinasyonunu kullanarak, JUN, FOS, ATF2, ATF4, RELA, NF-κB, SMAD3, STAT1, STAT3 ve SP1'i Aβ1-42 ile ilişkili yollarda yer alabilecek potansiyel aday TF'ler olarak belirledik. Daha sonra, Aβ'nin bu TF'ler üzerinde doğrudan bir etkisini göstermek için in vitro çalışmalar ve insan örneklerinde seçilmiş TF'lerde herhangi bir değişikliği araştırmak için bir vaka-kontrol çalışması yürüttük. İn vitro çalışmalara 0,09 µM ve 10 µM Aβ1-42 uygulanan HEK293 T hücreleri kullanıldı. Transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile değerlendirildi. En yüksek PPI puanlarına sahip olan seçilmiş hedef TF'lerin, yani JUN, FOS ve RELA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri, çekirdek Alzheimer hastalığı (AD) beyin omurilik sıvısı (CSF) biyobelirteci ile doğrulanmış AD vakalarından ve plazma ALZpath pTau217 ile doğrulanmış sağlıklı kişilerden alınan kan örneklerinde de araştırıldı.

Bulgular: İn vitro çalışmalar, çoğu TF'nin mRNA ekspresyonunun Aβ dozu veya uygulama süresi bağlı olarak değiştiğini gösterdi. JUN, FOS, NFKB ve SP1 mRNA ekspresyonu artarken, STAT1 ve ATF2 en az bir doz Aβ uygulamasından sonraki 24 saat içinde azaldı. Kırk sekiz saatlik uygulamada FOS, STAT1, STAT3, ATF2 ve SP1 daha yüksekti, buna karşılık RELA, SMAD3 ve NFKB Aβ uygulanan gruplarda daha düşüktü. Yetmiş iki saatte ATF4 ve NFKB ekspresyonları yüksekti, buna karşın JUN FOS, RELA, STAT1, STAT3, ATF2 ve SP1 Aβ uygulanmış gruplarda düşüktü. İnsan örnekleri, JUN ve RELA'nın mRNA düzeylerinin AD vakalarından alınan kan örneklerinde sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu gösterdi.

Sonuç: Aβ maruziyetine yanıt olarak TF'lerin ifade düzeylerindeki değişiklikler, bu TF'lerin düzenlediği genlerin ifade düzeylerindeki değişiklikleri açıklayabilir. Bu bağlamda, Aβ'nin transkripsiyonel etkilerinin ve TF'ler üzerindeki düzenleyici rolünün anlaşılması, Aβ'nin fizyolojik rolleri ve AD patogenezinin altında yatan moleküler yollar hakkında yeni bir bakış açısı sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: Aβ1-42, Alzheimer hastalığı, transkripsiyon faktörleri, ALZpath pTau217, CSF

ABSTRACT

Introduction: Given the global gene expression alterations associated with amyloid beta (Aβ), a hallmark of Alzheimer's disease (AD) pathology, this study aimed to investigate its potential role in modulating gene expression through the regulation of specific transcription factors (TFs).

Methods: Using a combination of protein-protein interaction prediction tools and transcriptional regulatory interaction databases, we identified JUN, FOS, ATF2, ATF4, RELA, NF-κB, SMAD3, STAT1, STAT3, and SP1 as potential candidate TFs that might be involved in Aβ1-42 related pathways. We then conducted in vitro studies to demonstrate a direct effect of Aβ on these TFs and a case-control study to investigate any alterations of selected TFs in human samples. In vitro studies included HEK293 T cells treated with 0.09 µM and 10 µM Aβ1-42. The expression levels of the TFs were assessed by qRT-PCR. The mRNA expression levels of selected target transcription factors that have the highest PPI scores, namely JUN, FOS, and RELA, were also investigated in blood samples from core Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) biomarker-confirmed AD cases and plasma ALZpath pTau217-confirmed healthy subjects.

Results: In vitro studies indicated that the mRNA expression of most of the TFs was altered due to either the dose of Aβ or the period of treatments. JUN, FOS, NFKB, and SP1 mRNA expression were increased, while STAT1 and ATF2 were decreased within 24 hours of at least one dose of Aβ treatment. At 48 hours of treatment, FOS, STAT1, STAT3, ATF2, and SP1 were higher, whereas RELA, SMAD3, and NFKB were lower in Aβ-treated groups. At 72h of treatments, the ATF4 and NFKB expressions were high, whereas JUN FOS, RELA, STAT1, STAT3, ATF2, and SP1 were low in Aβ treated groups. Human samples showed that the mRNA levels of JUN and RELA were significantly higher in blood samples from AD cases compared to those from healthy individuals.

Conclusion: Alterations in the expression levels of TFs in response to Aβ exposure may explain the alterations of the expression levels of genes that these TFs regulate. Given that, understanding the transcriptional effects of Aβ and its regulatory role on TFs may provide a perspective for the physiological roles of Aβ and the molecular pathways underlying AD pathogenesis.

Keywords: Aβ1-42, Alzheimer's disease, transcription factors, ALZpath pTau217, CSF

Cite this article as: İlhan N, Keskin E, Şahin E, Alaylıoğlu M, Samancı B, Çamoğlu T et al. The mRNA Expression Levels of General Transcription Factors Altered in Alzheimer Cases Possibly Due to Amyloid Beta 1-42 Exposure. Arch Neuropsychiatry 2026;63:341–349. doi: 10.29399/npa.29229

Öne Çıkan Noktalar

- Çalışma, Aβ-transkripsiyon faktörleri ilişkisini *in vitro* ve AD vakalarında araştırdı.
- Aβ yolları JUN, FOS, ATF2, ATF4, RELA, NF-κB, SMAD3, STAT1, STAT3, SP1'i içerebilir.
- JUN ve RELA mRNA düzeyleri AD vakalarının kan örneklerinde belirgin düzeyde artmıştır.
- Aβ'ye bağlı TF seviye değişiklikleri, hedef genlerin ekspresyon değişikliklerini açıklayabilir.

GİRİŞ

Amiloid beta (Aβ), transmembran bir protein olan amiloid prekürsör proteininin (APP) proteolitik olarak parçalanmasıyla oluşan bir üründür (1). Beyinde Aβ birikimiyle oluşan çözünmez plaklar, Alzheimer hastalığının (AD) temel belirteçlerinden biri olarak kabul edilir. Aβ'nin, nihayetinde nöron dejenerasyonuna ve AD ile ilişkili bilişsel gerilemeye yol açan bir dizi olaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aβ'nin nöronal sinyalleşmeyi bozduğu, sinaptik plastisiteyi engellediği, nöroenflamasyon ve oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Aβ'nin tau hiperfosforilasyonunu indüklediği ve bunun da AD'nin bir diğer belirteci olan nörofibriller yumakların gelişimine yol açtığı bilinmektedir (1-6). Son bulgular, Aβ'nin normal fizyolojik koşullar altında da önemli işlevleri olabileceğini; sinaptik plastisite, nöronal gelişim, nöronal sağkalım, iyon kanallarının oluşumu, kinaz aktivasyonu ve kolesterol taşınımının düzenlenmesi gibi süreçlerde rol oynadığını göstermektedir (7,8).

Aβ'nin fizyolojik ve patolojik koşullardaki rolleri tam olarak anlaşılmamış olsa da, Aβ'nin beyindeki gen ekspresyonu üzerinde belirgin etkileri olduğu bilinmektedir. Aβ'nin enflamasyon, oksidatif stres ve sinaptik işlevlerle ilişkili birçok genin ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Bu değişiklikler, AD'de görülen sinaptik işlev bozukluğu, nöronal ölüm ve bilişsel gerilemeye yol açmaktadır. Ayrıca çalışmalar, Aβ1-42'nin çekirdekte bulunduğunu ve DNA ile etkileşime girebildiğini göstermiştir (7,9,10). Biz ve diğer araştırmacılar, Aβ1-42'nin; amiloidogenezle ilişkili genleri (APP, BACE1, PSEN1 ve PSEN2), tau patolojisiyle ilişkili genleri (TAU, GSK3β ve CDK5), öğrenme ve bellekle ilişkili genleri (GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C, GRIN2D ve GRIN3A), AD ile ilişkili genleri (APOE ve TREM2), koleksiferol yolak genlerini (VDR, CYP24A1, CYP27B1) ve kalsiyum metabolizmasıyla ilişkili genleri (CACNA1C) transkripsiyonel düzeyde düzenleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (7,9-13). Bu genler arasında VDR ve Aβ1-42 ilişkisi özellikle dikkat çekmiştir; çünkü VDR'nin mitokondriyal bir transkripsiyon faktörü (TF) olduğu kanıtlanmıştır (14,15). Bu bilgiler ışığında temel sorularımız şunlardı: 1) Bu değişim, Aβ'nin gen ekspresyonu üzerindeki doğrudan etkisine mi bağlıdır? 2) Aβ maruziyeti sonucunda genel TF'lerin ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerden mi kaynaklanmaktadır? 3) Aβ ile TF'ler arasındaki olası bir etkileşimden mi ileri gelmektedir? Bu olasılıklara dayanarak öncelikle, Aβ1-42'nin prekürsör proteini olan APP ile etkileşime girme potansiyeli bulunan proteinleri FpClass protein-protein etkileşim (PPI) tahmin programı kullanarak *in silico* olarak analiz ettik. APP'nin yüzün üzerinde TF ile etkileşime girebildiğini belirledik (16). Daha sonra, Aβ1-42'nin etkilediğini daha önce gösterdiğimiz genleri düzenleyen TF'leri (5) tanımlamak için TRRUST v2 veri tabanını kullandık (11-13). Son olarak bu TF'leri APP ile etkileşime giren TF setiyle karşılaştırdık. En yüksek PPI skoruna sahip TF'leri Aβ peptidinden etkilenebilecek aday TF'ler olarak belirledik: JUN, FOS, activating transcription factor 2 (Atf2), activating transcription factor 4 (Atf4), RelA, nuclear factor kappa B (NF-κB), Smad3, signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ve Sp1 (5). İkinci soruya yanıt aramak amacıyla, bu çalışmada farklı dozlarda Aβ1-42 uygulamalarına

yanıt olarak ilgili TF ekspresyonlarındaki olası değişiklikleri *in vitro* olarak; ayrıca en yüksek PPI skoruna sahip seçilmiş TF'lerin (JUN, FOS ve RelA) ekspresyon düzeylerini çekirdek AD CSF biyobelirteçleri ile doğrulanmış AD olgularının kan örneklerinde ve plazma ALZpath pTau217 ile doğrulanmış sağlıklı bireylerde incelemeyi amaçladık.

YÖNTEM

Aβ1-42 Tarafından Düzenlenebilecek Aday TF'lerin Belirlenmesi

Önceki çalışmamızda APP için 1133 partner belirlenmişti (16). Bu veri TRRUST v2 veri tabanı (17), ile yeniden analiz edilerek FpClass aracı ve TRRUST verileri birleştirildi ve 17 TF *in silico* olarak tanımlandı (5). Bu çalışmada, en yüksek puana sahip 10 TF'nin (JUN, FOS, Atf2, Atf4, RelA, NF-κB, Smad3, STAT1, STAT3 ve Sp1) (Tablo 1) Aβ1-42 tedavilerine verdiği yanıt *in vitro* olarak; en yüksek PPI skoruna sahip seçilmiş TF'lerin (JUN, FOS ve RelA) düzeyleri ise AD olguları ve sağlıklı bireylerde incelenmiştir.

Hücre Kültürü ve Aβ1-42 Uygulamaları

HEK293T hücreleri (ATCC, CRL-3216), %10 FBS içeren DMEM ortamında altı kuyucuklu plakalara %10 yoğunlukta ekildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. Ortam 2-3 günde bir yenilendi. Aβ1-42'nin fizyolojik ve toksik koşullar altındaki etkilerini değerlendirmek amacıyla, önceki yayınlarımız ve laboratuvar bulgularımız doğrultusunda bir toksik olmayan doz ve bir maksimum toksik doz kullanıldı. Hücreler, yoğunlukları %70-80'e ulaştığında Aβ1-42 (Millipore AG912) ile muamele edildi. Peptit daha önce tanımlanan şekilde PBS içinde çözüldü (11,18). HEK293T hücreleri 0,09 µM veya 10 µM Aβ1-42 ile 24, 48 veya 72 saat inkübe edildi. Uygulamadan sonra ortam değiştirilmedi. Üç bağımsız deney gerçekleştirildi. Sitotoksikite, üretici talimatlarına uygun olarak Cytotoxicity Detection kiti (Roche, 11644793001) ile değerlendirildi (11). Her örnek üç teknik tekrar içeriyordu.

AD Olguları ve Sağlıklı Bireyler

Bu çalışmaya, çekirdek AD CSF biyobelirteçleri ile doğrulanmış 25 AD olgusu ve plazma ALZpath pTau217 ile doğrulanmış yaş uyumlu 23 sağlıklı birey dâhil edildi. Lomber ponksiyon invaziv bir işlem olduğundan, CSF örnekleme yalnızca hasta grubunda yapılmış; kontrol grubunda ise doğrulama kan biyobelirteci (plazma ALZpath pTau217) ile yapılmıştır. Klinik tanı için NIA-AA 2011 kriterleri kullanılmıştır (19). CSF Aβ1-42, total tau (t-Tau) ve fosfo-Tau (p-Tau181) ölçümleri Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı, Sinirbilim Anabilim Dalı, Nörolojik Bilimler Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'da gerçekleştirilmiştir. Bu laboratuvar, Alzheimer's Association Quality Control programının aktif bir katılımcısıdır. Çekirdek AD biyobelirteçleri FUJIREBIO ELISA kitleri kullanılarak üretici protokollerine uygun şekilde ölçülmüştür. Kontrol grubunda pTau217 düzeyleri SIMOA-SRX platformu ve Simoa ALZpath p-Tau217 Advantage PLUS kiti ile değerlendirilmiştir. Otoimmün, enflamatuvar, enfeksiyöz, kronik kalp veya psikiyatrik hastalığı olan; belirgin laboratuvar anormallikleri bulunan; diyabet mellitus veya inme öyküsü olan bireyler çalışma dışı bırakılmıştır. Ek değerlendirmeler yaş, hastalık başlangıcı ve Mini Mental Durum Muayenesi (MMSE) skorlarını içermektedir. Tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmış ve çalışma ilgili etik kurul tarafından onaylanmıştır.

mRNA Ekspresyon Analizi

RNA izolasyonu, hücre kültürlerinden PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher, 12183018A) ve K3EDTA'lı kan örneklerinden QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, 51303) kullanılarak üretici talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır. cDNA sentezi, her örnekten alınan sabit miktarda RNA (20 ng) ile iScript cDNA sentez kiti (Biorad, 1708891) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. JUN, FOS, ATF2, ATF4, RELA, NFKB, SMAD3, STAT1, STAT3 ve SP1 mRNA düzeyleri Universal Probe Library (UPL) problemleri ile LightCycler 480 Probe Master Mix kiti (Roche, 04707494001), ve LightCycler 480 II cihazı (Roche Applied Biosystems) kullanılarak qRT-PCR ile analiz edilmiştir. ACTB, RPL13A and B2M were used as

Tablo 1. FpClass aracından ve TRRUSTV2 veritabanından ve ilgili yayınlardan elde edilen verilerin birleştirilmesiyle seçilen transkripsiyon faktörleri†

		Transkripsiyon faktörleri									
		JUN	FOS	RELA	ATF2	SMAD3	NFKB1	ATF4	STAT1	STAT3	SP1
Aβ1-42 ilişkili Genler	APP	+							+		+
	APOE							+			+
	BACE1			+			+				+
	PSEN1										+
	PSEN2										
	GSK3A			+			+				
	GSK3B						+				
	GRIN1			+			+				+
	iNOS	+	+	+			+		+		
	NGF	+	+								
	VDR	+				+				+	
	CYP24A1										
	CYP27B1			+			+				
APP FpClass PPI Skoru		0,8826	0,8826	0,8391	0,7955	0,7895	0,7459	0,7167	0,6906	0,6126	0,5159

Aβ: Amyloid beta; APP: Amyloid precursor protein; APOE: Apolipoprotein E; ATF2: Activating transcription factor 2; ATF4: Activating transcription factor 4; BACE1: Beta-secretase 1; CYP24A1: 24-hydroxylase; CYP27B1: 1α-hydroxylase; GSK3A: Glycogen synthase kinase 3 alpha; GSK3B: Glycogen synthase kinase 3 beta; GRIN1: Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; NGF: Nerve growth factor; NFKB: Nuclear factor kappa B; PPI: Protein-protein interaction; PSEN1: Presenilin 1; PSEN2: Presenilin 2; STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; VDR: Vitamin D receptor.

†Gezen-Ak, D. ve ark., The Transcriptional Regulatory Properties of Amyloid Beta 1-42 may Include Regulation of Genes Related to Neurodegeneration. Neuromolecular Med, 2018. 20(3): p. 363-375.

Dursun, E., D. Gezen-Ak ve S. Yilmazer, A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-beta and preventing the amyloid-beta induced alterations by vitamin D in cortical neurons. J Alzheimers Dis, 2011. 23(2): p. 207-19.

Dursun, E., D. Gezen-Ak ve S. Yilmazer, Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin D receptor gene and induces the expression of the vitamin D catabolic enzyme gene in hippocampal neurons. Dement Geriatr Cogn Disord, 2013. 36(1-2): p. 76-86.

Dursun, E., D. Gezen-Ak ve S. Yilmazer, A new mechanism for amyloid-beta induction of iNOS: vitamin D-VDR pathway disruption. J Alzheimers Dis, 2013. 36(3): p. 459-74.

endogenous reference genes for normalization. Kullanılan primer ve probalar şu şekildedir: *JUN*: ENSG00000177606,6, UPL probe #41 (Roche, 04688007001); *FOS*: ENSG00000170345,9, UPL probe #46 (Roche, 04688066001); *ATF2*: ENSG00000115966,16, UPL probe #65 (Roche, 4688643001); *ATF4*: ENSG00000128272,14, UPL probe #76 (Roche, 04688996001); *RELA*: ENSG00000173039,18, UPL probe #21 (Roche, 04686942001); *NFKB*: ENSG00000109320,11, UPL probe #22 (Roche, 04686969001); *SMAD3*: ENSG00000166949,15, UPL probe #22; *STAT1*: ENSG00000115415,18, UPL probe #1 (Roche, 04684974001), *STAT3*: ENSG00000168610,14, UPL probe #65 and *SP1*: ENSG00000185591,9, UPL probe #12 (Roche, 04685113001). Prime dizileri Ek Materyal 1'de verilmiştir. PCR'ler daha önceki çalışmalarda olduğu gibi ve üç teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir (11,18).

Statistical Analysis

Hedef genlerin bağıl ifade düzeyleri $\Delta C_t = 2^{-(\text{Housekeeping genlerin geometrik ortalaması} - C_t \text{ hedef geni})}$ formülü kullanılarak belirlendi. Her grup için ham verileri analiz etmek için Graphpad Prism 8 kullanıldı. Veriler tek yönlü ANOVA kullanılarak karşılaştırıldı ve sonrasında verilerin normal dağılım gösterdiği ve elde edilen standart sapmalar (SD) arasındaki farkın anlamlı olmadığı durumda Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Veriler normal dağılıma sahip olmadığında veya SD'ler arasındaki fark anlamlı olduğunda verileri karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve ardından Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi uygulandı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama (SD) olarak verildi. İnsan örneklerine ait tüm veriler Bağımsız Örneklem t-Testi ile analiz edildi. Verilen p değerleri 2 kuyruklu anlamlılığı temsil eder. Varyansların ve ortalamaların eşitliği, Levene'nin Varyansların Eşitliği Testi ve Ortalamaların Eşitliği için t-Testi ile kontrol edildi. Cinsiyet dağılımı IBM Sosyal Bilimlerde İstatistik Paket Programı (SPSS) sürüm 24.0 programı kullanılarak Ki-kare (χ^2) analizi ile analiz edildi.

Protein-Protein Interaction and Pathway Analysis

Potansiyel PPI'lar, tahmin edilen bir protein-protein etkileşim ağı olan STRING ile analiz edildi (<https://string-db.org/>) (20), APP ve hedef TF'lerin yolak analizi, insan biyolojisindeki yolların ve reaksiyonların düzenlenmiş bir veritabanı olan Reactome Pathway Browser 3,7 ile yapıldı (21).

BULGULAR

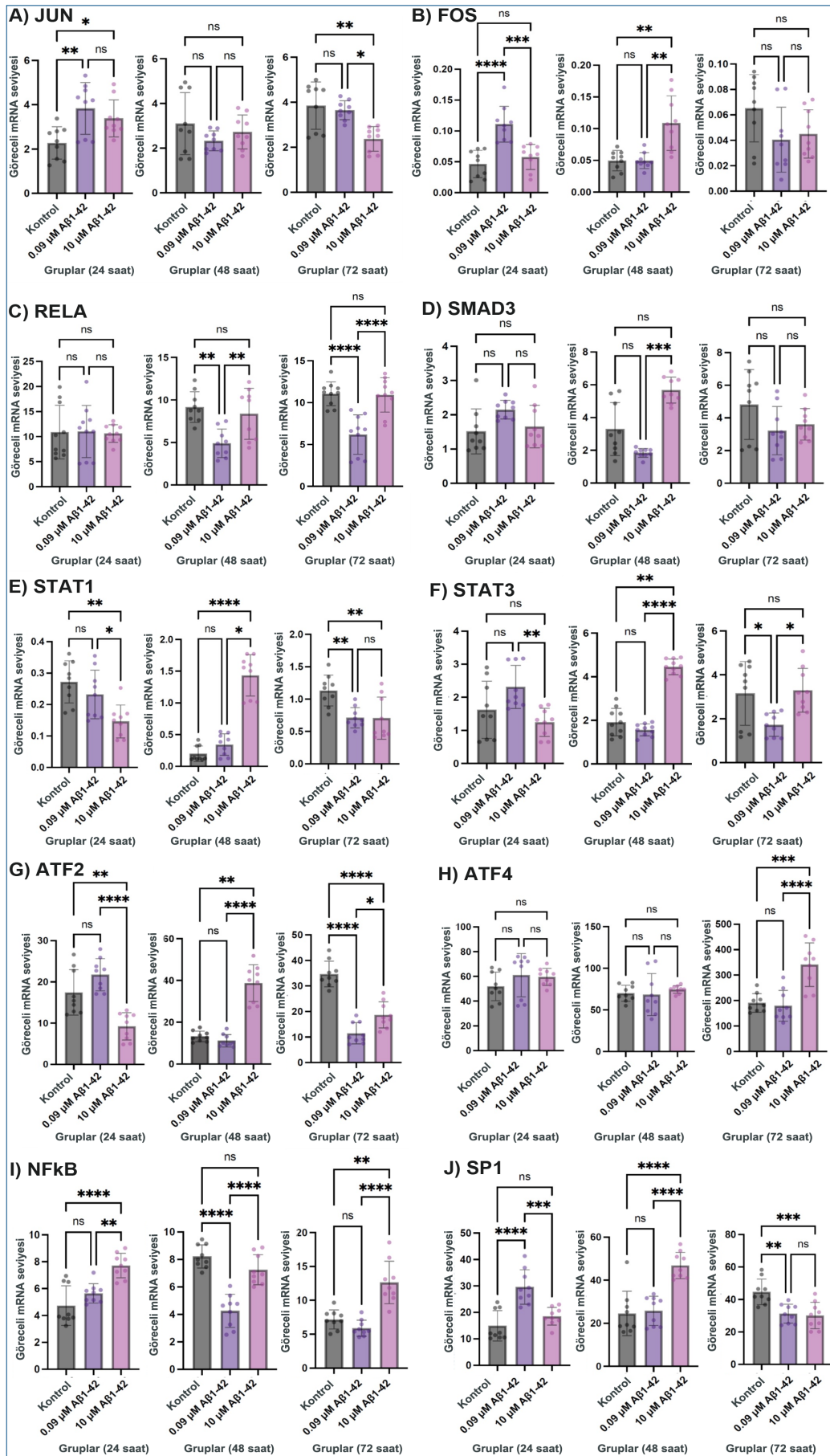
Hücre Kültürlerinde mRNA Ekspresyon Düzeylerindeki Değişiklikler

Uygulamaların 24. saatinde, uygulama yapılmayan hücrelere kıyasla 0,09 μM Aβ1-42 uygulanan hücrelerde *JUN*, *FOS* ve *SP1* ekspresyonları arttı (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,0001$ ve $p < 0,0001$), 10 μM Aβ1-42 uygulanan hücrelerde ise *JUN*, *NFKB* ekspresyonu artarken *STAT1* ekspresyonu azaldı (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,0001$ ve $p < 0,001$). Uygulamalardan 48 saat sonra, *FOS*, *STAT1*, *STAT3*, *ATF2* ve *SP1*'in ekspresyon düzeyleri 10 μM Aβ1-42 grubunda yükseldi (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,0001$, $p < 0,01$, $p < 0,01$ ve $p < 0,0001$), *RELA* ve *NFKB* ise 0,09 μM Aβ1-42 grubunda azaldı (sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,0001$). 72. saatte, uygulama yapılmayan hücrelere kıyasla 0,09 μM Aβ1-42 uygulanan hücrelerde *RELA*, *STAT1*, *STAT3*, *ATF2* ve *SP1* ekspresyonları daha düşüktü (sırasıyla $p < 0,0001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,0001$ ve $p < 0,01$) ve 10 μM Aβ1-42 uygulanan hücrelerde *JUN*, *STAT1*, *ATF2* ve *SP1* ekspresyonları daha düşüktü (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,01$, $p < 0,0001$ ve $p < 0,001$) ancak *ATF4* ve *NFKB* ekspresyonları daha yüksekti (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,01$) (Şekil 1). Sitotoksitesite sonuçları Ek Materyal 2'de verilmiştir.

İnsan Örnekleri

Sağlıklı bireyler ile AD vakaları arasında ortalama yaş veya cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$). Alzheimer hastalığı vakalarının MMSE puanları sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede düşüktü ($p < 0,0001$). Tüm grupların demografik özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Alzheimer hastalığı vakalarında Aβ1-42'nin ortalama $\pm$ SS'si 450,0 $\pm$ 154,0 pg/ml, pTau (181) 93,3 $\pm$ 38,2 pg/ml ve tTau 631,0 $\pm$ 225,4 pg/ml olarak bulundu. AT (N) sınıflandırması, daha önce verdiğimiz gibi A (Aβ1-42): 813 pg/ml, T (pTau181): 52 pg/ml ve (N) (tTau): 375 pg/ml için kesme değerlerine göre belirlendi (22). Buna göre AD vakalarının AT (N) dağılımları şu şekilde belirlendi: A+ (%100,0), A- (%0); T+ (%84,0), T- (%16,0); (N)+ (%92,0), (N)- (%8,0). Sağlıklı bireylerde plazma pTau217'nin ortalama $\pm$ SS'si 0,16 $\pm$ 0,08 pg/ml idi. Sağlıklı kontrol grubundaki her bireyde konsantrasyon 0,66 pg/ml'den düşüktü ve bu da amiloid beta patolojisinin olmadığını gösteriyordu (%100 A-).



Şekil 1. Transkripsiyon faktörlerinin mRNA ifade düzeyleri (JUN, FOS, ATF2, ATF4, RELA, NFKB, SMAD3, STAT1, STAT3 ve SP1 mRNA'larının 24, 48 veya 72. saatteki göreceli mRNA ifade düzeyleri. Veriler ortalama (SS) olarak sunulmuştur. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

İnsan örneklerinde transkripsiyon faktörleri JUN, FOS ve RELA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri

UN ve RELA'nın mRNA ekspresyon düzeyleri AD vakalarından alınan kan örneklerinde sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede yükseldi (sırasıyla $p=0,0001$ ve $p=0,001$). FOS'un mRNA ekspresyon düzeyleri AD vakalarında nispeten yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 2).

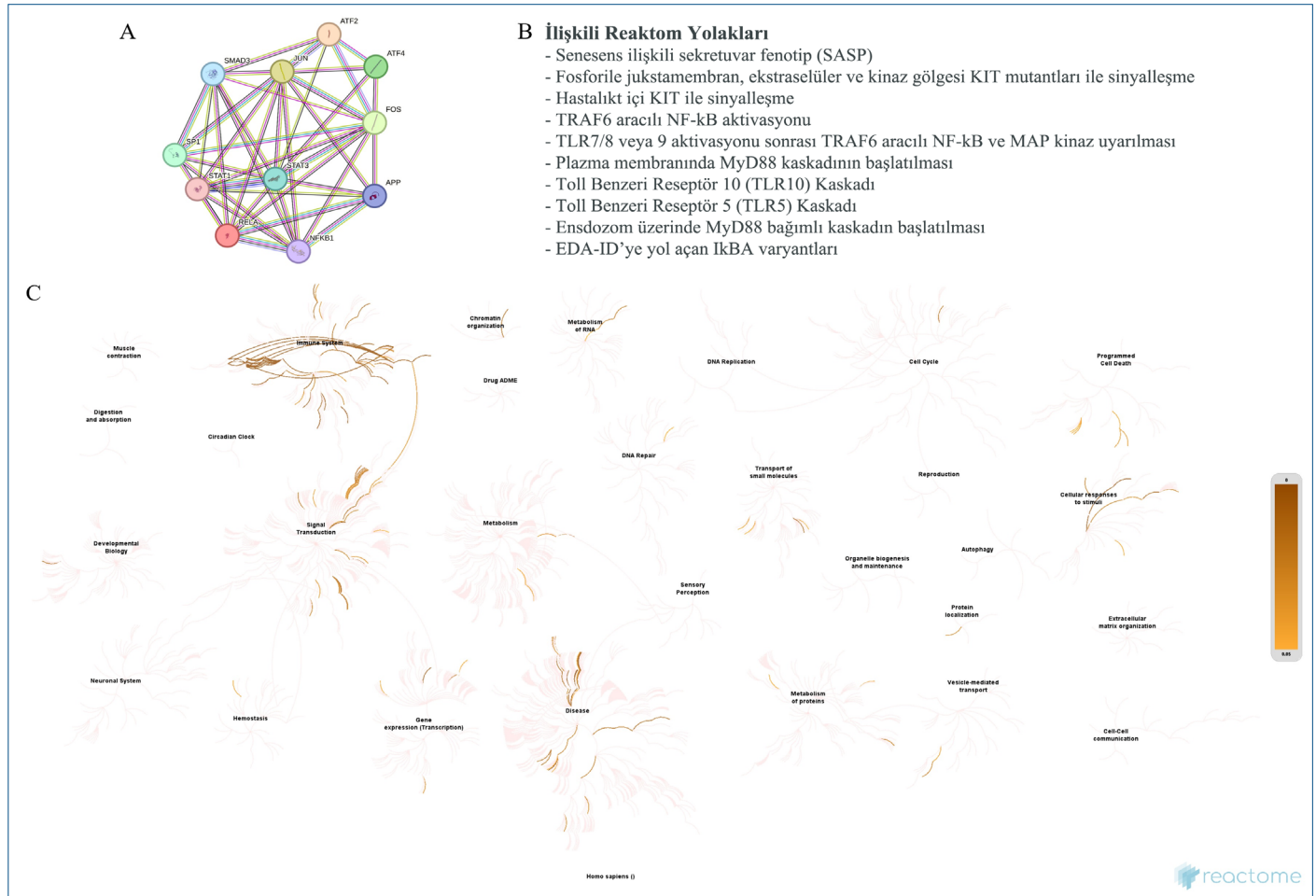
Protein Etkileşimleri ve Yolakları

STRING analizi, APP'nin Jun (Birleşik Skor: 0,790), Fos (Birleşik Skor: 0,543), RelA (Birleşik Skor: 0,552), NF- κ B (Birleşik Skor: 0,870), STAT1 (Birleşik Skor: 0,483) ve STAT3 (Birleşik Skor: 0,753) ile doğrudan etkileşime girebileceğini göstermiştir (Şekil 2). Reactome analizi, APP ve hedef TF'lerin, özellikle bağışıklık sistemi ve sinyal iletim yollarıyla

Tablo 2. Kohortun demografik özellikleri ve JUN, FOS, RELA'nın göreceli mRNA ekspresyon düzeyleri

	Sağlıklı bireyler (n=23)	AD (n=25)	p Value
Yaş (yıl)	*64,44±6,89	67,64±10,71	$p>0,05$
Başlangıç yaşı (yıl)	-	62,36±9,49	-
Cinsiyet: Dişi (F); Erkek (M) (%)	F (%56,5); M (%43,5)	F (%56,0); M (%44,0)	$p>0,05$
MMSE	29,20±0,77	17,00±7,79	$p<0,001$
CSF A β 1-42 (pg/ml)	-	450,0±154,0	-
CSF pTau181 (pg/ml)	-	93,3±38,2	-
CSF total Tau (pg/ml)	-	631,0±225,4	-
Plazma ALZpath p-Tau 217 (pg/ml)	0,16±0,08	-	-
A	A+ (%0), A- (%100,0)	A+ (%100,0), A- (%0);	
T	-	T+ (%84,0), T- (%16,0);	
(N)	-	(N)+ (%92,0), (N)- (%8,0)	
JUN mRNA ekspresyonu	0,83±0,35	2,19±1,65	$p=0,0001$
FOS mRNA ekspresyonu	37,10±20,07	48,47±32,63	$p=0,15$
RELA mRNA ekspresyonu	2,61±0,48	3,18±0,68	$p=0,001$

Alzheimer hastalığı olgularının AT (N) sınıflandırması, daha önce tanımlandığı şekilde A (A β 1-42) için 813 pg/ml, T (pTau181) için 52 pg/ml ve (N) (tTau) için 375 pg/ml kesme değerlerine göre belirlenmiştir. Sağlıklı kontrol grubunun amiloid patolojisi (A), plazma ALZpath p-Tau 217 için 0,66 pg/ml kesme değerine göre belirlenmiştir. Tüm veriler Bağımsız Örneklem t-Testi ile analiz edilmiştir. Verilen p değerleri çift yönlü anlamlılığı temsil etmektedir. Varyans ve ortalama eşitliği, Levene'in Varyans Eşitliği Testi ve Ortalama Eşitliği için t-testi ile kontrol edilmiştir. Cinsiyet dağılımı Ki-kare (χ^2) testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değerler kalın olarak gösterilmiştir. AD: Alzheimer hastalığı.



Şekil 2. PPI ve yolak analizi (A: STRING analizi APP'nin Jun, Fos, RelA, NF- κ B, STAT1 ve STAT3 ile ilişkili olduğunu göstermektedir; B: İlk 10 ilgili Reactome yolları (bkz. Ek Materyal 3); C: Genel Reactome yolları).

ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur. Yolaklar ve yanlış keşif oranı (FDR) skorları Şekil iki ve Ek Materyal 3'te sunulmaktadır.

TARTIŞMA

Aβ'nin transkripsiyonel etkileri, araştırmacılar AD'nin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamaya çalışırken son yıllarda ortaya çıkan bir araştırma alanı haline gelmiştir. Biz ve diğerleri, Aβ'nin nükleusa taşınabileceğini (10,23) ve DNA'ya bağlanabileceğini (7,24) gösterdik. Bu bulgular, Aβ'nin kendisinin bir TF olarak hareket edip etmediği konusunda soruları gündeme getirmiştir. Öte yandan, Aβ'nin birçok genin ifadesini değiştirdiğini gösteren çalışmaların varlığı göz önüne alındığında, Aβ'nin bu genleri doğrudan düzenlemek yerine genel TF'lerin ifadesini düzenleyerek bu kadar çok sayıda geni etkileme olasılığını öne sürdük.

TF'ler gen ifadesinin temel düzenleyicileridir. TF'ler, gelişim, hücre bölünmesi, farklılaşma, hücre metabolizması ve bağışıklık tepkisi dâhil olmak üzere çeşitli sinyal yollarını ve hücrel süreçleri düzenler. (25). Jun (c-Jun, JunB ve JunD) ve Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 ve Fra-2) proteinleri, nöronal hayatta kalma ve ölümünü kontrol eden aktivatör protein-1 (AP-1) kompleksinin başlıca bileşenleridir. (26-30). c-Jun, nörodejenerasyon veya nöroproteksiyonla sonuçlanabilen ikili bir tepkiye aracılık eden c-Jun N-terminal kinazının (JNK) ana nüklear substratıdır. (31). Alzheimer hastalığına sahip bireylerin hipokampusunda CA1 bölgesinde artmış c-Jun protein seviyeleri bulundu (32). Benzer şekilde biz de AD vakalarının periferik kan örneklerinde sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek JUN mRNA seviyeleri bulduk. In vivo AD modelinde, Aβ uygulanan sıçanlar ve primer astrositlerde, total c-Jun seviyesinin değişmeden kaldığı, fosforile c-Jun seviyesinin ise arttığı gösterildi (33).

Jun'un indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) (34,35), sinir büyüme faktörünü (NGF) (36), ve VDR'yi (37) düzenlediğini ve APP'nin promotör dizisine bağlandığını gösteren çalışmalar vardır (38), biz de önceki çalışmalarımızda her birinin ifade düzeylerinin Aβ1-42 tedavisiyle değiştiğini gösterdik (11-13,18). Bu çalışmada ise JUN'un ifade düzeyinin Aβ tedavilerine yanıt olarak doza ve zamana bağlı bir şekilde değiştiğini gözlemledik.

c-Fos'un nörodejenerasyona karşı koruyucu bir rol oynadığı ve nöronal aktivasyonun bir göstergesi olarak kabul edildiği öne sürülmüştür (39). APP'nin, APP-transgenik farelerde c-Fos'un düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (40). Başka bir çalışma, hem c-Fos hem de c-Jun'un Alzheimer hastalarının hipokampusunda yoğun immün işaretleme gösterdiğini ortaya koymuştur (41). Bununla birlikte, c-Fos'un AD patofizyolojisindeki rolünün altında yatan spesifik mekanizma belirsizdir. Çalışmalar, c-Fos'un iNOS (34,35) ve NGF (36) gibi, AD ile ilişkili olduğu bilinen ve önceki çalışmalarımızda Aβ1-42 uygulamasıyla düzeylerinin değiştiği gösterilen genleri düzenleyen TF'lerden biri olduğunu göstermiştir (11,18). Çalışmamızda Aβ uygulamalarına yanıt olarak FOS ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlemledik; bu durum, AD'de FOS'a bağımlı genlerdeki değişimlerin kök faktörlerinden biri olarak değerlendirilebilir. Alzheimer hastalığı olgularında göreceli olarak yüksek FOS mRNA ekspresyonu gözlemledik, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Atf2 ve Atf4'de AP-1 kompleksinin üyeleridir ve basic region-leucine zipper ailesine aittir. Çalışmalar, Atf2'nin gelişim sırasında nöronal göçte rol aldığını ve ayrıca sinir hücresi ölümünü teşvik ettiğini göstermiştir (42). Alzheimer hastalarının beyinlerinin hipokampusunda Atf2 ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (42). Yamada ve ark., Atf2'nin Alzheimer hastalarının kortikal nöronlarının sitoplazmasında lokalize olduğunu göstererek Atf2'nin nükleer taşınmasının engellenmiş olabileceğini, bunun da AD'nin erken patolojik değişiklikleriyle ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (43). Çalışmamızda ATF2 ekspresyon düzeyinin 48. saatte 10 µM Aβ1-42 uygulamasıyla arttığını, ancak 72. saatte 0,09 µM Aβ1-42 ile azaldığını gözlemledik. Atf4, gelişim, metabolizma ve bellek oluşumu için gereklidir (44). Alzheimer hastalarının

beyinlerinin korteksinde Atf4 protein düzeyinin yaş eşleştirilmiş kontrollere göre 1,9 kat arttığı bildirilmiştir (45). Atf4 ekspresyon düzeylerinin AD transgenik farelerde arttığı gösterilmiştir (46). Çalışmamızda, 72. saatte 10 µM Aβ1-42 uygulaması sonrasında ATF4 ekspresyon düzeyinde artış bulduk. Atf4'ün, AD patolojisindeki nörodejeneratif sinyalin bir aracı olduğu öne sürülmüştür (47). Bazı çalışmalar, AD'nin Atf4 aracılı anormal gen ekspresyonu düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir (44). Geng ve ark., AD için risk faktörü olan APOE'nin promotörü ile Atf4 arasında bir etkileşim bulmuştur. Ayrıca, Atf4 aşırı ekspresyonunun APOE ekspresyonunu artırdığını, Atf4'ün susturulmasının ise genin ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (48). Çalışmamızda Aβ maruziyetine yanıt olarak c-Jun, c-Fos, Atf2 ve ATF4 ekspresyonunda gözlenen anlamlı değişiklikler, AD tipi patolojide nöronal hayatta kalımı ve ölümü kontrol eden AP-1 kompleksinde olası bir düzensizliğe işaret edebilir.

Nükleer faktör-kappa B (NF-κB), beş farklı proteinin: p50, p52, RelA (p65), RelB ve c-Rel'in birleşmesiyle oluşur (49). NF-κB, merkezi sinir sisteminde hedef genleri pleiotropik bir şekilde düzenleyerek hem patolojik nörodejeneratif süreçleri hem de normal işlevi kontrol eder (50). NF-κB faktörleri, enflamasyon ve apoptozisin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve ayrıca çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisini ve beyindeki sistemik yaşlanmanın programlanmasını etkiler (51,52). RelA alt birimi ve post-transkripsiyonel modifikasyonları, Aβ toksisitesinin indüklediği nörodejenerasyonun başlatılmasında önemli bir role sahiptir (50). Araştırmacılar, farelere ve makaklara Aβ enjeksiyonunun hipotalamusta NF-κB düzeylerini artırdığını bulmuşlardır (53). Ayrıca, NF-κB'nin düzensizliği AD beyinde nörodejenerasyon mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir (54). Başka bir çalışma, Aβ1-42'nin, enflamasyonun başlıca aracı olan prostaglandin E2'nin ve prostaglandin sentezinin temel enzimlerinden biri olan siklooksijenaz-2'nin sentezini, insan astrositoma hücrelerinde NF-κB'ye bağımlı bir mekanizma yoluyla uyardığını göstererek Aβ1-42 ile NF-κB arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmüştür (55). Mevcut çalışmamız, 0,09 µM Aβ1-42 ile hem 48 saatte hem de 72 saatte yapılan muamele sonrasında RELA ekspresyon düzeylerinin azaldığını, NFκB ekspresyon düzeylerinin ise 10 µM Aβ1-42 uygulamasıyla 24 saatte arttığını göstermiştir. Öte yandan, AD olgularında sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek RELA düzeyleri bulduk.

Smad3, transforming growth factor-β (TGF-β) sinyal yolunun temel hücre içi aracı faktörüdür (56). Smad sinyalleme, makrofaj fagositozundaki kritik rolüyle bilinmektedir. Smad2/3 sinyalleme inhibe edilen makrofajlar, Aβ'yi fagosit etme konusunda artmış bir yetenek sergiler (57). Aβ'nin makrofaj fagositozundaki rolü, primer hücre kültürlerinde ve AD hayvan modellerinde de doğrulanmıştır (58). İlginç bir şekilde, AD'de yumak içeren nöronlarda Smad3'ün azalmış nükleer lokalizasyonu gözlenmişken, sitoplazmik Smad'ların tau ile ilişkisi diğer nörodejeneratif hastalıklarda gösterilmiştir (59). Mevcut çalışmada, 48 saatte 10 µM Aβ1-42 uygulamasıyla SMAD3 mRNA ekspresyon düzeyinde bir artış gözlemledik.

Sinyal transdüsörleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) faktörleri, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve hormonların etkilerini iletir ve hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz ve gelişim dâhil birçok hücrel süreci düzenler (60,61). STAT ailesi üyeleri arasında STAT1, 3, beş ve 6'nın beyinde değişken düzeylerde eksprese edildiği bilinmektedir (62,63). Bir çalışma, STAT1'in sağlıklı bireylere kıyasla AD hastalarında daha bol bulunduğunu bildirmiştir (64). Aβ'nin hipokampal nöronlarda JAK2/STAT3 yolunu bozarak hafıza bozukluklarına yol açtığı öne sürülmüştür. Öte yandan, çalışmalar hem AD fare modellerinde hem de AD hastalarının hipokampal nöronlarında fosfo-STAT3 düzeyinin azaldığını (65) ve AD beyinlerinin nöronlarında nükleer STAT3 düzeylerinin zayıfladığını göstermiştir (66). STAT1'in APP ve iNOS ekspresyonunu düzenlediği (67,68), STAT3'ün ise VDR ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (69). Çalışmamızda hem STAT1 hem de STAT3 ekspresyonlarının Aβ maruziyetine yanıt olarak değiştiğini gözlemledik.

Sp1'in daha önce birçok AD ile ilişkili genin (70) ki bunalar arasında APP (71), BACE1 (72), PSEN1 (73), APOE (74) ve GRIN1 (75) de yer almaktadır ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir; biz de A β 1-42'nin bu genlerin ekspresyon düzeylerini değiştirdiğini daha önce göstermiştik (13). Transkripsiyon faktörleri Sp1 ve AP-1'in koordine kontrolünün, nörodejenerasyonun tedavisi için uygulanabilir bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür (76). Birçok çalışma AD'de Sp1 düzensizliği bulmuştur (77). Cao ve ark.'na göre Sp1, aynı anda nöronal apoptoza katkıda bulunabilir ve Alzheimer hastalarında nöronal ölümü hızlandırabilir (78). Mevcut çalışmada, 24 saatte 0,09 μ M A β 1-42 uygulaması sonrasında SP1 ekspresyon düzeyinin arttığını, 72 saatte ise azaldığını gösterdik.

Sonuç olarak, bulgularımız JUN, FOS, ATF2, ATF4, REL, NFKB, SMAD3, STAT1, STAT3 ve SP1'in ekspresyon düzeylerinin A β 1-42 uygulamasına yanıt olarak değiştiğini ve bu değişikliklerin uygulamanın dozu ve süresine bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, JUN ve REL ekspresyon düzeylerinde AD olgularında anlamlı bir artış gözlenmiş olup, genel transkripsiyon faktöründeki olası bir değişikliğin insan örneklerinde de doğrulandığı görülmüştür. Dahası, yakın zamanda yayımladığımız bir çalışma, Jun, Fos ve REL tarafından düzenlenen Mitokondriyal Fosfoenolpiruvat Karboksikinas 2'nin AD olgularının beyin omurilik sıvısında anlamlı derecede azaldığını göstermiştir (79). Önceki çalışmalarımızda birçok hedef genin ekspresyon düzeylerinin değişmiş olduğunu göstermiş olmamız, bu çalışmada ilgili TF'leri incelememizin temel gerekçesini oluşturmaktadır. Mevcut çalışma, AD'de görülen bu gen ekspresyon değişikliklerinin, TF'lerdeki değişiklikleri içeren daha genel bir düzensizliğin sonucu olabileceğini göstermektedir. Bir diğer olasılık ise, A β içeren bir DNA-TF kompleksinin düzenleyici bir bileşen olarak görev yapmasıdır; burada DNA'ya bağlanan bir proteinin bağlanma süresini değiştiren herhangi bir faktör, gen düzenlenmesini etkileyebilir (80). Bir TF proteininin hücrel konsantrasyonu transkripsiyon etkinliğine katkıda bulunabilir (81). Bu öneri, TF'lerin ekspresyon düzeylerinin hücre davranışı açısından önemini ve A β ile olası ilişkisini de göstermektedir. Veriler, A β 1-42'nin genel TF'lerin ekspresyonunu değiştirerek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini ve enflamasyon, immün yanıt, farklılaşma, apoptoz ve hücre büyümesi gibi birçok hücrel süreci etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu hipotezin A β -DNA veya A β -TF etkileşim mekanizmaları üzerinden yapılacak daha ileri çalışmalarla doğrulanması uygun olacaktır.

EK MATERYAL

https://www.noropsikiyatriarsivi.com/uploads/NPA_29229_TR_EK.pdf

Etik Komite Onayı: Araştırma ticari olarak satın alınmış HEK293T hücreleri ile yapıldığı için in vitro çalışmalar için etik onay gerekmemektedir. Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.01.2023-573754 ve 26.05.2022-389678 numaraları ile onaylanmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağlıdır.

Yazar Katkıları: Fikir- DGA, ED; Tasarım- DGA, ED; Denetleme- DGA, ED; Kaynaklar- DGA, ED; Malzemeler- DGA, ED; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- NI, EK, EŞ, MA, BS, TÇ, ZY, PS, SI, GA, BŞY, SSA, BB, HAH, IHG, DGA, ED; Analiz ve/veya Yorum- DGA, ED; Literatür Taraması- EK, MA, ED; Yazıyı Yazan- EK, MA, DGA, ED; Eleştirel İnceleme- DGA, ED.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje No: 34211 ve TYL-2023-37292) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından (Proje No: 22AG017 - APYOK2) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002;297:353-356. [Crossref]

- Karissety BC, Bhatnagar A, Armour EM, Beaver M, Zhang H, Elefant F. Amyloid- β peptide impact on synaptic function and neuroepigenetic gene control reveal new therapeutic strategies for Alzheimer's disease. Front Mol Neurosci. 2020;13:577622. [Crossref]
- Dursun E, Candas E, Yilmazer S, Gezen-Ak D. Amyloid Beta 1-42 Alters the Expression of miRNAs in Cortical Neurons. J Mol Neurosci. 2019;67:181-192. [Crossref]
- Dursun E, Gezen-Ak D. Vitamin D, a secosteroid hormone and its multifunctional receptor, vitamin D receptor, in Alzheimer's type neurodegeneration. In: Raji AC, Leng Y, Ashford JW, Khalsa DS, editors. Handbook of Intervention and Alzheimer's disease. Amsterdam: IOS Press; 2024. p. 193-219.
- Gezen-Ak D, Yurttas Z, Camoglu T, Dursun E. Could Amyloid- β 1-42 or α -synuclein interact directly with mitochondrial DNA? A hypothesis. ACS Chem Neurosci. 2022;13:2803-2812. [Crossref]
- Keskin E, Gezen-Ak D, Dursun E. Amyloid β , α -synuclein and amyloid β - α -synuclein combination exert significant but different alterations in inflammatory response profile in differentiated human SH-SY5Y cells. ACS Omega. 2023;8:45519-45534. [Crossref]
- Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. Gene. 2011;488:13-22. [Crossref]
- Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. J Physiol. 2006;575:5-10. [Crossref]
- Maloney B, Lahiri DK. The Alzheimer's amyloid β -peptide (A β) binds a specific DNA A β -interacting domain (A β ID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. Gene. 2011;488:1-12. [Crossref]
- Barucker C, Harmeier A, Weiske J, Fauler B, Albring KF, Prokop S, et al. Nuclear translocation uncovers the amyloid peptide A β 42 as a regulator of gene transcription. J Biol Chem. 2014;289:20182-20191. [Crossref]
- Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S. A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid- β and preventing the amyloid- β induced alterations by vitamin D in cortical neurons. J Alzheimers Dis. 2011;23:207-219. [Crossref]
- Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S. Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin d receptor gene and induces the expression of the vitamin d catabolic enzyme gene in hippocampal neurons. Dement Geriatr Cogn Disord. 2013;36:76-86. [Crossref]
- Gezen-Ak D, Atasoy IL, Candas E, Alaylioglu M, Dursun E. The transcriptional regulatory properties of amyloid beta 1-42 may include regulation of genes related to neurodegeneration. Neuromolecular Med. 2018;20:363-375. [Crossref]
- Gezen-Ak D, Alaylioglu M, Yurttas Z, Camoglu T, Sengul B, Isler C, et al. Vitamin D receptor regulates transcription of mitochondrial DNA and directly interacts with mitochondrial DNA and TFAM. J Nutr Biochem. 2023;116:109322. [Crossref]
- Gezen-Ak D, Dursun E. Vitamin D, a secosteroid hormone and its multifunctional receptor, vitamin D receptor, in Alzheimer's type neurodegeneration. J Alzheimers Dis. 2023;95:1273-1299. [Crossref]
- Dursun E, Gezen-Ak D. Vitamin D receptor is present on the neuronal plasma membrane and is co-localized with amyloid precursor protein, ADAM10 or Nicastrin. PLoS One. 2017;12:e0188605. [Crossref]
- Han H, Cho JW, Lee S, Yun A, Kim H, Bae D, et al. TRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. Nucleic Acids Res. 2018;46:D380-D386. [Crossref]
- Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S. A new mechanism for amyloid-beta induction of iNOS. vitamin D-VDR pathway disruption. J Alzheimers Dis. 2013;36:459-474. [Crossref]
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7:263-269. [Crossref]
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 2019;47:D607-D613. [Crossref]
- Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res. 2020;48:D498-D503. [Crossref]
- Sordu P, Alaylioglu M, Samanci B, Bulu E, Gulec ZEK, Bilgic B, et al. Cerebrospinal fluid HSP90AA1, HSPA4, and STUB1/CHIP levels in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and frontotemporal dementia. J Alzheimers Dis. 2025;105:481-493. [Crossref]

23. Gezen-Ak D, Atasoy IL, Candas E, Alayiolglu M, Yilmazer S, Dursun E. Vitamin D receptor regulates amyloid beta 1-42 production with protein disulfide isomerase A3. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8:2335–2346. [\[Crossref\]](#)
24. Khmeleva SA, Radko SP, Kozin SA, Kiseleva YY, Mezentsev YV, Mitkevich VA, et al. Zinc-Mediated Binding of Nucleic Acids to Amyloid-β Aggregates: Role of Histidine Residues. *J Alzheimers Dis*. 2016;54:809–819. [\[Crossref\]](#)
25. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*. 2009;10:252–263. [\[Crossref\]](#)
26. Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*. 2001;20:2365–2377. [\[Crossref\]](#)
27. Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 2001;20:2413–2423. [\[Crossref\]](#)
28. Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. 2001;20:2438–2452. [\[Crossref\]](#)
29. Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2001;20:2401–2412. [\[Crossref\]](#)
30. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. 2001;20:2390–2400. [\[Crossref\]](#)
31. Herdegen T, Skene P, Bahr M. The c-Jun transcription factor -bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci*. 1997;20:227–231. [\[Crossref\]](#)
32. MacGibbon GA, Lawlor PA, Walton M, Sirimanne E, Faull RL, Synek B, et al. Expression of Fos, Jun, and Krox family proteins in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1997;147:316–332. [\[Crossref\]](#)
33. Saha P, Guha S, Biswas SC. P38K and JNK pathways are induced by amyloid-β in astrocyte: Implication of MAPK pathways in astrogliosis in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2020;108:103551. [\[Crossref\]](#)
34. Xu W, Comhair SA, Zheng S, Chu SC, Marks-Konczalik J, Moss J, et al. STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:L137–L148. [\[Crossref\]](#)
35. Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, et al. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol*. 1998;125:193–201. [\[Crossref\]](#)
36. Hengerer B, Lindholm D, Heumann R, Ruther U, Wagner EF, Thoenen H. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:3899–3903. [\[Crossref\]](#)
37. Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J, Smirnoff P, Schwartz B. Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. *J Endocrinol*. 2005;185:577–592. [\[Crossref\]](#)
38. Lukiw WJ, Rogaev EI, Wong L, Vaula G, McLachlan DR, St George-Hyslop P. Protein-DNA interactions in the promoter region of the amyloid precursor protein (APP) gene in human neocortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;22:121–131. [\[Crossref\]](#)
39. Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet*. 2002;30:416–420. [\[Crossref\]](#)
40. Hendrickx A, Pierrot N, Tasiaux B, Schakman O, Kienlen-Campard P, De Smet C, et al. Epigenetic regulations of immediate early genes expression involved in memory formation by the amyloid precursor protein of Alzheimer disease. *PLoS One*. 2014;9:e99467. [\[Crossref\]](#)
41. Marcus DL, Strafaci JA, Miller DC, Masia S, Thomas CG, Rosman J, et al. Quantitative neuronal c-fos and c-jun expression in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1998;19:393–400. [\[Crossref\]](#)
42. Pearson AG, Curtis MA, Waldvogel HJ, Faull RL, Dragunow M. Activating transcription factor 2 expression in the adult human brain: association with both neurodegeneration and neurogenesis. *Neuroscience*. 2005;133:437–451. [\[Crossref\]](#)
43. Yamada T, Yoshiyama Y, Kawaguchi N. Expression of activating transcription factor-2(ATF-2), one of the cyclic AMP response element (CRE) binding proteins, in Alzheimer disease and non-neurological brain tissues. *Brain Res*. 1997;749:329–334. [\[Crossref\]](#)
44. Wei N, Zhu LQ, Liu D. ATF4: a novel potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2015;52:1765–1770. [\[Crossref\]](#)
45. Ohno M. Roles of eIF2alpha kinases in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*. 2014;16:7:22. [\[Crossref\]](#)
46. Hayakawa M, Itoh M, Ohta K, Li S, Ueda M, Wang MX, et al. Quercetin reduces eIF2alpha phosphorylation by GADD34 induction. *Neurobiol Aging*. 2015;36:2509–2518. [\[Crossref\]](#)
47. Baleriola J, Walker CA, Jean YY, Cray JF, Troy CM, Nagy PL, et al. Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions. *Cell*. 2014;158:1159–1172. [\[Crossref\]](#)
48. Geng H, Law PP, Ng MC, Li T, Liang LY, Ge TF, et al. APOE genotype-function relationship: evidence of -491 A/T promoter polymorphism modifying transcription control but not type 2 diabetes risk. *PLoS One*. 2011;6:e24669. [\[Crossref\]](#)
49. Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D. Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J*. 2003;22:5530–5539. [\[Crossref\]](#)
50. Pizzi M, Spano P. Distinct roles of diverse nuclear factor-kappaB complexes in neuropathological mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2006;545:22–28. [\[Crossref\]](#)
51. Sarnico I, Lanzillotta A, Benarese M, Alghisi M, Baiguera C, Battistin L, et al. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. *Int Rev Neurobiol*. 2009;85:351–362. [\[Crossref\]](#)
52. Lanzillotta A, Porri V, Bellucci A, Benarese M, Branca C, Parrella E, et al. NF-kappaB in innate neuroprotection and age-related neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2015;6:98. [\[Crossref\]](#)
53. Jha NK, Jha SK, Kar R, Nand P, Swati K, Goswami VK. Nuclear factor-kappa β as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2019;150:113–137. [\[Crossref\]](#)
54. Chen CH, Zhou W, Liu S, Deng Y, Cai F, Tone M, et al. Increased NF-κB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012;15:77–90. [\[Crossref\]](#)
55. Blanco A, Alvarez S, Fresno M, Munoz-Fernandez MA. Amyloid-β induces cyclooxygenase-2 and PGE2 release in human astrocytes in NF-κ B dependent manner. *J Alzheimers Dis*. 2010;22:493–505. [\[Crossref\]](#)
56. Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15:144–158. [\[Crossref\]](#)
57. Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekely CA, Tan J, et al. Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med*. 2008;14:681–687. [\[Crossref\]](#)
58. Xu L, Pan CL, Wu XH, Song JJ, Meng P, Li L, et al. Inhibition of Smad3 in macrophages promotes Aβ efflux from the brain and thereby ameliorates Alzheimer's pathology. *Brain Behav Immun*. 2021;95:154–167. [\[Crossref\]](#)
59. Chalmers KA, Love S. Phosphorylated Smad 2/3 colocalizes with phospho-tau inclusions in Pick disease, progressive supranuclear palsy, and corticobasal degeneration but not with alpha-synuclein inclusions in multiple system atrophy or dementia with Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66:1019–1026. [\[Crossref\]](#)
60. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 2000;19:2474–2488. [\[Crossref\]](#)
61. Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*. 2000;25:496–502. [\[Crossref\]](#)
62. Wegenka UM, Buschmann J, Luttkien C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*. 1993;13:276–288. [\[Crossref\]](#)
63. Sadowski HB, Shuai K, Darnell JE Jr, Gilman MZ. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science*. 1993;261:1739–1744. [\[Crossref\]](#)
64. Kitamura Y, Shimohama S, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Taniguchi T. Alteration of transcription factors NF-kappaB and STAT1 in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett*. 1997;237:17–20. [\[Crossref\]](#)
65. Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M, et al. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry*. 2009;14:206–222. [\[Crossref\]](#)
66. Wan HL, Hong XY, Zhao ZH, Li T, Zhang BG, Liu Q, et al. STAT3 ameliorates cognitive deficits via regulation of NMDAR expression in an Alzheimer's disease animal model. *Theranostics*. 2021;11:5511–5524. [\[Crossref\]](#)
67. Bolli R, Dawn B, Xuan YT. Role of the JAK-STAT pathway in protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:72–79. [\[Crossref\]](#)
68. Ganster RW, Guo Z, Shao L, Geller DA. Differential effects of TNF-alpha and IFN-gamma on gene transcription mediated by NF-kappaB-Stat1 interactions. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25:707–719. [\[Crossref\]](#)
69. Catala-Moll F, Ferrer-Bonastre AG, Godoy-Tena G, Morante-Palacios O, Ciudad L, Barbera L, et al. Vitamin D receptor, STAT3, and TET2 cooperate to establish tolerogenesis. *Cell Rep*. 2022;38:110244. [\[Crossref\]](#)
70. Ramanan VK, Kim S, Holohan K, Shen L, Nho K, Risacher SL, et al. Genome-wide pathway analysis of memory impairment in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative (ADNI) cohort implicates gene candidates, canonical pathways, and networks. *Brain Imaging Behav*. 2012;6:634–648. [\[Crossref\]](#)
71. Basha MR, Wei W, Bakheet SA, Benitez N, Siddiqi HK, Ge YW, et al. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. *J Neurosci*. 2005;25:823–829. [\[Crossref\]](#)

72. Fang H, Du X, Meng F-T, Zhou J-N. SUMO negatively regulates BACE expression. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32:313–316.
73. Pastorcic M, Das HK. An upstream element containing an ETS binding site is crucial for transcription of the human presenilin-1 gene. *J Biol Chem.* 1999;274:24297–24307. [\[Crossref\]](#)
74. Zannis VI, Kan HY, Kritis A, Zanni E, Kardassis D. Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Front Biosci.* 2001;6:D456–D504. [\[Crossref\]](#)
75. Zarain-Herzberg A, Lee-Rivera I, Rodriguez G, Lopez-Colome AM. Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;137:235–251. [\[Crossref\]](#)
76. Ramanan VK, Saykin AJ. Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis.* 2013;18;2:145–175.
77. Citron BA, Dennis JS, Zeitlin RS, Echeverria V. Transcription factor Sp1 dysregulation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2008;86:2499–2504. [\[Crossref\]](#)
78. Cao Y, Tan X, Lu Q, Huang K, Tang X, He Z. miR-590-3 and SP1 promote neuronal apoptosis in patients with Alzheimer's disease via AMPK signaling pathway. *Contrast Media Mol Imaging.* 2021;15;2021:6010362. [\[Crossref\]](#)
79. İlhan N, Sahin E, Ildiz S, Samanci B, Sordu P, Alaylioglu M, et al. The CSF levels of mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 as a novel biomarker in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2025;63:98. [\[Crossref\]](#)
80. Clauss K, Popp AP, Schulze L, Hettich J, Reisser M, Escoter Torres L, et al. DNA residence time is a regulatory factor of transcription repression. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:11121–11130. [\[Crossref\]](#)
81. Calkhoven CF, Ab G. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J.* 1996;317(Pt 2):329–342. [\[Crossref\]](#)