T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİBRİLER ALFA-SİNÜKLEİNİN HÜCRE İÇİ TAŞINIM VE HÜCRE DIŞINA SALINIMINDA ŞAPERONLARIN ROLÜNÜN NÖRONA FARKLILAŞTIRILMIŞ HÜCRELERDE ARAŞTIRILMASI

TUGAY ÇAMOĞLU

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DUYGU GEZEN AK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

Bu çalışma 07.01.2021 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Duygu Gezen Ak
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD

Prof. Dr. Erdem Tüzün
İstanbul Üniversitesi
ASDETAE Sinirbilim AD

Doç. Dr. Erdinç Dursun
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD

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.

Tugay Çamoğlu

İTHAF

Annem Gülhanım Çamoğlu ve babam Sebahittin Çamoğlu'na ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmam konusunda beni hep cesaretlendiren, yeni fikirlere ve güncel yaklaşımlara daima açık olan, çalışma azminden ve isteğinden taviz vermeyen ve tüm bu yönleriyle hep örnek aldığım değerli danışmanım Doç. Dr. Duygu Gezen Ak'a, çalışmalarımda bilgi ve tecrübeleriyle bana hep yardımcı olan, özveriyle öğrencileriyle ilgilenen, kapısını çalmaktan asla çekinmeyeceğim, çalışma disiplinini benimsediğim değerli hocam Doç. Dr. Erdinç Dursun'a, samimiyetini ve çalışmalarımıza ilgisini esirgemeyen değerli Prof. Dr. Selma Yılmazer'e ve çalışmamda katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Turgut Ulutin'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve yardımlarını paylaşmaktan asla çekinmeyen, birlikte çalışmaktan daima keyif aldığım değerli M.Sc. Merve Alaylıoğlu'na, teknik konulardaki bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, ilk geldiğim günden beri yakınlıklarını hissettiğim M. Sc. Büşra Şengül, M.Sc. Ebru Keskin ve B.Sc. Pelin Sordu'ya, birlikte projeler tasarladığımız, fikirlerimizi paylaştığımız iş ortağım B.Sc. Zuhal Yurttaş'a, işlerin yürütülmesinde emeği olan değerli çalışma arkadaşım B.Sc. İdil Yüksekel'e, gerektiğinde yardımlarını ve ilgisini eksik etmeyen dönem arkadaşım M.Sc. Bilgenur Bilge'ye teşekkür ederim.

Sevgilerini, desteklerini ve bana olan inançlarını her zaman hissettiğim, eğitimimde daima arkamda duran ve beni destekleyen kalabalık yürekli aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33479

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Parkinson Hastalığı ve Semptomları 4
2.2. Lewy Patolojisi 6
2.2.1. Lewy Patolojisinin Yayılması ve Braak Hipotezi 8
2.3. Alfa-Sinüklein İşlevleri ve Hücre İçindeki Yerleşimi 11
2.3.1. Alfa-Sinükleinin Yapısal Özellikleri 14
2.3.2. Alfa-Sinükleinin Fizyolojik ve Patolojik Konformasyonları 16
2.3.3. Fibrillerin Yapısı 18
2.3.4. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücreden Hücreye Yayılması 18
2.3.5. Alfa-Sinüklein'nin Yayılması ve Prionoid Hipotezi 20
2.3.6. Fibriler Alfa-Sinükleinin Yayılma Basamakları 22
2.4. Mikrotübül-Bağımlı Hücre İçi Taşıma Sistemleri ve Şaperonların Fibriler Alfa-Sinükleinin Taşınmasıyla Ilişkileri 26
2.4.1. Mikrotübül Bağlı Taşınma ve Kinezinler 26
2.4.2. Aksonal Taşıma Tipleri ve Fibriler Alfa-Sinükleinin taşınımı 28
2.4.3. Şaperon Ailelerinin Genel Özellikleri ve Fibriler Alfa-Sinükleinin Taşınımıyla İlişkileri 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 34
3.1. Çalışma Basamakları ve Çalışmalara Göre Deney Grupları 34
3.1.1. Birinci Basamak: Hücre İçine Fibril Alımının Belirlenmesi 34

3.1.2. İkinci Basamak: Şaperonların Ekspresyon Değişiminin Belirlenmesi 36
3.1.3. Üçüncü Basamak: Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınımında Şaperonların Rolünün Araştırılması 37
3.1.4. Dördüncü Basamak: Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolünün Araştırılması.....38
3.2. Çalışma Protokolleri 39
3.2.1. Alfa-Sinükleinin Fibrilizasyonu ve Floresan Boya ile Boyanması.....39
3.2.1.1. Alfa-Sinüklein Fibrilizasyonu 39
3.2.1.2. Thioflavin T (ThT) Testi 39
3.2.1.3. Fibriler Alfa-Sinükleinin Floresan Boya ile Boyanması.....40
3.2.1.4. Fibril Kırma.....41
3.2.2. Hücre Kültür Çalışmaları 41
3.2.2.1. Çözdürülen SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürü 41
3.2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması.....42
3.2.2.3. Poli-L-Ornitin Kaplı Hücre Kültür Plakalarının Hazırlanması. 42
3.2.2.4. Hücrelerin Nörona Farklılaştırılması 43
3.2.2.5. Hücre Fiksasyonu.....44
3.2.2.6. Hücre kültüründe gerçekleştirilen uygulamalar 44
3.2.3. Fibrillerin hücre içine girişinin araştırılması.....45
3.2.4. İmmünofloresan işaretleme.....45
3.2.5. İmmünopresipitasyon.....47
3.2.6. Dot blot protokolü.....49
3.2.7. Western blot protokolü.....50
3.2.7.1. Membran soyma ve referans protein işaretlemesi.....52
3.2.8. Fibrillerin hücre dışına salınımının analizi 53
3.2.9. Sitotoksisite Ölçümü 53
3.2.10. İstatistiksel Analizler.....54
4. BULGULAR.....56
4.1. Alfa-Sinükleinin Fibrilizasyonu, Floresan boyanması ve Kırılması.....56
4.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması.....57
4.3. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçine Alınması 59
4.4. Hücre İçi Şaperon Ekspresyonunun Fibriler Alfa-Sinüklein Uygulamasına ve Zamana Bağlı Değişimi 62

4.5. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücresel Stres Seviyesine Etkisi.....67
4.6. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınımında Şaperonların Rolü 68
4.6.1. Western Blot Bulguları 68
4.6.2. Dot blot Bulguları 70
4.7. IP Deneylerinin Doğrulamaları.....74
4.8. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolü.....77
5. TARTIŞMA.....78
5.1. Şaperonların Ekspresyon Değişimlerinin İncelenmesi 78
5.2. Şaperonların Fibriler Alfa-Sinüklein ile Birlikteliğinin Hücre Içi Seviyelerinin Değişimleriyle İlişkisi.....83
5.3. Şaperonların Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınımındaki Rollerinin Hsp70'lerle İlişkisi.....87
5.4. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolü.....89
KAYNAKLAR.....91
HAM VERİLER 119
FORMLAR.....120
ETİK KURUL KARARI.....121
PATENT HAKKI İZNİ 122
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....123
ÖZGEÇMİŞ.....124

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: 40 ml SH-SY5Y hücre kültür medyumunun içeriği. 41
Tablo 3-2: 21 ml N-SH hücre kültür medyumunun içeriği. 43
Tablo 3-3: IF deneylerinde kullanılan antikor listesi. 46
Tablo 3-4: WB deneylerinde kullanılan antikorlar listesi. 51
Tablo 5-1: Şaperon ekspresyon deneylerinin ve f-aSyn taşınım deneylerinin karşılaştırılması. 84

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: PH'da bazı non-motor ve motor semptomların aşamalara göre ilerleyişi. 5
Şekil 2-2: Braak Sürecine göre sporadik PH'da LC'nin beyinde bölgeden bölgeye yayılması. 9
Şekil 2-3: aSyn'nin primer ve sekonder katlanma yapmış formları. 15
Şekil 2-4: Fizyolojik ve patolojik koşullarda aSyn'nin konformasyonları. 17
Şekil 2-5: F-aSyn'nin tohum, filizlenme ve kalıp özelliği. 22
Şekil 2-6: Tek bir hücre içerisinde f-aSyn'nin yayılma basamakları. 23
Şekil 2-7: Kinezin-1 taşıma kompleksi ve mikrotübüllerde kargo taşıma. 28
Şekil 2-8: F-aSyn'in hücre içi taşınımı. 30
Şekil 2-9: Kinezin-1 taşıma kompleksinden vezikül ayrılmasında ve sitoplazmik proteinlerin aksonal taşınmasında Hsc70. 32
Şekil 3-1: F-aSyn'nin çalışmalara göre hazırlanma şeması. 35
Şekil 3-2: Birinci basamak iş akış şeması. 35
Şekil 3-3: İkinci basamak iş akış şeması. 36
Şekil 3-4: Üçüncü basamak iş akış şeması ve grupların isimlendirmesi. 37
Şekil 3-5: Dördüncü basamak iş akış şeması ve deney grupları. 38
Şekil 3-6: Thioflavin T testinde ölçüm aralıklarına göre grafik ve reaksiyonun takibi. . 39
Şekil 3-7: LDH salınım yüzdesinin hesaplanmasında kullanılan denklem. 54
Şekil 4-1: aSyn fibirlizasyonu, floresan boyaması ve fibril kırma işlemlerinin doğrulamaları. 57
Şekil 4-2: N-SH hücrelerinde nöron belirteci olan MAP2 işaretlemesi ve hücre uzantılarının görüntüsü. 58
Şekil 4-3: N-SH hücrelerinde Hsc70 ve aSyn işaretlemeleri. 58
Şekil 4-4: 3 saat f-aSyn-488 inkübasyonu yapılan N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntülemesi. 59
Şekil 4-5: 6 saat f-aSyn-488 inkübasyonu gerçekleştirilen N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntüsü. 60
Şekil 4-6: 12 saat f-aSyn-488 inkübasyonu gerçekleştirilen N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntüsü. 61
Şekil 4-7: 9 saat f-aSyn-488 inkübasyonu gerçekleştirilen N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntüsü. 61

Şekil 4-8: Şaperon ekspresyon analizlerinin DB ve WB deneylerinin görüntüleri. 63
Şekil 4-9: Hsp27, Hsp32, Hsp40 ve Hsp60 şaperonlarının hücre içi seviyelerindeki değişim. 64
Şekil 4-10: HSPA4, Hsp90, GRP75 ve ubikitinin hücre içi seviyelerindeki değişim. ... 65
Şekil 4-11: Hsp10 ve Hsc70 şaperonlarının hücre içi seviyelerindeki değişim. 66
Şekil 4-12: Gruplar arası LDH salınım seviyelerinin karşılaştırılması. 67
Şekil 4-13: IP örneklerinin Hsp90, Hsc70, HSPA4 ve IgG hafif zincir WB işaretlemeleri. 69
Şekil 4-14: IP örneklerinin WB ölçümlerinden yapılan istatistiksel analizlerin grafikleri. 70
Şekil 4-15: IP örneklerinin DB analizindeki membran görüntüleri. 71
Şekil 4-16: IP örneklerindeki Hsp27, Hsp32, Hsp40 ve Hsp60 şaperonlarının DB ölçümlerinin istatistiksel analiz sonuçları. 72
Şekil 4-17: IP örneklerindeki HSPA4, Hsp90, GRP75, ubikitin ve Hsp10 şaperonlarının DB ölçümlerinin istatistiksel analiz sonuçları. 73
Şekil 4-18: Şekil 18: aSyn ve KLC1 arasındaki bağlanmanın IF ve WB ile gösterilmesi. 75
Şekil 4-19: F-aSyn-488 ve Hsp90'ın IF işaretlemesi. 76
Şekil 4-20: F-aSyn-488 ve Hsc70'in IF işaretlemesi. 76
Şekil 4-21: F-aSyn-488 salınımının belirleme grafikleri. 77

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μM: Mikro molar

AADC: Amino asit dekarboksilaz

ACTB: Beta aktin veya aktin beta

AH: Alzheimer Hastalığı

aSyn: Alfa-Sinüklein

BOS: Beyin-omurilik sıvısı

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür

DB: Dot blot

DJ1: PARK7 geni

DMSO: Dimetil süloksit

DXM: Dorsal IX/X motor nükleus

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

F-aSyn: Fibriler alfa-Sinüklein

F-aSyn-488: AlexaFluor 488 işaretli fibriler alfa-Sinüklein

FBS: Fetal sığır serumu

FC: Hızlı aksonal taşınım

GCI: Glial hücresel inklüzyon cisimleri

GRP75: Glukozla düzenlenen protein 75

Hsc70: Isı şoku proteini üyesi 70 kDa

Hsp: Isı şoku proteini

HSPA: Isı şoku protein A

IF: İmmünofloresan

IgG: İmmünoglobulin G

IP: immünopresipitasyon veya immünçöktürme

kDa: Kilo Dalton

KHC: Kinezin ağır bileşen

KIF: Kinezin süper ailesi

KLC: Kinezin hafif bileşen

LAG3: Lenfosit aktivasyon gen 3

LBD: Lewy Cisimcikli demans

LC: Lewy Cisimleri

LDH: Laktat dehidrojenaz

L-DOPA: L-3,4-dihidroksifenilalanin

LRRK2: Lösin-zengin tekrarlı kinaz 2

MAP2: Mikrotübül ilişkili protein 2

MEM: Minimal esansiyel medyum

mM: Mili molar

MPTP: 1-metil-4-phenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

MSA: Multipl sistem atrofisi

NAC: Non-amiloid compenent

NaCl: Sodium klorür

NACP: Non-amiloid compenent protein

NBM: Nöro bazal medyum

nm: Nano metre

nM: Nano molar

N-SH: Nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PET: Pozitron emisyon tomografisi

PFA. Paraformaldehit

PH: Parkinson Hastalığı

PIC: Proteaz inhibitor kokteyl

PINK1: PTEN ile uyarılan Kinaz 1

PLO: Poli-L-ornitin

PrPC: Hücresel prion proteinlerini

PrPSC: Fibriler prion proteinidir

SC: Yavaş aksonal taşıma

SCa: Yavaş aksona taşınıma tip a

SCb: Yavaş aksona taşınım tip b

SD: Standart sapma değeri

sHsp: Küçük ısı şoku proteini

SNc: Substantia nigra pars kompakta

SNCA: Sinüklein alfa geni

TH: Tirozin hidroksilaz

ThT: Thioflavin T

TPBS: Triton X-100 içeren PBS

VER: VER-155008

VMAT2: Veziküler monoamin taşıyıcı 2

VSP35: Vakuolar Protein Sınıflamayla İlişkili Protein 35

WB: Western blot

ÖZET

Çamoğlu, T. (2020). Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınım ve Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolünün Nörona Farklılaştırılmış Hücrelerde Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Parkinson Hastalığı, klinik olarak belirli hareket bozukluklarıyla ve patolojik olarak hücre içinde Lewy Cisimleri ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık, beyinde zamanla daha çok bölgeyi etkiler ve buna bağlı olarak yeni semptomlar ortaya çıkar. Postmortem patolojik incelemeler, sporadik vakalardaki ilerleme sürecinin belirli bir düzenle ve hücreler arası bağlantıları takip edecek şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. İlerleyen yıllarda, bu ilerleme sürecinin prion-benzeri özellikler sergileyen fibriler alfa-Sinüklein (f-aSyn)'den kaynaklanabileceği ileri sürülmüş ve takibinde yapılan pek çok çalışma ile bu görüş desteklenmiştir. F-aSyn, nöronal uzantılarda kinezin motor proteini ile aktif olarak taşınarak bir hücreden diğerine ve beyinde bölgeden bölgeye yayılabilmektedir. Kinezin-1, farklı adaptörler kullanarak kargolarına bağlanmaktadır ve f-aSyn'nin de bir adaptör aracılığıyla bağlayarak taşınmasını sağlayabilir. Şaperonlar, kinezin-1 ile sitoplazmik proteinler arasında adaptör olabildikleri ve f-aSyn ile bağlanabildikleri için bu çalışma kapsamında adaptör olabilecekleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, f-aSyn'in hücresel stress ve şaperonların ekspresyonu üzerindeki etkileri de çalışmaya alınmıştır. Bu doğrultuda, nörona farklılaştırılan hücrelere 1μM f-aSyn uygulaması gerçekleştirilerek, sırasıyla, konfokal mikroskobuyla f-aSyn'nin hangi zaman aralığında hücre içine girdiği, total protein izolasyonu ardından immün blotlamayla şaperonların ekspresyonlarına etkisi, immün çöktürme ve immün blotlamayla şaperonların f-aSyn'nin taşınımı ve florometrik ölçümlerle hücre dışına salınımındaki rolleri araştırıldı. Elde ettiğimiz bulgulara göre, f-aSyn hücre içine girdiği ilk 12 saatte hücresel stres seviyesini ve şaperonların çoğunun hücre içi seviyelerini düşürmüş veya baskılamıştır. Ayrıca, Hsp40'ın f-aSyn'ye bağlanarak taşınımı sırasında ona refakat ettiğine yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu çalışma, f-aSyn'nin şaperonları baskılayarak hücresel müdahalelerden kurtulmak için zaman kazandığını ve şaperonları refakatçı olarak yanına alabildiğini sistemli bir şekilde inceleyen ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, fibriler alfa-Sinüklein, kinezin, şaperonlar, prionoid hipotezi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33479

ABSTRACT

Camoglu, T. (2020). Investigation of the Roles of Chaperones on Intracellular Transport and Extracellular Release of Fibrillar Alpha Synuclein in Neuron-Differentiated Cells. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

Parkinson's Disease is a neurodegenerative disorder characterized with certain movement disorders clinically and Lewy Bodies pathologically. Within time, it effects many region in the brain, and relation to this, new symptoms are seen. Postmortem pathological examinations have revealed that the progression process occurs in a certain order and follows cellular connections in sporadic cases. That the progression may be caused by fibrillar alpha-synuclein (f-aSyn) exhibiting prion-like features has been suggested, and subsequent studies have supported this opinion. F-aSyn spreads cell-to-cell and region-to-region in the brain by being transported on neurites by kinesin motors. Kinesin-1 can use adapters to load its cargos, and may transport f-aSyn in the same way. Because of their roles in cytoplasmic protein transport, we have considered the chaperones as adapter candidates in f-aSyn transport. Moreover, the effects of f-aSyn on cellular stress and the expression of chaperones was also investigated. Accordingly, by applying 1µM f-aSyn to neuron-differentiated cell, the time interval of cellular uptake of f-aSyn was investigated by confocal microscope. The expression levels of chaperones was determined by immunoblots following total cellular protein isolation. Finally, the roles of chaperones on transport and release of f-aSyn were studied by immunoblots following immunoprecipitation and by fluorometric measurements, respectively. According to our findings, within first 12 hours of its uptake, f-aSyn reduced cellular stress level, and reduced or suppressed intracellular level of most of the chaperones. Moreover, for the first time, we have presented the findings indicating that Hsp40 can take role as accompanist in transportation of f-aSyn.

Key Words: Parkinson's Disease, fibrillar alpha-Synuclein, kinesin, chaperones, prionoid hypothesis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No. 33479

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), belirli hareket bozukluklarıyla karakterize edilen ve zamanla giderek ağırlaşan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hücre içinde görülen Lewy Cisimleri (LC), PH'nin patolojik bulgularını oluşturur. Hastalık, özellikle beynin substantia nigra pars kompakta (SNc) bölgesinin dopaminerjik nöronları üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir. Bu bölge, istemli harekleretin düzenlenmesinde görev alır ve hastalık süresince uğradığı dejenerasyon, PH ile karakterize hareket bozukluklarının çıkışına yol açar. Her ne kadar PH, SNc ile ilişkilendirilse de sporadik vakalarda PH'nin bireylere tanı konulmasından yıllar önce başladığı ve sonrasında bu bölgeye ulaştığı belirtilmektedir. Dolayısıyla, PH tanı öncesinde beynin farklı bölgelerini etkilemekte ve zamanla yayılabilmektedir.

Sporadik vakalarda hastalığın yayılması, beyinde LC'lerin görüldüğü bölgelerin takibi üzerinden yapılmış ve Braak Hipotezi ismi verilen bir süreç olarak düzenlenmiştir. Braak Hipotezine göre LC'ler, SNc'ye ulaşmalarından yıllar önce beynin bu kısmına uzak bölgelerinde görülmeye başlanmakta ve hücreler arası bağlantıları takip edecek şekilde hücreden hücreye yayılmaktadır. Beyinde bu aşamalı yayılma sürecinin görüldüğü bölgelerdeki hücresel işlevlerin etkilenmesine bağlı olarak, PH'ye zamanla yeni semptomların eklenmesi bu şekilde açıklanabilmektedir. Hücre dışına çıkamayacak ve hücre içine alınamayacak büyüklükte olan LC'lerin bir hücreden diğerine geçiş yapması nasıl mümkündür? Bu sorunun yanıtı, LC'lerin yapısının baskın bileşeni alfa-Sinüklein (aSyn) üzerinden açıklanabilir.

aSyn, LC'lerin yapısında fibriler alfa-Sinüklein (f-aSyn) olarak bulunur. LC'lerin ve dolayısıyla PH'nin beyinde giderek yayılmasının, f-aSyn'nin prion-benzeri özellikler sergilemesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüş ve pek çok çalışma ile bu desteklenmiştir. F-aSyn'nin prion-benzeri özelliği, hücre içine girme, hücre içinde çoğalma, hücre içi taşınım ve hücre dışına salınım olarak 4 aşamada gerçekleşmektedir. F-aSyn'nin hücre içine girmesinde ve hücre dışına salınımında rol alan hücresel süreçler çoğunlukla aydınlatılmışsa da, hücre içine giriş yaptığındaki maruz kaldığı hücresel müdahaleleleri nasıl baskıladığı ve taşınımında rol alan aktörler tam olarak aydınlatılamamıştır.

F-aSyn, uygun koşullar altında dengeye ulaşana kadar ortamda bulunan monomer aSyn'leri yapısına katarak kendisini çoğaltabilmekte ve giderek büyük yapılar oluşturabilmektedir. Hücreler bu tür agregasyon süreciyle mücadele etmek için şaperonlar, ubikitin proteazom sistemi veya lizozomlar gibi bileşenlerden oluşan protein kalite kontrol sistemi elemanlarını kullanabilmektedir. Ancak f-aSyn, çoğalmasının önünde engel oluşturabilecek bu müdahale araçlarını henüz net olarak bilinmeyen bir şekilde aşabilmekte ve kendisini çoğaltabilmektedir. Hücresel müdahale araçları olarak şaperonlar ise protein agregasyonuyla mücadelede erken müdahale araçlarındandır. In vitro çalışmalarda, şaperonların f-aSyn'ye bağlanabildiği, büyümesini engellendiği ve uygun şartlarda parçalayabildikleri gösterilmiştir. Diğer yandan, f-aSyn'nin hücre içinde çoğalması, hücre içindeki şaperon müdahalelerinin yetersiz olduğuna işaret etmektedir. Şaperonların aşırı eksprese edildiği modellerde f-aSyn'nin çoğalmasının azaltıldığına yönelik kanıtlar bize, f-aSyn'nin, şaperonların hücre içi seviyelerine etki ederek onlardan kurtulabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle, sunulan çalışmanın bir ayağında f-aSyn'nin hücre içi şaperon seviyelerine etkisi araştırılarak hücresel müdahalelerde görülebilen zafiyetteki rolünün anlaşılması hedeflenmiştir.

Öte yandan, patolojinin ilk görüldüğü yerlerden uzakta olan SNc'ye taşınımı ve daha sonrasında neokortekse kadar ulaşmasında f-aSyn'in nöron uzantıları boyunca taşınımı rol almaktadır. Nitekim deney hayvanları ve hücre kültürlerinde yapılan modellemeler de bu bilgiyi desteklemektedir. F-aSyn'nin nasıl taşındığıyla ilgili yapılan çalışmalarda hareket analizi gerçekleştirilmiş ve kinezin-1'in kullanıldığı bir taşıma tipiyle hareket ettiği belirlenmiştir. Kinezin-1, taşıyacağı kargoya göre farklı adaptörler ile hedeflerine bağlanabilmektedir. Bir başka deyişle, adaptörler kargoların kinezin-1'e bağlanmasını sağlayarak taşınımlarını sağlamaktadır. Dolayısıyla, f-aSyn'nin kinezin-1'e bağlanmasını sağlayacak olan bir adaptör, aynı zamanda onun, beynin birbirinden uzak bölgelerine hücresel uzantılar aracılığıyla taşınımına da neden olmaktadır. Dolayısıyla adaptörlerin aydınlatılması, f-aSyn'nin taşınım süreçlerinin önemli bir bileşenini de ortaya koyacak ve ileride yapılacak tedavi araştırmaları için bir hedef oluşturabilecektir. Bu nedenle çalışmanın diğer bir ayağında f-aSyn'nin taşınımında rol alan adaptörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda yaptığımız araştırmalar sonucu şaperonların iyi birer adaptör adayı olabileceğini değerlendirdik. Bunun nedeni: 1. Şaperonlar f-aSyn'ye bağlanabilmektedir.

2. F-aSyn protein agregatı olsa da taşıma sistemi tarafından taşınması gereken bir protein demeti olarak görülebilir. 3. Şaperonlar sitoplazmik proteinlerin hücre içi taşınımında kinezin-1 için adaptör görevi görebilmektedir. 4. F-aSyn'in kinezin-1 ilişkili bir sistemle taşındığı gösterilmiştir. Diğer yandan, şaperonların f-aSyn'nin taşınımında adaptör olmak dışında farklı görevler alabilecekleri de düşünülmüştür. Şaperonlar, f-aSyn'lere müdahale ederken onlara bağlanabilmektedir. Bize göre, bu bağlanma sürerken f-aSyn kendisine bağlı olan şaperonlarla birlikte kinezin-1'e yüklenebilir ve birlikte taşınabilir. Bir başka deyişle şaperonlar, f-aSyn'lere hücre içinde taşınımları sırasında refakat edebilir. Bu nedenle sunulan çalışmada, bu şekilde görev alabilecek şaperonlar için "refakatçı" tanımlaması kullanılmıştır. Değerlendirmelerimize göre refakatçılar 3 şekilde görev alabilir: ilki, f-aSyn ile olan mücadelesi sırasında ona bağlı olduğu için taşınımı sırasında f-aSyn'ye bağlı kalan zoraki refakatçılar; ikincisi f-aSyn'ye taşınımı sırasında bağlı olan diğer şaperonların çalışmasını düzenlemek için onlara bağlı olan düzenleyici refakatçılar; ve sonuncusu, hücre içinde taşınımı sırasında hücre içinde f-aSyn'yi kontrol altında tutan refakatçılar.

Son olarak, f-aSyn hücre içinde çoğalma ve taşınmanın yanı sıra aynı zamanda hücre dışına salınmaktadır. Bu sayede bir hücrenin içerisinden çıkıp bir diğerine geçiş yapabilmektedir. Hsc70'lerin fizyolojik koşullarda tau ve aSyn'nin salınımında rol aldığı gösterildiğinden, f-aSyn'nin hücre içi taşınımında rol alabilecek Hsp70'lerin, aynı zamanda onun hücre dışına salınımında etkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışma, f-aSyn'nin hücre içine girişinin araştırılması, f-aSyn'nin hücre içinde şaperonların seviyelerine etkisi, şapeornların f-aSyn'nin hücre içi taşınımındaki rolleri ve şaperonların f-aSyn'nin hücre dışına salınımına etkisi şeklinde 4 basamakta ele alınmıştır. Çalışma kapsamında, nörona farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerine in vitro koşullarda hazırlanan f-aSyn uygulanmıştır. Çalışmada Hsp27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, HSPA4, Hsp90, GRP75, ubikitin, Hsp10 ve Hsc70 şaperonları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

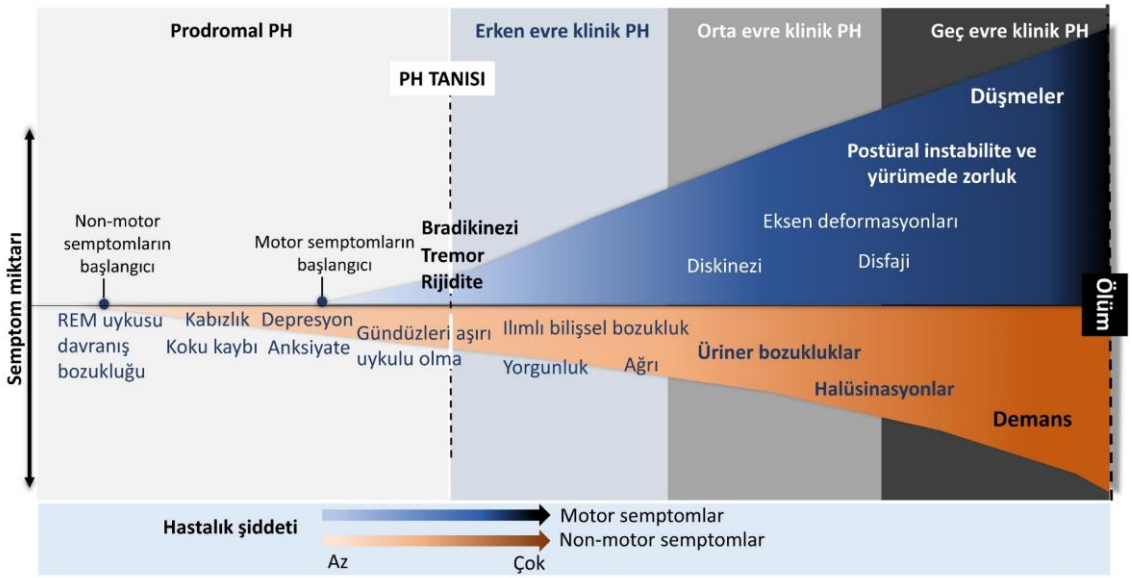
2.1. Parkinson Hastalığı ve Semptomları

İlk olarak 1817'de James Parkinson tarafından "titreyen felç (shaking palsy)" şeklinde tanımlanan, daha sonra Jean-Martin Charcot tarafından Parkinson Hastalığı (PH) olarak isimlendirilen bu hareket bozukluğu, Alzheimer Hastalığı (AH)'nın ardından Dünyada en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıktır (Poewe ve ark. 2017). Hastalık, istemli hareketin kontrolünün zamanla ilerleyen bozulmasıyla karakterizedir ve büyük oranda 50 yaş üstü bireylerde görülmekle birlikte, ortalama olarak 65 yaş üstü bireylerde görülme sıklığı artmaktadır (Barker ve Williams-Gray, 2016; Hirsch ve ark. 2016; Tysnes ve Storstein, 2017). Yaklaşık %90 oranında sporadik olarak ortaya çıkan PH, yaklaşık %10 oranında ise ailesel altyapıya sahiptir (Surmeier ve ark. 2017). sinüklein alfa (SNCA), parkin, PTEN ile uyarılan Kinaz 1 (PINK-1), DJ1 (PARK7), Vakuolar Protein Sınıflamayla İlişkili Protein 35 (VSP35), DNAJC6 ve Lösin-zengin tekrarlı kinaz 2 (LRRK2) gibi pek çok genin mutasyonları ailesel PH ile ilişkili olarak tanımlanmıştır (Mandemakers ve ark. 2007; Poewe ve ark. 2017). Henüz kesin olarak spontan vakaları hangi faktörün veya faktörlerin tetiklediği belirlenememiş olsa da, hastalığın başlangıcının ilk klinik belirtilerin görülmesinden 10 yıllar öncesine dayandığı düşünülmektedir (Heiko Braak ve ark. 2003). Bununla birlikte hastalığın klinik tablosunun ölüme kadar olan sürede ağırlaştığı bildirilmiştir (Barker ve Williams-Gray, 2016).

Nörodejeneratif hastalıklar, beyinde veya sinir sisteminin genelinde etkiledikleri bölgelere göre belirli klinik semptomlarla ilişkilendirilmektedir. Örneğin, AH, demans ve kognitif bozukluklar ile ilişkilendirilirken; PH, hastalarda belirli motor fonksiyonlardaki bozukluklar görülmesiyle karakterize edilmiştir. Klinikte motor fonksiyon bozuklukları ile ortaya çıkan semptomlara bağlı olarak bireylere teşhis konulmaktadır (Barker ve Williams-Gray, 2016; Poewe ve ark. 2017). Başta hareket yavaşlığı (Bradiknezi) olmak üzere, bereberinde kas tonusunda sertlik (rijidite) ve dinlenme halinde parmaklarda "para sayma hareketi" olarak tanımlanan titreme (tremor), PH tanısı konulması için istenen motor belirtilerdir (Barker ve Williams-Gray, 2016; Surmeier ve ark. 2017; Tysnes ve Storstein, 2017). Bu semptomlar, istemli hareketin düzenlenmesinde görev alan substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronlarının dejenerasyonuna bağlı

olarak, hücreler arası dopamin nörotransmiterinin sinyalizasyonundaki bozuklukla ilişkilendirilmektedir (Damier ve ark. 1999; Fearnley ve Lees, 1991).

Her ne kadar PH başlıca motor işlevlerdeki bozukluklarla ilişkilendirilse de hastalık süresince non-motor semptomlar da görülmektedir (Şekil 2-1). Dahası, yapılan çalışmalar bazı non-motor semptomların motor semptomlardan önce, tanı öncesi fazda görülmeye başladığını belirtmektedir (Poewe ve ark. 2017; Schapira ve ark. 2017). Bu nedenle PH'nın non-motor semptomlarının görüldüğü bu aşamasına "prodromal PH" denirken (Berg ve ark. 2015); tanı konulmuş, dolayısıyla motor semptomların görüldüğü PH'ya ise "klinik PH" denilmiştir (Poewe ve ark. 2017).



Şekil 2-1: PH'da bazı non-motor ve motor semptomların aşamalara göre ilerleyişi.
Poewe ve ark. (2017)'den değiştirilmiştir.

Prodromal fazdaki non-motor semptomlar, koku duyusunun azalması (Bohnen ve ark. 2008), gastrointestinal bozukluklar (Fasano ve ark. 2015; Pfeiffer, 2011), depresyon ve endişe gibi duygu durum bozuklukları (Dissanayaka ve ark. 2010; Lin ve ark. 2015; Reijnders ve ark. 2008), uyku düzeninin bozulması (Olanow ve ark. 2000) olarak sıralanabilir. İleriki evrelerde bu semptomlara, demans (Bohnen ve ark. 2008; Hely ve ark. 2008; Postuma ve Gagnon, 2010), kronik ağrı (Beiske ve ark. 2009; Nègre-Pagès ve ark. 2008) ve üriner bozukluklar (Schapira ve ark. 2017) da olmak üzere başka semptomlar eklenebilmektedir. Nasıl ki istemli hareketin kontrolünün bozulması

substantia nigranın dopaminerjik nöronlarının dejenerasyonuyla ilişkiliyse, söz konusu semptomlar da ilgili fonksiyonları yürüten beyin bölgelerinin hastalık sürecinde etkilenmesiyle ilişkilendirilmektedir (Schapira ve ark. 2017). Örneğin koklama duyusunun zayıflaması (hyposmia) aslında PH'nın ilk semptomlarından biridir ve Parkinson hastalarında yapılan post mortem incelemeler, beyinde patolojik bulguların ilk görüldüğü bölgelerden birinin koku duyusunda görev alan olfaktör bulbus olduğunu göstermiştir (Bohnen ve ark. 2008; Heiko Braak ve ark. 2003). Motor ve non-motor semptomların giderek şiddetlenmesi ve zamanla var olan semptomlara yenilerinin eklenmesi, PH süresince patolojinin sadece substantia nigra ile kısıtlı kalmadığını; dahası, bu bölgenin dışındaki bölgelerden başlamış olabileceğini ve giderek yayılabileceğini göstermektedir (Heiko Braak ve ark. 2003; Brettschneider ve ark. 2015; Schapira ve ark. 2017).

Bu yayılma süreci, nörodejenerasyon süresinde beyinde ilgili bölgelerde Lewy Patolojisi olarak adlandırılan patolojik bulguların görülmesiyle de doğrulanmaktadır (Heiko Braak ve ark. 2003). Dolayısıyla PH'ya yakalanan bireylerde, zamanla yeni semptomların eklenebilme özelliği ve var olan semptomların ağırlaşmasının takibi, post mortem yapılan patoloji çalışmalarının sonuçları ile uyumlu görülmektedir (Heiko Braak ve ark. 2003).

2.2. Lewy Patolojisi

Fritz Heinrich Lewy, postmortem Parkinson hastalarında yaptığı beyin kesit incelemelerinde, daha sonraları Lewy Cisimleri (LC) olarak adlandırılacak olan, eozinle boyanan yapılar olduğunu belirlemiştir (Engelhardt ve Gomes, 2017). LC'ler, nöron sitoplazmasında bulunan, alfa-sinüklein (aSyn) peptidi birikimlerini yüksek miktarda içeren patolojik yapılardır ve hücrelerin gövdelerinde olabildiği gibi nöritlerde de görülebilmektedir. Nöritlerde görülen bu patolojik yapılar "Lewy nöritleri" olarak isimlendirilirler (Surmeier ve ark. 2017; Wakabayashi ve ark. 2013).

Çoğunlukla PH ile ilişkilendirilse de Lewy patolojisi, Lewy cisimcikli demans'ın yanı sıra AH de dahil olmak üzere başka hastalıklarda da saptanabilmektedir (Hamilton, 2000; Wakabayashi ve ark. 2013; Wong ve Krainc, 2017). Hasta bireylerde görülmenin yanı sıra klinik olarak "sağlıklı" görülen bireyler de Lewy patolojisine rastlanılmaktadır (Heiko Braak ve ark. 2003; Gibb ve Lees, 1988). Diğer yandan nadir görülen bir nörodejeneratif hastalık olan multipl sistem atrofisinde (MSA), daha çok

oligodentrositlerde olmak üzere glial hücresel inklüzyon cisimleri (GCI) adı verilen hücre içi patolojik yapılar tanımlanmıştır (Grazia Spillantini ve ark. 1998; Tu ve ark. 1998). Bu yapılar, her ne kadar LC'ler ile aynı isimlendirilmese de tıpkı onlar gibi aSyn'nin baskın olduğu patolojik yapılardır (Grazia Spillantini ve ark. 1998).

LC'lerin aSyn-baskın patolojik yapılar olarak tanımlanması, bu yapıların oldukça kompleks bileşenler olmasından ileri gelmektedir. Sadece aSyn değil, bilindiği kadarıyla LC'lerin yapısında 90'dan fazla farklı molekül tanımlanmıştır (Wakabayashi ve ark. 2013). Bunlar içinde şaperonlar, histon deasetilazlar, dineyin ve kinezin motor proteinleri ve mitokondriyal proteinler de bulunmaktadır (Wakabayashi ve ark. 2013). Yapısal olarak incelendiğinde ise LC'lerdeki filamentöz yapılara dikkat çekilmiş ve nörofilamentlerin LC yapısını oluşturabileceği ileri sürülmüştür (Goldman ve ark. 1983; Schmidt ve ark. 1991). Her ne kadar nörofilamentler LC'lerde bulunsa da, LC yapısındaki bu filamentöz yapıların aSyn immün pozitif yapılar olduğu belirlenmiştir (Wakabayashi ve ark. 1998). Bu yapılar içerisinde birikmiş aSyn'nin büyük kısmının 129. amino asidi fosforillenmiştir (s129-P) (Fujiwara ve ark. 2002). Bu nedenle, bu fosforlasyona özgü antikorlar geliştirilerek LC'ler, dolayısıyla Lewy patolojisi için bir belirteç olarak kullanılmıştır (Heiko Braak ve ark. 2003).

LC'lerin nöronlar için koruyucu mu yoksa zararlı mı olduğu konusunda görüş ayrılıkları vardır (Wakabayashi ve ark. 2013). Bir görüşe göre, LC'ler hücreler için zararlıdır ve nöron dejenerasyonuna yol açmaktadır. Diğer görüşe göre ise, LC'ler hücrelerde işlev bozukluğu çıkaran değil, aksine hücrelerin kendilerini korumak için oluşturdukları hücre içi yapılar olarak tanımlanmaktadır. Lewy patolojisinin görüldüğü alanlarda her zaman hücre ölümü görülmemesi (Halliday ve ark. 2012) ve klinik olarak sağlıklı bireylerde de LC'lerin görülmesi bu hipotezi desteklemektedir (Heiko Braak ve ark. 2003; Gibb ve Lees, 1988). LC'ler, şaperonlar (Auluck ve ark. 2002; McLean ve ark. 2002), ubikitin (Kuzuhara ve ark. 1988) ve ubikitin-proteazom sistemi bileşenlerini (McNaught ve ark. 2002) içeren protein kalite kontrol sistemi elemanlarını yapılarında bulundurur. Bu bileşenlerin LC'lerde bulunması, hücrenin patolojik süreç boyunca hücre işlevini sağlamak ve yapısını korumak için mücadele ettiğini göstermektedir. Bu nedenle LC'ler, hücrelerin üzerlerindeki baskıyı en aza indirgemek üzere belirli patolojik bileşenleri belirli bölgede bir araya toplayarak kontrol altında tutmalarının ürünü olarak değerlendirilebilir (Wakabayashi ve ark. 2013).

LC'ler baskın olarak merkezi sinir sisteminde görülür ve amigdala (Heiko Braak ve ark. 1994), olfaktör bulbus (Pearce ve ark. 1995), lokus koreleus ve substantia nigra (Den Hartog Jager ve Bethlem, 1960), hipotalamus (Ohama ve Ikuta, 1976), serebral korteks (Wakabayashi ve ark. 1995), serebellum (Kakita ve ark. 1994), dorsal vagal nükleus (Heiko Braak ve ark. 2003) gibi pek çok bölgeye yayılabilmektedir. Bununla birlikte, bu patolojiler periferal sinir sisteminde de pek çok bölgede rapor edilmiştir (Wakabayashi ve ark. 2013).

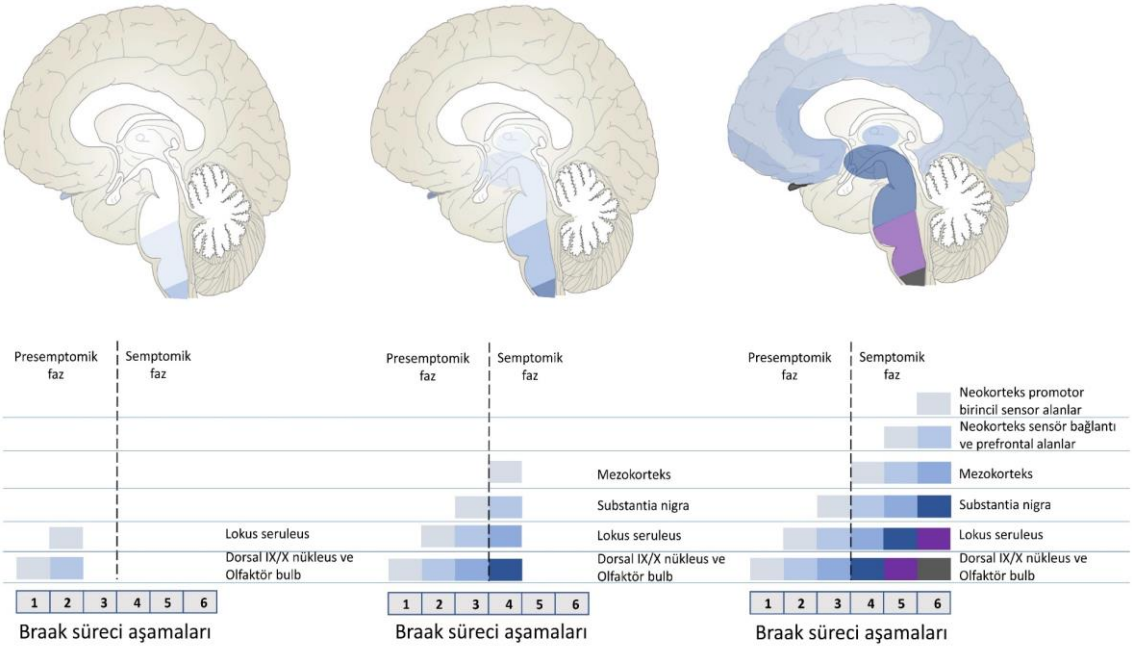
Tıpkı PH semptomlarının kademeli olarak ilerlemesinde olduğu gibi, LC'ler de görüldükleri bölgelerde eş zamanlı olarak ortaya çıkmamakta; aksine kademe kademe ve belirli bir paterni izleyerek yayılmaktadır (Heiko Braak ve ark. 2003). Bununla birlikte, LC'ler büyük hücre içi yapılardır ve bir hücreden diğerine geçiş yapamazlar. Bu durumda PH'nin ilerleyerek zamanla beyni bölge bölge etkilemesiyle, LC'lerin benzer şekilde yayılması arasındaki bağlantıyı sağlayan unsur nedir? Bu sorunun cevabı, prion hastalıklarıyla kurulan benzerliklerle açıklanmaktadır.

2.2.1. Lewy Patolojisinin Yayılması ve Braak Hipotezi

Lewy patolojisinin yayılma sürecini belirli bir düzene oturtan ilk kapsamlı çalışma Braak ve arkadaşları tarafından yayımlanmıştır (Heiko Braak ve ark. 2003). aSyn, LC'lerin baskın bileşeni olduğundan, bu çalışmalarda araştırmacılar 50 yaş üzerindeki Parkinson hastaları ve aynı yaş grubundan sağlıklı kontrollerde postmortem beyin kesit çalışmalarıyla, hücre içinde aSyn immün işaretlemeleri yapmış; yoğun işaretlenen bölgelerde Lewy patolojisi olduğunu belirleyerek, sporadik vakalarda Parkinson patogenezini anlamaya çalışmıştır. İleriki yıllarda bu çalışmaların çıktılarına "Braak Hipotezi" veya "Braak süreci" denilmiştir.

Braak sürecinde patogenezin 6 aşamada yayıldığı belirtilmiştir (Şekil 2-2). Buna göre, patogenez birinci aşamada dorsal IX/X motor nükleus (DXM) bölgesinde görülmektedir. Bu bölge, beyin sapında medulla bölgesindedir ve vagal ve glossofaringeal sinir hücrelerinin gövde bölgesidir (Kandel ve ark. 2013). Bu sinirler büyük oranda sindirim sistemi organları ile iletişimi sağlamanın yanı sıra tat alma ile ilgili bilgileri beyne taşımaktadır (Kandel ve ark. 2013). Prodromal PH süresince sindirim problemlerinin görüldüğü göz önüne bulundurulduğunda, semptomların ilerleme süreci ve Lewy patolojisinin yayılma sürecinin uyumlu olduğu düşünülebilir. İkinci aşamada patoloji serotonerjik rafe çekirdeği nöronlarında ve pigmentli nöradrenerjik lokus

koreleusu da içeren omurilik soğanı ve orta beyin bölgelerinde görülmüştür. Bu bölgeler uyku-uyanıklık, acı duyusu ve duygu durum gibi işlevlere katılır (Bear ve ark. 2016).



Şekil 2-2: Braak Sürecine göre sporadik PH'da LC'nin beyinde bölgeden bölgeye yayılması.

H. Braak ve ark. (2003)'ten uyarlanmıştır. Renk koyuluğundaki artış LC patolojisinin bölgedeki artışını temsil etmektedir. Şekilde soldan sağa patolojinin erken evrelerinden geç evrelerine kadarki ilerleyişi gösterilmektedir.

PH'nin en belirgin bulgularından olan substantia nigra dopaminerjik nöronlarının dejenerasyonuyken, Lewy patolojisinin ancak 3. aşamada bu bölgeye geçiş yaptığı görülmüştür. Patoloji dördüncü aşamada mezo-kortekse ulaşır. 3 ve 4. aşamalar aynı zamanda PH'nın klinik belirtilerinin görüldüğü tanı aşamaları olarak gösterilmektedir (Heiko Braak ve ark. 2003; Poewe ve ark. 2017; Surmeier ve ark. 2017). Bu duruma önemli bir örnek ise bu ve benzer çalışmalarda PH açısından "sağlıklı" olarak bilinen bireylerde LC yapılarının görülmüş olmasıdır (Heiko Braak ve ark. 2003; Hawkes, 2008; Surmeier ve ark. 2017). Bu bireylerde patoloji substantia nigraya ulaşamadan bireyler hayatını kaybetmiştir. Dolayısıyla Braak ve arkadaşları, çalışmalarında bu bireylerin "yeteri kadar yaşayabilselerdi PH'nin motor belirtilerini göstererek PH tanısı konulacağını" belirtmiştir (Heiko Braak ve ark. 2003). Lewy patolojisi beş ve altıncı aşamalarda neokortekse ulaşmış olur. Bu bölge bilişsel işlevlerin yerine getirildiği

bölgeleri de içermektedir. Hastalığın ileri evrelerine kadar hayatta kalan bireylerde, bilişsel yeteneklerde bozulma rapor edilmiştir (Poewe ve ark. 2017).

Patogenezin yayılma süreci ve etkilediği bölgelerin semptomlarla ilişkisi, Braak sürecinde yukarıda bahsedildiği gibi özetlenebilir. Bu çalışmalar Lewy patolojisinin gelişigüzel yayılma göstermediğini ve PH'da etkilenen bölgelerde eş zamanlı olarak başlamadığını, aksine nöral bağlantıları takip edecek şekilde yayılma gösterdiğini işaret etmektedir (H. Braak ve ark. 2003; Heiko Braak ve ark. 2003). Bununla birlikte, bu yayılma sürecinde LC'ye sahip olan nöronla bağlantı kuran her nöronun etkilenmediğinin ve belirli hücre tiplerinin Lewy patolojisine daha yatkın olabileceği ileri sürülmüştür (H. Braak ve ark. 2003; Diederich ve ark. 2020).

Her ne kadar Braak Hipotezi güçlü kanıtlarla patogenezin yayılma motifini açıklayabilse de, bazı araştırma sonuçları Braak aşamalarıyla uyumsuzluklar içermektedir. Örneğin, Braak hipotezinde Lewy patolojisi DXM ve olfaktör bulbus bölgelerinden başlamaktadır. İki taraftan başlayan bu süreç modeline "çift vuruş hipotezi" ismi verilmiştir (Hawkes, 2008). Oysa başka araştırmalarda, incelenen vakaların %7'sinde DXM bölgesinde hiç LC'ye rastlanılmazken, olfaktör bulbus'ta LC'ler görüldüğü ve incelenen vakaların yaklaşık yarısının Braak Hipoteziyle uyumlu olduğu rapor edilmiştir (Kalaitzakis ve ark. 2008). Bu nedenle PH'nın, DXM'den başlayanlarının "bağırsak başlangıçlı PH"; olfaktör bulbustan başlayanlarının ise "beyin başlangıçlı PH" olarak sınıflandırılması önerilmiştir (Borghammer ve Van Den Berge, 2019).

Nereden başladığı ve hücrelerin patolojiye hassasiyeti bir kenara bırakılırsa, patolojinin büyük oranda hücreler arası bağlantıları takip edecek şekilde yayıldığı anlaşılmaktadır (H. Braak ve ark. 2003; Kara ve ark. 2018). Braak ve arkadaşları ilk çalışmalarında bu yayılmanın bilinmeyen bir patojen tarafından gerçekleştirilebileceğini ileri sürmüştür (H. Braak ve ark. 2003). Daha sonraları bu araştırma ekibi, söz konusu patojenin virüsler olabileceğini dile getirmiştir (Hawkes, 2008). Lewy patolojisinin yayılması büyük oranda hücreler arası bağlantıları takip ettiğinden ve LC'ler hücre dışına çıkıp yayılamayacak kadar büyük yapılar olduğundan, bir patojenin varlığından şüphelenilmesi mümkündür. Ancak, ileriki yıllarda yayımlanan çalışmalar, bu patojenin virüslerden ziyade proteinlerin oluşturduğu patolojik formlar olduğu görüşünü desteklemiştir. Söz konusu çalışmalar, günümüzde "prionoid hipotezi" olarak

isimlendirilen görüşün temelini atmıştır ve bu hipoteze göre söz konusu patojen, fibriler formdaki alfa-Sinüklein'dir.

2.3. Alfa-Sinüklein İşlevleri ve Hücre İçindeki Yerleşimi

Alfa-sinüklein (aSyn), Lewy Patolojisinin baskın bileşeni olarak tanımlanmasından 9 sene önce ilk olarak torpido balığı elektrik organında yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır (Maroteaux ve ark. 1988). Bu çalışmada protein, sinaptik alanda olduğu kadar nüklear membran ile de ilişkili olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle proteinin ismindeki "sin-" eki (İngilizce Syn-) proteinin sinaptik alandaki varlığına işaret etmekteyken; "-nüklein" eki ise (İngilizce -nuclein) proteinin hücre nükleusu ile olan ilişkisine işaret etmektedir. İleriki yıllarda sinüklein ile homoloji gösteren 2 protein daha tanımlanmıştır. "Sinüklein ailesi" olarak bir isim altında birleştirilen bu proteinlerin tanımlanan ilk üyesi alfa-Sinüklein (aSyn), daha sonraki üyeleri keşif sıralarına göre β-sinüklein (Nakajo ve ark. 1990; Tobe ve ark. 1992) ve γ-sinükleindir (Buchman ve ark. 1998; Ji ve ark. 1997; Ninkina ve ark. 1998).

Sinüklein ailesine mensup proteinler içinde aSyn nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmesi açısından önemli bir yer tutmaktadır. Her ne kadar büyük oranda Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilse de aSyn'e, ilk olarak Alzheimer Hastalığının patolojik bulgularında rastlanılmıştır (Burré ve ark. 2018; Ueda ve ark. 1993). Alzheimer patolojisi üzerine yapılan postmortem beyin incelemelerinde, aSyn'in bir bölgesi amiloid plaklara katılan ikinci en baskın bileşen olarak tanımlanmış ve bu bölge non-amiloid compenent (NAC) olarak isimlendirilmiştir (Ueda ve ark. 1993). Bu çalışmada NAC olarak isimlendirilen bölge, 140 amino asit uzunluğunda olan NAC proteini (NACP) olarak isimlendirdikleri bir proteinin kırpılan 61-95 amino asitlik bölgesi olarak değerlendirilmiştir (Ueda ve ark. 1993). Dolayısıyla bu çalışmada NACP ve aSyn'in aynı protein olduğu o yıllarda anlaşılamamıştır. İleriki yıllarda NACP'nin beyindeki ekspresyon dağılımı ortaya çıkarılmış, presinaptik alanda konumlandığı belirtilmiş ve sinükleinlerle olan dizi benzerliğine dikkat çekilmiştir (Iwai ve ark. 1995). NACP üzerine yapılan çalışmalarda bu proteinin doğal koşullarda katlanma yapmadığı da belirtilmiştir (Weinreb ve ark. 1996). Daha sonraki yıllarda yayınlanan çalışmalarda, Alzheimer Hastalığı patolojisi ile ilişkilendirilen NACP'nin torpido balığında keşfedilen aSyn ile aynı protein olduğu belirtilmektedir (Hsu ve ark. 2000; Iwai, 2000; Takeda ve ark. 1998). Daha sonraları Parkinson hastalarında yapılan incelemeler sonrası aSyn, Lewy

cisimlerinin baskın bileşeni olarak tanımlanmıştır (Spillantini ve ark. 1997). Ertesi yıl yapılan bir çalışmada ise aSyn'nin, Lewy cisimli demans hastalıkları ve Alzheimer hastalığında görülen LC'lerin de baskın bileşeni olduğu belirtilmiştir (Takeda ve ark. 1998). Ayrıca, aSyn üzerindeki A30P, E46T, G50Q, G51D, A53E ve A53T mutasyonlarının ailesel PH'na yol açtığı keşfedilmiştir (Appel-Cresswell ve ark. 2013; Krüger ve ark. 1998; Lesage ve ark. 2013; Polymeropoulos ve ark. 1997; Zarranz ve ark. 2004).

aSyn, pek çok hücresel işlevle ilişkilendirilmiştir. Çoğunlukla presinaptik alanda bulunduğundan proteinin bu bölgede işlevi olabileceği ilk kez literatüre sunulduğunda dile getirilmiş; aSyn'in sinaptik veziküllerle ilgili rolü olabileceği belirtilmiştir (Maroteaux ve ark. 1988). PH süresince en çok dejenere olan hücrelerin başında substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronlar gelir. Bu nedenle aSyn'in dopamin nörotransmiteriyle ilişkisi üzerine pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir.

Dopamin sinyalizasyonu, özetle dopamin sentezi, vezikül içine alımı, saklanması, salınması ve geri alınması süreçlerinde incelenebilir. Dopamin sentezi, tirozinin, tirozin hidroksilaz (TH) tarafından L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) çevrilme reaksiyonundan başlatılabilir. L-DOPA üretildikten sonra amino asit dekarboksilaz (AADC) tarafından dopamine dönüştürülür. Üretilen dopamin veziküler monoamin taşıyıcı 2 (VMAT2) tarafından veziküllere alınır. Dopamin vezikülleri presinaptik alanda depo edilir, bir kısım vezikül ise hücre uyarıldığında salınmak üzere hazır tutulur. Uyarı gelip nörotransmitter salındıktan sonra, salınan nörotransmitterlerin bir bölümü presinaptik veziküle bağlı dopamin taşıyıcılar tarafından vezikül içine geri alınır. Bu veziküllerdeki nörotransmitterler gerektiğinde tekrar kullanılır (Venda ve ark. 2010).

aSyn ve dopamin sinyalizasyonu üzerinde yapılan çalışmalar, proteinin işlevleri üzerine yapılan ilk çalışmalardandır. Bu çalışmalarda aSyn'nin, TH sentezi ve işlevini (Y. H. Li ve ark. 2011; Tang ve ark. 2008; Yu ve ark. 2005); AADC'nin ise işlevini etkileyerek dopamin sentezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Tehranian ve ark. 2006). Diğer yandan, dopamin nörotransmitterinin veziküle alınması, salınımı, vezüküllerin depolanma ve geri alınımı süreçleri de aSyn overekspresyonu, susturulması veya sessizleştirilmesi çalışmalarıyla incelenmiştir. Bu araştırmaların sonuçları, aSyn'in VMAT2 ekspresyonuna etki ederek hücrelerde sentezlenen dopaminin veziküllere alınmasında etkili olduğunu göstermektedir (Fountaine ve ark. 2008; Tang ve ark. 2008).

Diğer yandan başka çalışmalar ise aSyn'in dopamin taşıyıcıları üzerinde etki ederek dopaminin hücre içine geri alınmasındaki rolüne ek olarak, dopamin veziküllerinin depolanma ve geri çevrimlerinde de rolleri olduğu göstermiştir (Burré, 2015; Butler ve ark. 2015; Cabin ve ark. 2002; Larsen ve ark. 2006; Murphy ve ark. 2000; Swant ve ark. 2011).

Dopamin metabolizmasının yanı sıra, hücrelerin enerji metabolizmalarının bozulması ve hücre içi reaktif oksijen türevlerindeki artış da PH'da görülmektedir. PH ve mitokondriyal bozukluklar arasındaki ilişkiyi destekleyen ilk bulgulardan biri, etkisinin mitokondri üzerinde gösteren 1-metil-4-phenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) maruz kalan insanlarda ve diğer primatlarda bu hastalığın gelişmesidir (Langston ve ark. 1983). Bu nedenle araştırmalar mitokondri ve aSyn arasındaki bağlantıyı da aydınlatmaya yönelmiştir. Bu alandaki ilk çalışmalar aSyn'in Parkinson hastalarında mitokondri dış membran, membranlar arası alan ve iç membranda lokalize olduğunun göstermektedir (Cole ve ark. 2008; Devi ve ark. 2008; W. W. Li ve ark. 2007). Buna ek olarak, aSyn overekpresyonunun mitokondriyal elektron transport sistemi kompleks I aktivitesini inhibe ettiği ve reaktif oksijen türevlerini arttırdığı rapor edilmiştir (Devi ve ark. 2008; Hsu ve ark. 2000; Junn ve Mouradian, 2002).

Mitokondrideki ve presinaptik alandaki rolleri bir yana, aSyn'in önemli işlevlerinden bir kısmı, ilk yayınlandığı çalışmada (Maroteaux ve ark. 1988) dikkat çekildiği gibi nükleusta gerçekleşmektedir. aSyn, histon proteinlerine ve DNA'ya bağlanabilmektedir (Goers ve ark. 2003; Surguchev ve Surguchov, 2017). Bu bağlanma özelliği, aSyn'e gen anlatımını düzenleme potansiyeli kazandırmaktadır. Nitekim aSyn'nin VMAT2 ve TH ekspresyonunu etkileyebildiği gösterilmiştir (Y. H. Li ve ark. 2011; Tang ve ark. 2008; Yu ve ark. 2005). Öte yandan aSyn'nin DNA'ya bağlanma özelliğinin sadece transkripsiyonel düzenleme ile sınırlı olmadığı, aynı zamanda DNA tamirinde de rol oynayabileceği yakın zamanda gösterilmiştir (Schaser ve ark. 2019). Hücre nükleusundaki işlevlerine ek olarak, aSyn'in şaperon aktivitesine sahip olduğu (Burré ve ark. 2010) ve Golgi-endoplazmik retikulum arasındaki vezikül trafiğinde de etki gösterebildiği bildirilmiştir (Cooper ve ark. 2006; Thayanidhi ve ark. 2010). Günümüzde de pek çok çalışma, bu küçük proteinin fizyolojik koşullarda hücredeki işlevlerini ve etkilerini aydınlatmaya devam etmektedir. Öte yandan, özellikle patolojik koşullarda proteinin sahip olduğu farklı konformasyonların, nörodejeneratif

hastalıklardaki rolleri ve klinik tanı amacıyla kullanımına yönelik araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır.

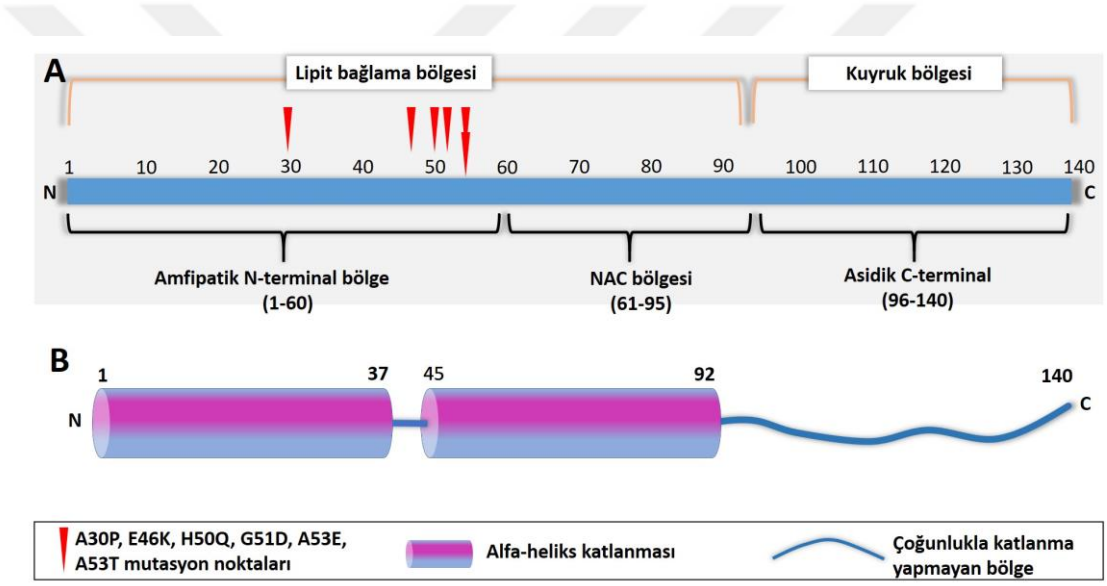
2.3.1. Alfa-Sinükleinin Yapısal Özellikleri

PH ve Lewy patolojisi üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, PH'nın zamanla kötüleşen klinik tablosu ile Lewy patolojisinin beyinde bölgeden bölgeye yayılması arasındaki bağlantıya işaret etmektedir (Borghammer ve Van Den Berge, 2019; H. Braak ve ark. 2003). Son yıllarda yapılan pek çok çalışma bu ilişkinin prion konsepti üzerinden açıklanabileceğini göstermektedir (Kim ve ark. 2019; Ulusoy ve ark. 2017; Volpicelli-Daley ve ark. 2011). Bu başlık altında aSyn'in yapısal özellikleri, fizyolojik koşullardaki ve patolojik durumlardaki konformasyonel düzenlemeleri açıklanacaktır. Bunlara ek olarak, Lewy patolojisinin beyinde bölge bölge yayılması ve PH'nın zamanla ilerlemesinde, proteinin patolojik konformasyonalarının rollerini gösteren kanıtlar sunulacaktır.

aSyn, Synuclein Alpha (SNCA) geni tarafından kodlanan 140 amino asitlik bir proteindir ve çoğunlukla yapısal olarak farklı özelliklere sahip 3 bölgeye ayrılarak incelenmektedir: 1-60 amino asitler arasındaki amfipatik N-terminal bölge, 61-95 amino asitler arasındaki NAC bölgesi ve 96-140 amino asitler arasındaki C-terminal bölgesi (Bendor ve ark. 2013; Burré ve ark. 2018) (Şekil 2-3A). Protein, 1-89. amino asitleri arasında 7 adet 11 amino asitlik tekrar dizilerine sahiptir. Bu tekrar dizileri 6 amino asitlik, omurgalı canlılarda oldukça korunmuş olan "KTKEGV" dizisi ve 5 amino asitlik çeşitlilik gösteren diziden oluşur (Bendor ve ark. 2013; Burré, 2015; Maroteaux ve ark. 1988). Bu tekrar dizileri aSyn'in lipitlerle etkileşiminde önemli bir rol oynamaktadır (Bendor ve ark. 2013; Meade ve ark. 2019; Zarbiv ve ark. 2014) Bu etkileşim, apolipoproteinlerin lipitlerle etkileşimine benzer (Clayton ve George, 1998; George ve ark. 1995). C-terminal bölgesi lipitlere bağlanmaz. Bu bölge, aSyn'in proteinlerle etkileşime girmesi (Burré ve ark. 2018; Jensen ve ark. 1999), agregasyonunun önlenmesi (Fernández ve ark. 2004; Hoyer ve ark. 2004; McLean ve ark. 2002; Meuvis ve ark. 2010) gibi fonksiyonlara sahip olmasının yanı sıra, Lewy patolojisi için belirteç olarak kullanılan serin 129 fosforilasyonu dahil pek çok modifikasyona uğramaktadır (Anderson ve ark. 2006; Fujiwara ve ark. 2002; Okochi ve ark. 2000; Zhang ve ark. 2019).

aSyn'in seçici olarak negatif yüklü hidrofilik uca sahip fosfolipitlerle etkileşime girdiği belirlenmiştir (R. Bussell, 2005; Davidson ve ark. 1998; Fortin ve ark. 2004).

Sahip olduğu KTKEGV dizisi bu özelliğin sağlanmasında oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Robert Bussell ve Eliezer, 2003; Davidson ve ark. 1998). Diğer yandan lipit raftlara bağlandığı da belirtilmiştir. Bu protein, lipitlerle etkileştiğinde her 11 amino asitlik tekrarlar içinde 3 kez tam dönüş yapar (R. Bussell, 2005). Bu durum 3/11 olarak da gösterilir. Bununla birlikte, C-terminal bölgesi katlanmaz (Burré ve ark. 2018; Wu ve ark. 2008). aSyn proteininin lipitlerle etkileşimi, yapay ve insan serebellum veya temporal korteksinden elde edilen beyin membranları üzerinden incelenmiştir. Buna göre 100 nm ve daha büyük çaplı veziküllerle etkileştiğinde aSyn, kıvrılma yapmaz ve düz şekilde lipit membranlara bağlanır (R. Bussell, 2005; Robert Bussell ve Eliezer, 2003; Jo ve ark. 2000; Trexler ve Rhoades, 2009).



Şekil 2-3: aSyn'nin primer ve sekonder katlanma yapmış formları.

A. Proteinin N-terminal ve C-terminaline göre bölgelerin konumları ve hangi amino asitleri kapsadığı (Burré, 2015). **B**. Proteinin lipitlerle etkileştiğinde sahip olduğu alfa heliks katlanma bölgeleri ve katlanma yapmayan bölgeler. Ulmer ve ark. (2005)'ten esinlenilerek hazırlanmıştır. Pembe bölgeler, lipitlere gömülen polar olmayan amino asitlerin denk düştüğü alanları; mavi bölgeler suda çözünen polar grupların olduğu alanları göstermektedir. Renklendirmeler Bendor ve ark. (2013)'ten uyarlanarak gerçekleştirildi.

Diğer yandan daha küçük çaplı membranlarla etkileşim durumunda ise katlanma yaptığı (Borbat ve ark. 2006; Trexler ve Rhoades, 2009; Ulmer ve ark. 2005) ve bu katlanmanın 3-37. ve 45-92. amino asitleri arasında gerçekleştiği gösterilmiştir (Ulmer

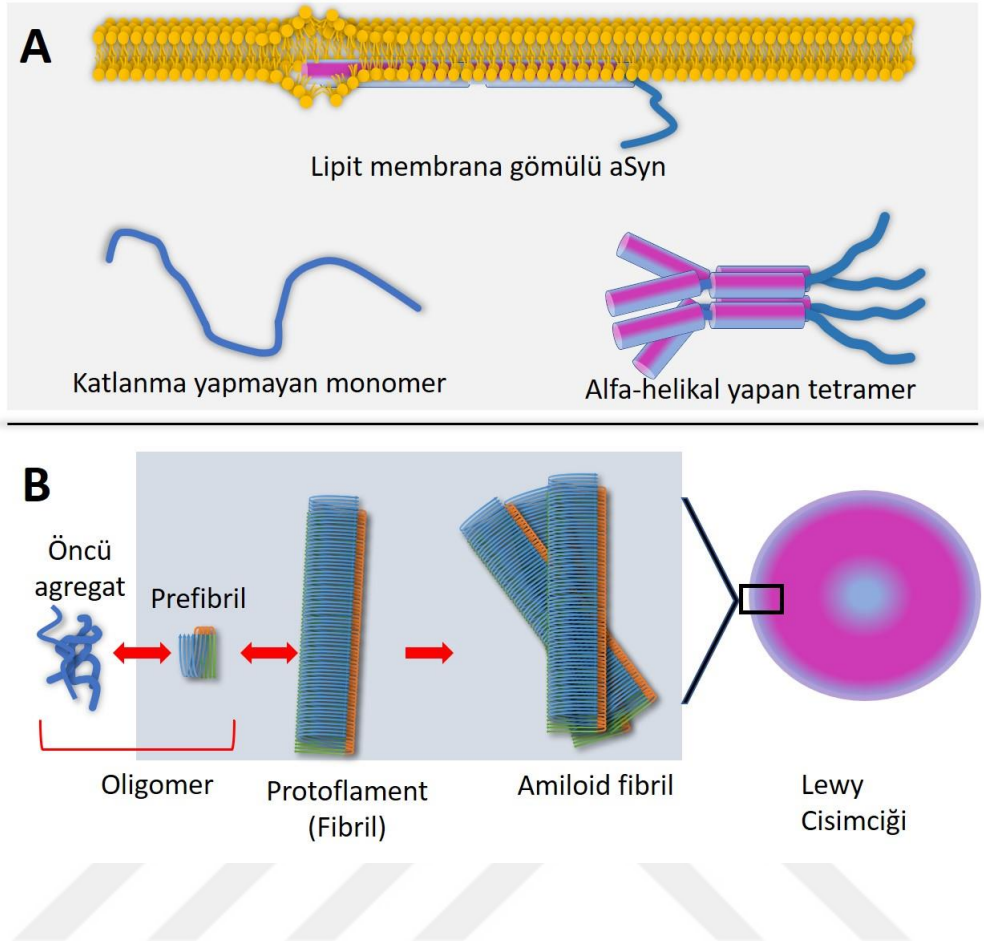
ve ark. 2005) (Şekil 2-3B). Lipitlerle etkileşimi aSyn'in işlevlerini yapabilmesini sağlarken, agregasyonunda da önemli yer tutmaktadır. Öyle ki, SNCA geninde PH ile ilişkilendirili olarak tanımlanmış 6 mutasyon (A30P, E46T, G50Q, G51D, A53E ve A53T), aSyn'nin lipitlerle etkileşen bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2-3A).

2.3.2. Alfa-Sinükleinin Fizyolojik ve Patolojik Konformasyonları

aSyn'nin hücre fizyolojik koşullardaki konformasyonu, farklı kaynaklardan elde edilen proteinlerle, lipitlerin varlığında ve yokluğunda incelenmiştir. Bu konu üzerine yapılan öncü çalışmalarda, bakterilerde üretilip izole edilmiş ve saflaştırılmış rekombinant aSyn proteini kullanılmıştır. Bu alandaki ilk çalışmaya göre protein, "katlanma yapmayan ve hidrofobik çekirdek bulundurmayan" olarak tanımlanmıştır (Weinreb ve ark. 1996). Sonraki yıllarda ise yapay lipit membranlar ve veziküller kullanılarak proteinin lipit varlığındaki ve yokluğundaki formu araştırılmış ve proteinin lipit yokluğunda katlanma yapmadığı detayı bildirilmiştir (Davidson ve ark. 1998). İleriki yıllarda yapılan bir başka çalışmada, önceki bulguları destekler şekilde aSyn'nin yine doğal formunda katlanma yapmadığının belirlendiği notu düşülmüştür (Wu ve ark. 2008) (Şekil 2-4A).

Daha ileriki yıllarda, hem rekombinant elde edilen aSyn ile yapılan hem de insan hücrelerinden saflaştırılan aSyn ile yapılan 2 farklı araştırmada, aSyn'nin lipit yokluğunda α-heliks katlanması yapan 4 monomerin bir araya geldiği tetramerler halinde bulunduğunu ileri sürmüştür (Bartels ve ark. 2011; Wang ve ark. 2011) (Şekil 2-4A). Ancak sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda tetramerik yapıyı doğrulayan sonuçlar elde edilememiştir (Binolfi ve ark. 2012; Burré ve ark. 2013; Theillet ve ark. 2016). Bu farklı sonuçlar nedeniyle, hücre içinde aSyn'nin lipitlere bağlı olmadığı durumlarda tetramerik ya da monomerik konformasyonlarda bulunduğu konusu tartışmalıdır.

aSyn'nin patolojik yapılar içinde çapraz beta katlanma yaptığı ve çok yüksek molekül ağırlığına sahip birimler oluşturacak şekilde fazla sayıda aSyn molekülünün bir araya geldiği patolojik formlar oluşturduğu bilinmektedir (Cremades ve Dobson, 2018; Dehay ve ark. 2015; Tycko, 2015). Bu patolojik formlar, en küçükleri oligomer olmak üzere, boyutu giderek artan şekilde protofibriller (protoflamentler), amiloid fibriler ve Lewy patolojisi olarak sınıflandırılabilir (Bengoa-Vergniory ve ark. 2017; Dehay ve ark. 2015) (Şekil 2-4B).



Şekil 2-4: Fizyolojik ve patolojik koşullarda aSyn'nin konformasyonları.

A. Fizyolojik koşullarda proteinin koformasyonları. **B.** Patolojik koşullarda aSyn'nin sahip olduğu konformasyonlar. Dehay ve ark. (2015)'ten uyarlanmıştır. Soldan sağa gittikçe konformasyonların büyüklüğü ve konformasyonları oluşturan birimlerin tamamen ayrılması için gereken güç artmaktadır. Mavi arka plan proteinaz K kesimine dirençli yapıları temsil etmektedir.

Oligomerler bazı kaynaklarda prefibriller olarak da isimlendirilir (Burré, 2015; Cremades ve Dobson, 2018; Pieri ve ark. 2016). Bu yapılar birkaç ya da onlar civarında aSyn monomerinin hatalı katlanma yaparak bir araya geldiği suda çözünür yapılar olarak tanımlanmaktadır (Hijaz ve Volpicelli-Daley, 2020). Oligomerler, fibriller ve monomerler arasında bir geçiş formu olarak da değerlendirilmektedir (Cremades ve Dobson, 2018; Froula ve ark. 2019; Hijaz ve Volpicelli-Daley, 2020). Çünkü yapı içerisindeki aSyn monomerlerinin yapıdan ayrılarak monomer forma geçebildiği bildirilmiştir (Froula ve ark. 2019; Tycko, 2015). Diğer yandan, bu yapının daha da büyüyerek bir üst patolojik konformasyon olan fibrillere de dönüşebildiği bildirilmiştir (Cremades ve ark. 2012). Bazı çalışmalar oligomerlerin, üst patolojik formlardan daha

toksik olduğunu göstermekteyken (Sharon ve ark. 2003; Winner ve ark. 2011); bazıları fibriler formların oligomerlerden daha toksik olduğunu belirtmektedir (Froula ve ark. 2019; Peelaerts ve ark. 2015; Pieri ve ark. 2012).

2.3.3. Fibrillerin Yapısı

Fibrillerin çoğalma ve yapısal özellikleri, Aβ1-42, aSyn, prion veya huntingtin fibrillerinde aynı prensibe sahiptir (Tycko, 2015). Fibriler aSyn (f-aSyn), beta katlanma yapan çok sayıda aSyn monomerinin birleştiği, proteinaz K kesimine dirençli yapılardır (Cremades ve ark. 2012; Froula ve ark. 2019; Luk ve ark. 2012; Volpicelli-Daley ve ark. 2011). Fibriler yapıların dallanma yapmadığı, iplik benzeri ve yeni monomerlerin katılmasına veya monomerlerin ayrılmasına imkan veren iki açık uca sahiptir (Sunde ve ark. 1997). Fibrilleri oluşturan aSyn monomerleri birbirleri arasında, oligomerleri oluşturanlardan çok daha güçlü beta katlanma yapmaktadır. Bu nedenle oligomerleri oluşturanların aksine, monomerler bu yapıdan daha zor ayrılmakta ya da ayrılamamaktadır.

2.3.4. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücreden Hücreye Yayılması

Her ne kadar henüz bir tedavisi olmasa da cerrahi girişimler veya ilaç uygulamaları ile PH'dan muzdarip bireylerin yaşam standartlarının iyileştirilmesi yönünde girişimler bulunmaktadır. Bu uygulamalara ek olarak, 90'lı yıllarda araştırmacılar kök hücre yaklaşımının PH'yı tedavi edip etmeyeceğini araştırmışlardır. Kök hücre uygulamasındaki prensip, transplante edilen kök hücrelerin, substantia nigra gibi hastalık süresince etkilenen bölgelerde olgun nöronlara farklılaşarak, bu bölgedeki hücre kaybının telafi edilmesine ve bölgenin işlevinin mümkün olduğunca yerine getirilmesine dayanmaktadır. Bu amaçla, 1990'lı yıllarda iki farklı araştırma grubu Parkinson hastalarına embriyonik mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapmıştır. Bu çalışmaların çıktıları 2008 yılında yayımlanmıştır (Kordower ve ark. 2008; J. Y. Li ve ark. 2008). Bu çalışmalarda, premortem incelemeler ve pozitron emisyon tomografis (PET) taramalarında, transplante edilen kök hücrelerin büyük oranda istenilen şekilde işlev gösterdiklerine yönelik kanıtlar elde edilmiştir (Freed ve ark. 2001; Mendez ve ark. 2005; Piccini ve ark. 1999). Dahası, bazı hastalarda oldukça ilerlemiş olan PH semptomlarında iyileşmeler tespit edildiği de rapor edilmiştir (Freed ve ark. 2001). Çalışmaların erken zamanlarında PH semptomları açısından bu gibi olumlu sonuçlar elde edilse de kök hücre uygulamasını takiben 10 seneyi aşan hastalarda, PH semptomlarının

yeniden ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Kordower ve ark. 2008; J. Y. Li ve ark. 2008). Bu çalışmalara katılan bazı hastalar transplantasyondan sonraki birkaç yıl içinde ölmüş; bazıları ise 10 yıldan uzun süre hayatta kalmıştır.

Bu bulgular, kök hücre yaklaşımında hedeflenen kriterlere ulaşılabileceğini göstermektedir. Örneğin, kök hücre uygulamasını takiben farklı zamanlarda ölen hastalarda yapılan postmortem analizlerde, transplante edilen kök hücrelerin, PH süresince en çok etkilenen bölgelerden biri olan substantia nigraya göç ettikleri, dopaminerjik nöron özelliği gösterecek şekilde farklılaştıkları, çevre hücrelerle bağlantılar oluşturdukları ve dopamin sentezi yaptıkları immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Ancak çalışmaların en öne çıkan sonucu, kök hücrelerin istenilen özelliklere sahip olmalarından daha çok, hiç beklenmedik şekilde, Lewy patolojilerine sahip olmaları olmuştur (Kordower ve ark. 2008; J. Y. Li ve ark. 2008). Bu çalışmalarda kullanılan kök hücrelerin donörleri insan embriyolarıdır ve donörler Parkinson hastası değillerdir. Transplantasyondan sonraki birkaç yılda ölen hastaların sahip oldukları kök hücrelerde Lewy patolojisi görülmezken (Kordower ve ark. 1997), transplantasyonun üzerinden 10 yılı aşkın süre geçtikten sonra ölen hastalarda Lewy patolojisi yapıları görülmüştür (Kordower ve ark. 2008; J. Y. Li ve ark. 2008). PH, ilerleyişi 10 yıllar alan bir süreçtir (Chu ve Kordower, 2007). Bu birbirinden bağımsız çalışma sonuçları, transplante edilen kök hücrelerin ancak Lewy patolojisi sahibi komşu hücrelerden bu patolojiyi alabilecekleri şeklinde yorumlanmıştır (Kordower ve ark. 2008; J. Y. Li ve ark. 2008; Olanow ve Brundin, 2013). LC'ler gibi son derece kompleks ve hücreler arasında taşınamayacak kadar büyük intraselüler yapıların hücreden hücreye geçiş yapması mümkün müdür?

Bu sorunun yanıtı, amiloid fibril yapıdaki aSyn'nin bir hücreden diğerine geçiş yaparak o hücrede Lewy patolojisi oluşumuna sebep olması olarak açıklanabilir. F-aSyn, primer nöron kültürüne uygulandığında hücre içi LC ile benzer özelliklere sahip inküzyon cisimleri oluşturduğu bildirilmiştir (Volpicelli-Daley ve ark. 2011). Çok daha güncel bir çalışmada f-aSyn fare vagal sinirlerine uygulandığında bu sıçanların PH semptomları oluşturduğu görülmüştür (Kim ve ark. 2019). Ayrıca viral vektörlerin kullanıldığı aSyn overekspresyon çalışmasında hücreler arası bağlantıları takip edecek şekilde hücrelerin Lewy patolojisi sergilediği görüşmüştür (Ulusoy ve ark. 2017). İnsan Lewy patolojisi örnekleri ve rekombinant proteinlerinden elde edilen fibriller farelere uygulandığında

yine Lewy patolojisinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Masuda-Suzukake ve ark. 2013). Bu gibi çalışmalar f-aSyn'in Lewy patolojisi oluşumunda etkili olabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Öte yandan, az miktarda uygulanan f-aSyn'nin nasıl -adeta- çoğalarak hücreler arasında yayılabildiği konusu, son 10 yılda araştırmalarda geniş yer bulmuştur. Bu soru, f-aSyn'in prionlar gibi davranması olarak açıklanmaktadır (Aulić ve ark. 2014; Masuda-Suzukake ve ark. 2013; Olanow ve Brundin, 2013).

2.3.5. Alfa-Sinüklein'nin Yayılması ve Prionoid Hipotezi

Son yıllarda sadece aSyn değil, nörodejeneratif hastalıkların patolojik bileşenleri olan amiloid yapılı Aβ1-42, TDP43 ve huntingtin proteinlerinin prion-benzeri özellikler gösterdiği görüşü ön plana çıkmaktadır (Hansen ve Li, 2012). Bu özellikler, nörodejeneratif hastalıkların gittikçe kötüleşen klinik tablolarının ve sinir sisteminde zamanla yayılan patoloik bulgularının açıklanmasında da kullanılmaktadır (Goedert, 2015; Kara ve ark. 2018). Literatürde Braak hipotezi ile de bir arada değerlendirilen ve "prionoid hipotezi" olarak da isimlendirilen bu prensip (Angot ve ark. 2010; Kara ve ark. 2018; Wells ve ark. 2019), aSyn üzerinden açıklanacaktır.

Prion hastalıkları, bozulmuş yapıya sahip olan prion proteinlerinin patojenik etki gösterdiği, henüz bir tedavisi olmayan ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır (Ironside ve ark. 2018). Bu hastalıklar, bireylerde ortaya çıkışlarına göre, diğer nörodejeneratif hastalıklarda görüldüğü gibi sporadik ve ailesel geçişli olabildiği gibi; bireyler ve hatta organizmalar arasında bir patojen ile "bulaşma" yoluyla geçiş göstermektedir (Ironside ve ark. 2018). Bu patojen, fibriler prion proteinidir (PrP^{SC}) (Prusiner, 1982). Bulunduğu ortamda PrPSC, fizyolojik koşullarda alfa heliks katlanması yapan hücresel prion proteinlerini (PrP^{C}) de amiloid yapıya katar. Bu şekilde gittikçe büyüyen ve çoğalan PrP^{SC}, daha fazla alana yayılır ve hücrelerin ölümüne neden olarak, beynin süngersi bir patolojik yapıya bürünmesine neden olur (Olanow ve Prusiner, 2009; Puoti ve ark. 2012).

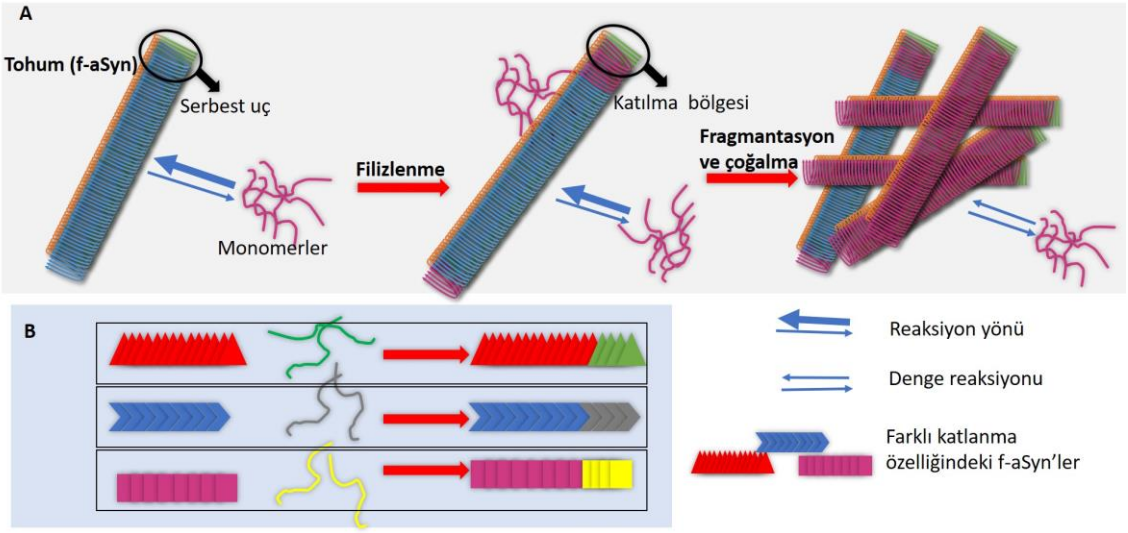
In vivo ve in vitro'da f-aSyn, tıpkı PrP^{SC}ler gibi davranarak, bulunduğu ortamdaki monomer aSyn'leri yapısına katarak büyümektedir (Aulić ve ark. 2014; Ihse ve ark. 2017; Kim ve ark. 2019; Masuda-Suzukake ve ark. 2013; Sanders ve ark. 2016). Örneğin, hücre kültüründe yapılan çalışmalara göre, f-aSyn hücre içine girebilmekte ve hücre içindeki endojen monomer aSyn'leri yapıya katabilmektedir (Aulić ve ark. 2014; Hansen ve Li, 2012). In vitroda, monomer aSyn bulunan çözeltiye f-aSyn uygulanırsa, gerekli koşullar altında ortamdaki monomerler büyük oranda f-aSyn yapısına katılır (Tycko, 2015). Bu

yapı büyümesi, amiloid yapılara bağlandığında florometrik ölçümle tespit edilebilen ışıma yapan thioflavin T (ThT) boyası ve elektron mikroskobu çalışmalarında gösterilebilmektedir (Brahic ve ark. 2016; Freundt ve ark. 2012; Ihse ve ark. 2017). Bu özellikler tıpkı PrPSC ve PrPC arasındaki ilişkiye benzemektedir (Aguzzi ve Rajendran, 2009). F-aSyn'in büyüme mekanizması, aynı zamanda onun patojenik özellik göstermesinin de temelini oluşturmaktadır. Ancak, bu aşamada üzerinde durulması gereken önemli bir nokta vardır: prion hastalıklarının görülme yollarından biri "bulaşmadır". Bugüne dek türler veya bireyler arasında PH bulaşmasına dair bir bulgu rapor edilmemiştir. Bu nedenle, prion özelliği gösteren ama prion olmayan bozulmuş yapıya sahip yayılabilen bu proteinler için "prionoid" tanımı kullanılmıştır (Aguzzi ve Rajendran, 2009).

F-aSyn'in prionoid hipotezinde tohum, filizlenme ve kalıp olarak 3 terim kullanılmaktadır (Angot ve Brundin, 2009; Sanders ve ark. 2016). Filizlenme özelliği, f-aSyn'lerin ortamda bulunan monomer aSyn'leri kendi yapısına katılarak büyümelerini tanımlar (Cohen ve ark. 2013; Jarrett ve Lansbury, 1992). Bu durumda f-aSyn tohum olarak tanımlanmaktadır (Hansen ve Li, 2012; Volpicelli-Daley ve ark. 2011). Yapılan çalışmalarda, uygun koşullar altında aSyn fibrilleri ve monomerleri arasında zamanla denge kurulduğu belirtilmektedir (Ihse ve ark. 2017; Sheftic ve ark. 2009). Bu nedenle serbest uç bulunduran f-aSyn, in vivo ve in vitro koşullarda monomerleri yapıya katmaktadır (Aulić ve ark. 2014; Cremades ve ark. 2012; Desplats ve ark. 2009; Volpicelli-Daley ve ark. 2011) (Şekil 2-5A). Fibrilleşme için ise her zaman ortamda fibril olması gerekmemekte, uygun inkübasyon koşulları altında monomerlerin in vitro fibrilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir.

Öte yandan kalıp özelliği, f-aSyn'lerin belirli bir konformasyona sahip olduğunu; yapıya katılan monomer aSyn'lerin de bu konformasyona uygun şekilde yapıya katıldığını; bu sayede yeni oluşan f-aSyn'lerde başlangıçtaki fibrillerin konformasyonlarının korunduğunu tanımlamaktadır (Angot ve Brundin, 2009; Sanders ve ark. 2016) (Şekil 2-5B). Kalıp özelliği, f-aSyn'nin patojenik özelliğinin kanıtlanması açısından önemlidir. Eğer f-aSyn bir hücreden diğerine yayılıyorsa, kalıp özelliği sayesinde, beynin Lewy patolojisi görülen farklı bölgelerinde benzer konformasyona sahip fibrillerin bulunması gerekmektedir (Sanders ve ark. 2016). Bu amaçla yapılan postmortem AH çalışmalarında, prionoid olarak değerlendirilen bir başka peptid Aβ1-42

fibrilleri, beynin farklı bölgelerinden elde edilen doku örneklerinin elde edilmesiyle incelenmiş; birbirinden çok farklı noktalarda olan bölgelerde benzer konformasyona sahip fibriller rapor edilmiştir (Lu ve ark. 2013). Diğer yandan aSyn için yapılan çalışmalarda PH ve MSA hastalarından elde edilen beyin-omurilik sıvısı (BOS) örnekleri, laboratuvar koşullarında çoğaltıldığında, oluşan ürünlerin konformasyonlarının hastalıklara göre farklılık gösterdiği görülmüştür (Shahnawaz ve ark. 2020). Buna ek olarak, hücre kültürü çalışmalarında f-aSyn'in tohum ve filizlenme özelliği göstermenin yanı sıra (Aulić ve ark. 2014; Hansen ve ark. 2011; Tsujimura ve ark. 2015) kalıp özelliğine sahip olduğu da belirlenmiştir (Sacino ve ark. 2013).



Şekil 2-5: F-aSyn'nin tohum, filizlenme ve kalıp özelliği.

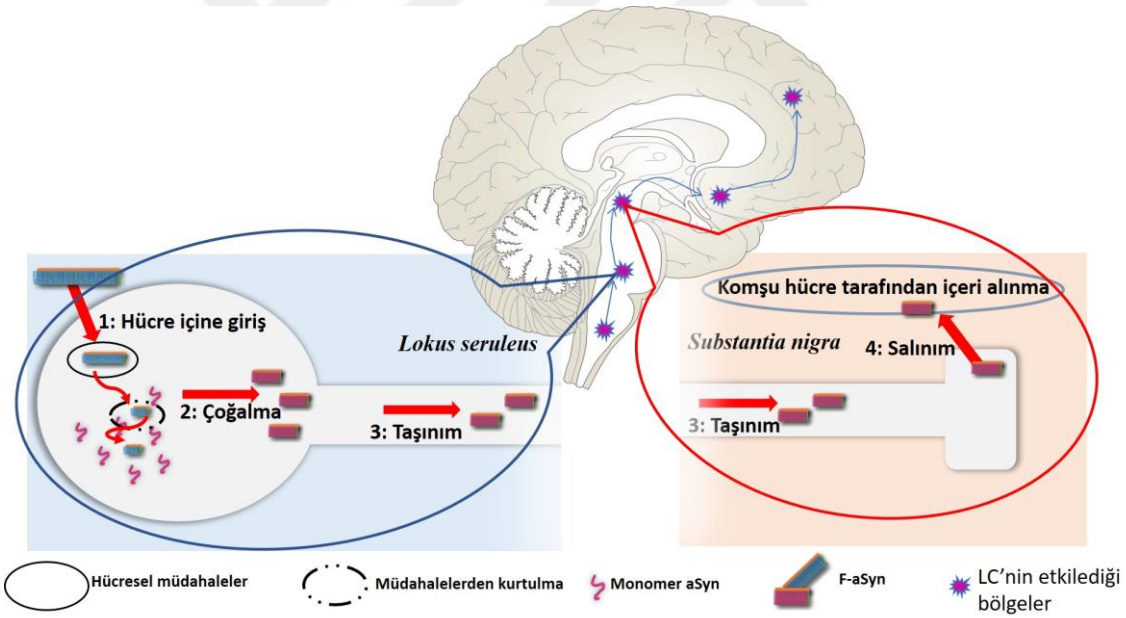
A. F-aSyn'in çoğalma basamakları. Bieri ve ark. (2018)'den uyarlanmıştır. **B**. F-aSyn'nin kalıp özelliğinin şeması Sanders ve ark. (2016)'dan uyarlanmıştır.

2.3.6. Fibriler Alfa-Sinükleinin Yayılma Basamakları

Braak ve arkadaşları (2003), hücreler arasında geçiş yapamayacak büyüklükteki LC'lerin, bir sonraki hücredeki varlığını, büyük ihtimalle bir virüs olabilecek bilinmeyen bir patojene bağlamıştır (H. Braak ve ark. 2003). Öte yandan prionoid hipotezi in vitro ve in vivo sistemlerde elde edilen bulgularla desteklenirken, Braak hipotezi ile de uyumludur. Bu hipoteze göre tohum, filizlenme ve kalıp özelliği gösteren f-aSyn'in, bir hücreden diğerine geçişi ve beyinde bölgeden bölgeye yayılmasının arkasındaki süreç, bir hücrede tamamlanınca bir sonrakinde tekrar edebilen 4 basamakta ele alınmıştır (Bieri

ve ark. 2018; Brettschneider ve ark. 2015; Kara ve ark. 2018; Rodriguez ve ark. 2018) (Şekil 2-6).

1- Fibriler alfa-Sinükleinin hücre içine girmesi: Bu aşamada, hücreler arası boşluktan endositoz ile veya nanotüpler aracılığıyla f-aSyn'lerin bir nöron tarafından hücre içine alınabileceği belirtilmiştir (Abounit ve ark. 2016; Bieri ve ark. 2018; Holmes ve ark. 2013). Bu şekilde 4 aşamanın ilk safhası bu hücre için başlamış olur. F-aSyn'lerin hücreler arası boşluktan alınmasında, virüslerinkine benzer bir sürecin işleyebileceği ifade edilmiştir (Bieri ve ark. 2018). Bu süreçte rol alan aktörlerden birinin, hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanlar olduğu belirlenmiştir (Holmes ve ark. 2013; Ihse ve ark. 2017). Heparan sülfatların aynı zamanda fibriler formdaki tau ve prion proteinlerinin hücre içine alınmasında da rol aldığı rapor edilmiştir (Holmes ve ark. 2013; Horonchik ve ark. 2005). Dolayısıyla, virüsler, prionlar ve prionoidler benzer yollarla hücre içine alınabilmektedirler.



Şekil 2-6: Tek bir hücre içerisinde f-aSyn'nin yayılma basamakları.

Bieri ve ark. (2018)'den uyarlanmıştır. Hücrenin arka planını oluşturan mavi ve turuncu arka plan renkleri sırasıyla beynin lokus seruleus ve substantia nigra bölgelerini temsil etmektedir. Bu iki bölge arasındaki yayılma Heiko Braak ve ark. (2003) esas alınarak gösterilmiştir. Patolojinin bölgeler arası yayılımında f-aSyn'nin taşınımı vurgulanmıştır.

Heparan sülfatlara ek olarak lenfosit aktivasyon gen 3'ün (LAG3) de aynı zamanda hücre yüzeyinden f-aSyn'lerin hücre içine alımını sağladığı ve bir hücreden diğerine geçişe aracılık ettiği; antikorlar kullanılarak LAG3 bloke edilen veya LAG3 susturulan hücrelerde, hücreden hücreye f-aSyn geçişinin engellendiği gösterilmiştir (Mao ve ark. 2016). Bu ikisine ek olarak, hücre yüzeyinde bulunan ve mutasyonları bir çeşit PH ile ilişkili bulunan (De Carvalho Aguiar ve ark. 2004) Na+/K+ ATPaz'ın α3 alt ünitesinin de özellikle f-aSyn'in hücre içine alımında etkili olduğu gösterilmiştir (Shrivastava ve ark. 2015).

Hücre içine alınan f-aSyn'lerin lipit veziküllerin içinde olduğu ve bu veziküllerin de endozomal ve lizozomal belirteçlere sahip olduğu belirtilmektedir (Abounit ve ark. 2016; Konno ve ark. 2012). F-aSyn'lerin hücre içinde çoğalmak için lipit veziküllerden kurtulması ve hücre içindeki aSyn'lerle etkileşime girmesi gerekmektedir (Aulić ve ark. 2014; Bieri ve ark. 2018; Hansen ve ark. 2011).

2- Hücre içindeki fibriler alfa-Sinükleinin endojen monomerleri yapıya katarak büyümesi: Bu aşama, f-aSyn'lerin tohum, kalıp ve filizlenme özelliklerini gösterebildiği aşamadır. Bunlara ek olarak inklüzyon cisimlerinin oluşumunun da bu aşama içinde gerçekleşmesi olası gözükmektedir (Desplats ve ark. 2009; Volpicelli-Daley ve ark. 2011). Hücre içine alınan f-aSyn'lerin, ilk aşamalarda lizozomlar tarafından yıkıma uğratıldıkları, ancak bazılarının henüz tam olarak bilinmeyen bir yolla içinde bulundukları vezüküllerden kurtulduğu ileri sürülmektedir (Rodriguez ve ark. 2018). Hücre içindeki lipit membran yapılı kafeslerinden kurtulan f-aSyn, hücre içinde bulunan monomer aSyn'leri yapısına katarak büyür (Angot ve ark. 2010; Aulić ve ark. 2014; Bieri ve ark. 2018; Guo ve Lee, 2014; Hansen ve ark. 2011; Luk ve ark. 2012; Masuda-Suzukake ve ark. 2013; Volpicelli-Daley ve ark. 2011).

Güçlü beta tabaka katlanma yapan ve ortamda yeterince monomer aSyn var olduğu sürece uçlardan büyümeye devam eden f-aSyn'nin çoğalması için daha fazla f-aSyn bulunması ve bir şekilde kendilerinden daha fazla f-aSyn yapmaları gerekmektedir. Hücre içinde giderek büyüyen fibriller kırılma veya parçalara ayrılma yoluyla çoğalabilir (Angot ve ark. 2010; Brettschneider ve ark. 2015). Yeterince büyümüş olan fibriller kırıldığında monomer aSyn'lerin katılabileceği küçük fibriller, dolayısıyla tohumlar oluşturur. Ardından bu kırılma ürünleri, tohumlar, kendilerine ortamdaki monomerleri katarak büyürler ve bu süreç mümkün olduğunca sürdürülür (Volpicelli-Daley ve ark.

2011). Bu çoğalma ve büyüme mekanizmaları, prion ve prionoidlerin, nükleik asitlerden bağımsız olarak kendilerini nasıl çoğaltabildiklerini açıklayabilmektedir. Tek bir f-aSyn'in nasıl çoğalabileceği 1 ve 2. basamaklarla açıklanabilmektedir. Buna rağmen, PH patogenezinin başladığı bölgeden, zamanla beynin çok uzak bölgelerine nasıl yayılabildiği 3. basamakta açıklanmıştır.

3- Fibriler alfa-Sinükleinin hücresel uzantıları takip edecek şekilde taşınması: Braak ve arkadaşları, PH patogenezinin DMX bölgesinden başladığını ve hücresel uzantıları takip edecek şekilde yayıldığı görüşünü ortaya atmıştır (H. Braak ve ark. 2003; Heiko Braak ve ark. 2003). Nitekim ardıl araştırmalar, tüm hastalarda olmasa da büyük oranda, hastalığın ilk evrelerinde patolojinin bu bölgede başladığı ve zamanla yayıldığı bulgularını desteklemiştir (Borghammer ve Van Den Berge, 2019; Kalaitzakis ve ark. 2008). Braak hipotezi ile uyumluluk gösteren prionoid hipotezinde, patolojinin uzak bölgelerine taşınan bileşenin f-aSyn olma olasılığı yüksektir. Aslında, prionoid hipotezine kanıt olarak sunulan çalışmaların her biri, f-aSyn'nin hücreler arasında taşınmasına destekleyici niteliktedir. Ancak, f-aSyn'nin nöron uzantıları boyunca hareket edebildiği ve bölgeler arasındaki hareketinin ispatlanması için kesin kanıtlar gerekmektedir.

Gerçekten de yapılan çalışmalar, f-aSyn'nin hücreler arası uzantıları takip edecek şekilde hücre içinde aktif bir şekilde taşındığını göstermiştir (Brahic ve ark. 2016; Danzer ve ark. 2011; Freundt ve ark. 2012). Bu çalışmalara göre f-aSyn, nöronlarda, retrograde daha fazla olmak üzere, anterograde ve retrograde olarak taşınabilmekte (Brahic ve ark. 2016); tipik bir sitoplazmik protein taşınım özelliği göstermektedir (Freundt ve ark. 2012). Bu taşıma aynı zamanda Braak hipotezinde en çok üzerinde durulan bulgu olan "hücresel uzantıları takip edecek şekilde patolojinin yayılması" durumuna da açıklık getirebilmektedir. Bu şekilde taşınma sırasında, f-aSyn'nin bir vezikül içinde veya vezikül olmadan motor proteinlere bağlanarak taşınabileceği senaryoları üzerinde durulmuştur (Bieri ve ark. 2018).

4- Fibriler alfa-Sinükleinin hücre dışına salınması ve bir sonraki hücreye alınması: Hücre içine alınan, hücre içinde çoğalan ve hücreler arası uzantıları takip ederek bulunduğu bölgeden çok uzak bölgelere taşınan f-aSyn'nin, bir sonraki hücreye geçebilmesi gerekmektedir. Bu geçiş için önerilen ve f-aSyn için olmasa da aSyn overekspresyonu yapılan veya fizyolojik koşulları inceleyen çalışmalarda, aSyn'in

salınmasında etkili olabileceği tespit edilmiş mekanizmalar; ekzozomal yol ile lipit veziküller içinde hücre dışına salınma (Alvarez-Erviti ve ark. 2011; Emmanouilidou ve ark. 2010), doğrudan hücre membranından geçme ve hücre lizisi, ekzositoz ile salınma (Fontaine ve ark. 2016) ve nanotüpler ile taşınma şeklindedir (Abounit ve ark. 2016). Bunlardan farklı olarak, stres altındaki hücrelerin ölümü sonrası da f-aSyn'nin hücre dışına salınması mümkündür. Oysaki hücrelerin aktif olarak, hücre lizisinden bağımsız bir şekilde f-aSyn'leri dışarıya saldıkları gösterilmiştir (Brahic ve ark. 2016). Bunun yanı sıra dışarıya salınan f-aSyn'nin bir sonraki ikinci ve hatta üçüncü hücreler tarafından hücre içine alınabildiği (Brahic ve ark. 2016; Danzer ve ark. 2011; Freundt ve ark. 2012; Hansen ve ark. 2011) ve bu hücreler arasında temasa gerek olmadığı belirlenmiştir (Danzer ve ark. 2011; Freundt ve ark. 2012). Bu aşama, f-aSyn'in yayılmasındaki bir hücre için son aşamadır. Ancak süreç bir sonraki hücre için 1. aşamadan tekrar başlamaktadır.

2.4. Mikrotübül-Bağımlı Hücre İçi Taşıma Sistemleri ve Şaperonların Fibriler Alfa-Sinükleinin Taşınmasıyla Ilişkileri

Hatalı katlanmış protein birikimleri olan f-aSyn'lerin sinir sisteminde uzak bölgelere hareket edebilmesinin, hücre içinde mikrotübül-bağımlı taşıma sistemleriyle gerçekleştirilebildiğine yönelik kanıtlar bulunmaktadır (Freundt ve ark. 2012). Nöronlar oldukça farklılaşmış postmitotik hücrelerdir ve düzgün işlev gösterebilmeleri için gövde ve en uzak noktaları arasında, organel, RNA, veziküller ve protein gibi gerekli bileşenlerin taşınması gerekmektedir (Maday ve ark. 2014). Mikrotübül-bağımlı taşıma işlemlerinde mikrotübüllerin yönelimine göre işlev gösteren kinezin ve dinein motor proteinleri görev almaktadır (Maday ve ark. 2014). Kinezin ve dineinler, organel, protein veya RNA'lar da dahil olmak üzere kargolarını mikrotübüllerin uçlarının yönelimlerine göre taşımaktadır (Alberts ve ark. 2015).

2.4.1. Mikrotübül Bağlı Taşınma ve Kinezinler

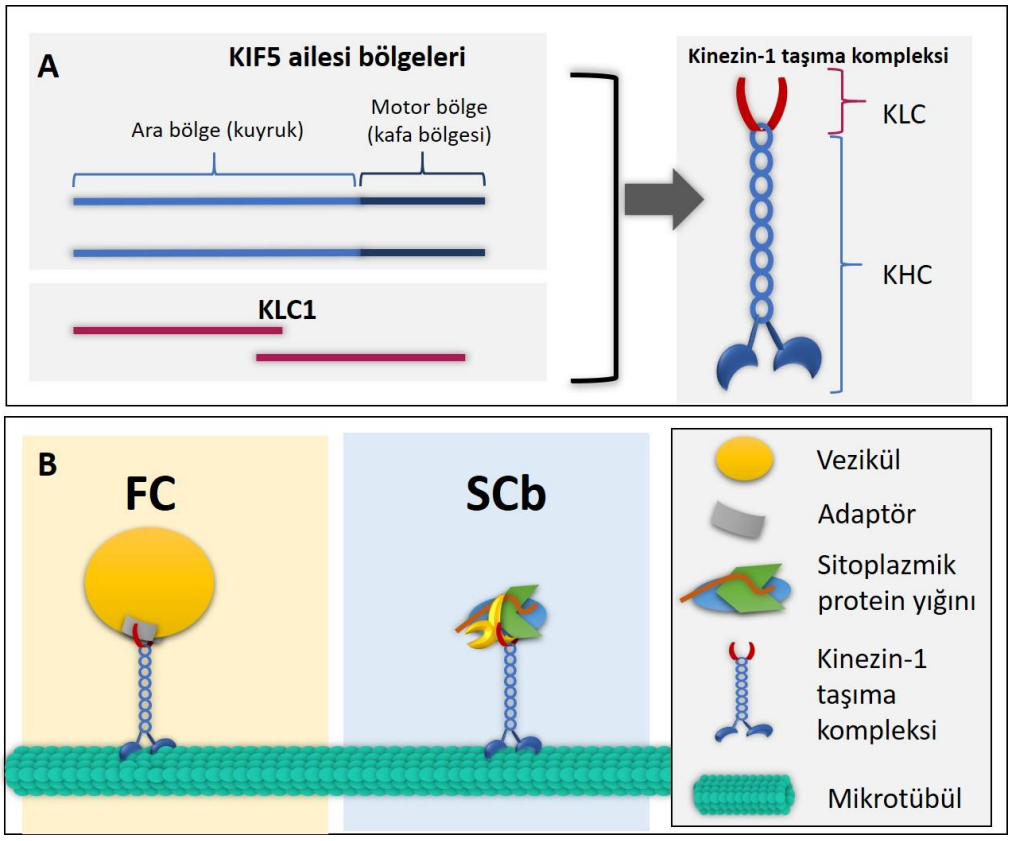
Mikrotübüllerde, dinamik olarak tübülin proteinlerinin polimer yapısına daha hızlı katıldığı, yani hızlı büyüyen uç kısma (+) kutup denirken; zayıf katılma gösterdiği ya da hiç katılma göstermediği yavaş büyüyen uç kısma (-) kutup denilmektedir (Alberts ve ark. 2015). Hücre gövdesi ve dendritlerde, mikrotübüllerin (+) ve (-) kutupları heterojen yönelimlidir. Dendritik uçtan gövdeye hem (+) hem de (-) mikrotubul kutupları bakar. Gövde ve dendritlerin aksine, aksonlarda mikrotübüller tek yönelimlidir: (-) kutup

hücre gövdesine doğru bakarken, (+) kutup akson bölgelerine doğru bakmaktadır (Alberts ve ark. 2015). Aksonal taşımada görev alan kinezin ve dinein motor proteinlerinin hareketleri, çoğunlukla mikrotübüllerin (+) ve (-) kutuplarına göredir (Alberts ve ark. 2015). Buna göre dineinler (-) kutba doğru yani hücre gövdesine yönelmiş şekilde hareket ederken, kinezinler çoğunlukla (+) kutba doğru, yani gövdeden uzaklaşan şekilde hareket etmektedir (Alberts ve ark. 2015). Aksonlarda mikrotübüller tek yönelimli olduğundan hücre gövdesine doğru olan taşıma hareketine retrograde, hücre gövdesinden akson uçlarına olan harekete anterograde denilmektedir.

Kinezinlerin insan genomunda 45 üyeden oluşan "kinezin süper ailesi (KIF'lar)" genlerinden kodlanır (Miki ve ark. 2001). (-) kutba doğru hareket eden ve mikrotübül destabilizasyonunda görev alanlar dışında, kinezinler, genel olarak mikrotübüllerde (+) kutba doğru hareket ederek kargolarını taşır (Alberts ve ark. 2015; Hirokawa ve ark. 2010). Kinezin ailesi içinde en karakteristik olanlar kinezin-1 proteinleridir. Bunlar, kinezinlere atfedilen "mikrotübüllerin (+) kutbu doğrultusunda kargo taşıma" özellikleri ile en çok ilişkilendirilmiş olan üyelerdir ve bu sebeple "konvansiyonel kinezinler" olarak tanımlanmıştırlar (Kanai ve ark. 2004; Lawrence ve ark. 2004). Kinezin-1'ler, beyinde de ekspresyonu yapılan 3 üyeden oluşmaktadır ve bu üyeler insan genomunda KIF-5A, KIF-5B ve KIF-5C genleri tarafından kodlanır (Kanai ve ark. 2004). Önceki çalışmalarda f-aSyn'nin kinezin-1 üyeleri tarafından taşınabildiğine yönelik kanıtlar elde edilmiştir (Bieri ve ark. 2018; Freundt ve ark. 2012).

Yapısal olarak kinezin-1'ler 4 proteinden oluşur. Bunlar, KIF5 aile üyelerinin homodimer veya heterodimerlerinin oluşturduğu 2 tane "kinezin ağır bileşen (kinesin heavy compenent, KHC)" ve 2 tane "kinezin hafif bileşen (kinesin light compenent, KLC)"dir (Brady, 1985; Hirokawa ve ark. 1989; Vale ve ark. 1985) (Şekil 2-7A). Ağır birimlerin her biri, mikrotübüllerle etkileşime giren ve ATPaz aktivitesi ile ilerleme sağlayan 1 adet "motor" veya "baş bölgesi" ile, diğer ağır zincirdekiyle sarmal yaparak iki ağır birimin birbirine bağlanmasını da sağlayan "kuyruk kısmından" oluşmaktadır (Alberts ve ark. 2015; Hirokawa ve ark. 2010; Maday ve ark. 2014) (Şekil 2-7A). Kinezin-1'lerde motor bölge, proteinlerin amino-terminal kısımda konumlanmışken, kuyruk kısmı proteinlerin orta kısım ve karboksi-terminal kısımlarını kapsamaktadır (Alberts ve ark. 2015; Miki ve ark. 2001). Bir araya gelen 2 ağır birimin kuyruk kısmına 2 adet KLC'nin bağlanmasıyla "kinezin-1 kompleksi" oluşur (Hirokawa ve ark. 1989,

2010). KLC'ler, taşınacak kargoya bağlı olarak taşımada kullanılırlar ve ağır birimler ile kargolar arasında adaptör görevi görmektedirler (Hirokawa ve ark. 2010). Diğer yandan KLC'lerin her zaman kinezin-1 yapısına katılmadığına yönelik kanıtlar da vardır (Sun ve ark. 2011). Bunlar dışında dimer oluşturmayan tek ağır zincirin kullanıldığı aksonal taşımada görev alanlara ek olarak, az sayıda da olsa motor bölgeleri proteinlerin orta kısmında veya karboksi-terminal kısmında bulunan kinezinler de bulunmaktadır (Aizawa ve ark. 1992; Lawrence ve ark. 2004; Miki ve ark. 2001).



Şekil 2-7: Kinezin-1 taşıma kompleksi ve mikrotübüllerde kargo taşıma.

A. Tek bir kinezin-1 taşıma kompleksini oluşturan proteinler (solda). Sağda, Kinezin-1 taşıma kompleksinin KHC ve KLC birimlerinin yerleşimi. **B**. FC ve SCb tipi taşımalarda kinezin-1 taşıma kompleksinin mikrotübül ve kargoları arasındaki yerleşim şekli. Hirokawa ve ark. (2010)'dan esinlenilerek hazırlanmıştır.

2.4.2. Aksonal Taşıma Tipleri ve Fibriler Alfa-Sinükleinin taşınımı

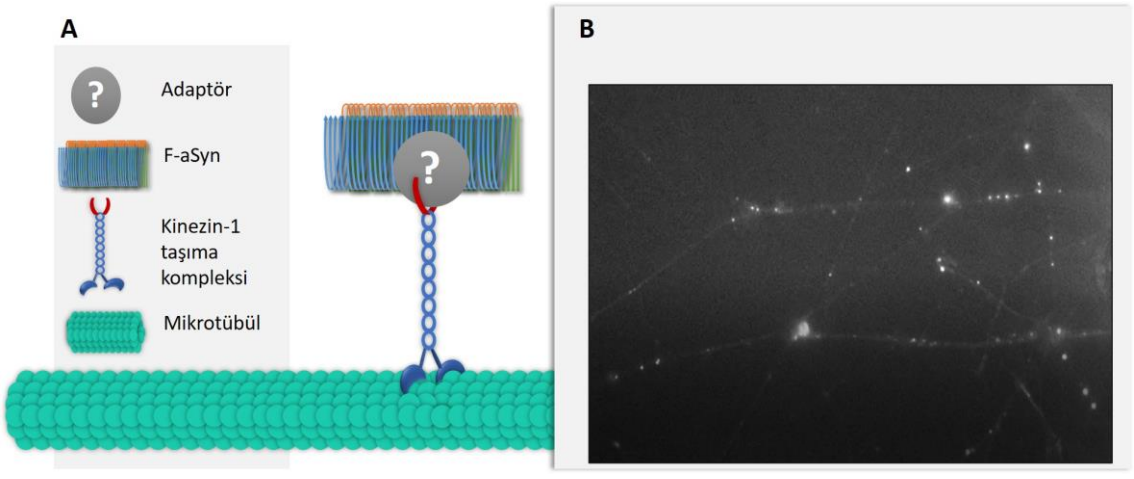
Uzun uzantıları ve özellikle aksonları sayesinde nöronlar, proteinlerin hücre içinde taşınmasıyla ilgili çalışmaların model sistemleri olarak kullanılmıştır. Söz konusu

çalışmalarda proteinlerin aksonlar boyunca nasıl taşındıkları araştırılmıştır. Buna göre proteinlerin taşınmasında 2 temel taşıma tipi ileri sürülmüştür: Birinci taşıma tipinde kargoların taşınması görece diğer tiplerden daha hızlıdır ve temel olarak veziküller, organeller ve membrana bağlı proteinleri taşınır (Roy2014; Maday ve ark. 2014). Bu taşıma tipinde, kargoların ortalama 50-400 mm/gün hızla taşındığı belirtilmiştir (Black ve Lasek, 1979; Brady ve Lasek, 1982; Maday ve ark. 2014; Roy, 2014). Görece diğer taşıma tiplerinden daha hızlı olduğundan "hızlı aksonal taşınım" olarak isimlendirilmiştir ve literatürde kısaltma olarak "FC tipi" (İngilizce fast compenent'ten gelir) olarak gösterilir (Black ve Lasek, 1979; Brady ve Lasek, 1982; Roy, 2014). Anterograde FC tipi taşımada kinezin-1'lere ek olarak kinezin-2 ve kinezin-3'ler de görev almaktadır (Black ve Lasek, 1979; Maday ve ark. 2014). Bununla birlikte proteinlerin taşınmasında kinezin-1'ler ön plana çıkmaktadır (Kamal ve ark. 2000; Maday ve ark. 2014) (Şekil 2-7B).

İkinci taşıma tipinde sitozolik çözünür proteinler ve hücre iskelet proteinleri taşınır (Kandel ve ark. 2013). FC tipi taşımaya nazaran kargolar bu taşıma tipinde daha yavaş taşındığı için "yavaş aksonal taşıma" olarak isimlendirilir ve literatürde kullanılan kısaltma ile "SC tipi" (İngilizce slow compenent'ten gelir) olarak gösterilir. Kargolarda taşınan proteinlerin tipine göre SC tipi taşıma iki alt kategoride sınıflandırılmıştır: Bunlar, aktin haricinde tübülin ve ara filamentler başta olamak üzere hücre iskelet elemanlarının taşındığı "SCa tipi taşıma" ve sitoplazmik çözünür proteinlerin (şaperonlar, enzimler ve alfa-sinüklein gibi) taşındığı "SCb tipi taşıma" şeklindedir (Hirokawa ve ark. 1989; Maday ve ark. 2014; Roy, 2014). SCa tipi taşımada kargolar ortalama 0,2-1 mm/gün hızla taşınırken; SCb tipi taşımada kargolar 1-10 mm/gün hızla taşınır (Brady ve Lasek, 1982; Roy, 2014).Hücre içi taşıma tipleri, farklı hızlara ek olarak farklı taşıma karakterleriyle de birbirlerinden ayrılabilmektedir. Yapılan çalışmalara göre FC tipi taşımada kargolar, büyük oranda sabit bir ilerleme tipine sahiptir (Roy, 2014). Bunun aksine SCa tipi taşımada ise kargolar hedeflerine yavaş varmanın yanı sıra "dur-kalk" şeklinde taşınır (Roy, 2014). Yani SCa tipi taşımada kargolar durmadan hedeflerine ilerlememektedir. Öte yandan canlı hücre görüntüleme sistemlerinde yapılan çalışmalara göre, SCb tipi taşımada kargoların SCa'da olduğu gibi dur-kalk mekanizmasıyla taşındığı görülmüştür. Ayrıca, bu taşıma tipinde kargoların %10-15 oranında FC tipi taşımayla taşındığı gösterilmiştir (Scott ve ark. 2011). Dolayısıyla SCb tipi taşıma, FC ve SCa tipi taşımalardan bazı özellikleri almış bir hareket karakterine sahiptir.

Canlı hücre görüntüleme sistemleri sayesinde floresan işaretli proteinlerin hareket profili çıkarılabilmektedir. Bu sistemlerde, hedef proteine floresan proteinlerin etiketlendiği vektörlerle kültürdeki hücreler transfekte edilir. Gen ekspresyonunu takiben floresan ışın altında hedef proteine bağlı floresan protein ışıma yapar. Bu sırada mikroskoba bağlı bir kamera ile belirli aralıklarla görüntü alınır. Bu sayede hedef proteinin hücre içindeki hareketi takip edilebilmektedir.

Aynı sistemlerde, önce floresan boyalarla boyanan ve daha sonra hücre kültürüne verilen f-aSyn'in de hücre içinde taşınması sırasında hareket profili çıkarılabilmiştir (Freundt ve ark. 2012) (Şekil 2-8B). Bu çalışmanın sonucuna göre, f-aSyn primer nöron kültür hücrelerinde "dur-kalk" şeklinde ilerlemekte ve fibrillerin yaklaşık %15'i FC tipi taşıma özelliği sergilemektedir. Dolayısıyla araştırmacılar, f-aSyn'nin hücre içine alındıktan bir süre sonra SCb tipi taşıma ile hücre uzantıları boyunca taşındığını ve hücrelerden dışarı atıldığını ifade etmiştir (Bieri ve ark. 2018; Freundt ve ark. 2012). Aynı araştırma grubu, f-aSyn'in sadece taşındığını belirlemekle kalmamış, aynı zamanda bir hücrenin içeri aldığı fibrilleri ikinci bir hücreye aktardığını; dahası, fibrilleri alan ikinci hücrenin üçüncü bir hücreye fibrilleri aktarabildiğini de göstermiştir (Freundt ve ark. 2012). Bu bulgulara göre f-aSyn hücreler arasında çok etkin bir şekilde aktarılabilmektedir.



Şekil 2-8: F-aSyn'in hücre içi taşınımı.

A. F-aSyn'nin hücre içi taşınımında SCb bileşenleri ve f-aSyn'nin olası konumu. **B.** Primer nöron kültüründe floresan boyalı f-aSyn (Freundt ve ark. 2012). Fibriller beyaz parlak noktalar şeklinde görülmektedir.

Bu aktarım sürecinde SCb motorlarının görev aldığı, mikrotübül bağlı taşımanın olduğu bilinse de, taşıma bileşenleri tümüyle aydınlatılamamıştır. Örneğin, f-aSyn ve kinezin-1 arasındaki bağlantıyı sağlayan adaptör protein bilinmemektedir (Şekil 2-8A). Bu adaptör protein sadece fibrillerin taşınmasında etkili olmakla kalmayıp, aynı zamanda LP'lerin de beyinde uzak bölgelerde görülmesinde etkili olabilmektedir. Dolayısıyla PH'nın yıllar süren ilerleme sürecinde etkin rol alan önemli aktörlerinden biridir.

2.4.3. Şaperon Ailelerinin Genel Özellikleri ve Fibriler Alfa-Sinükleinin Taşınımıyla İlişkileri

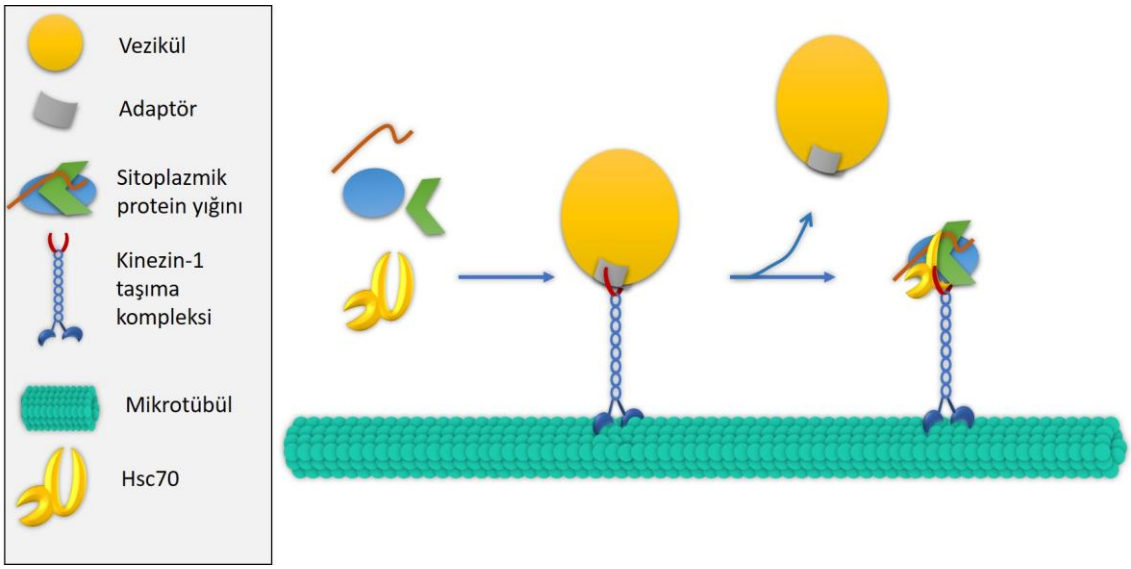
Fizyolojik koşullarda proteinlerin katlanmaları, ömürleri ve fonksiyonları protein kalite kontrol sistemi tarafından sıkı şekilde denetlenir. Bu denetim süreci, proteinlerin doğru yer ve zamanda doğru şekilde işlev göstermelerini sağlamaktadır. Son derece farklılaşmış post mitotik hücreler olan nöronların, yüksek enerji gerektiren işlevlerini uzun yıllar boyunca yerine getirebilmeleri için protein kalite kontrolünün düzgün çalışması elzemdir. Hücresel protein kalite kontrol sisteminde, ubikitin proteazom sistemi, lizozomlar ve moleküler şaperonlar yer almaktadır (Saibil, 2013).

Moleküler şaperonlar olarak ısı şoku proteinleri, hücre içinde proteinlerin düzgün katlandığından emin olurken, hatalı katlanması düzeltilemeyen ya da yarı ömrünü tamamlamış olan proteinlerin yıkılma yönlenmelerini sağlamaktadır (Hartl ve ark. 2011). Diğer yandan, şaperonlar, hatalı katlanma sonucu oluşabilen agregatlara da müdahale ederek çözebilmektedir (Hartl ve ark. 2011).

PH'ının patolojik bulgusu olan LC'ler, aSyn-baskın protein agregatlarından oluştuğundan, bu yapıların oluşumunu engellemekte şaperon müdahalesinin yeterli olup olmadığı sorgulanabilir. Nitekim Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ve Hsp110 şaperonları LC'lerin bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Auluck ve ark. 2002; McLean ve ark. 2002).

Molekül ağırlıklarına göre şaperonlar, 40 kDa olanlar Hsp40, 60 kDa olanlar Hsp60, 70 kDa olanlar Hsp70, 90 kDa olanlar Hsp90, 100 kDa olanlar Hsp100 ve küçük molekül ağırlıklı olanlar ise sHsp (ingilizce, small Hsp) olarak sınıflandırılır (Gorenberg ve Chandra, 2017). Bu şaperon ailelerinin bazı üyeleri gerektiğinde birlikte çalışabilir. Bu şekilde bir şaperonun işlev göstermesinde yardımcı olan bir başka şaperona "ortak şaperon" anlamına gelen "ko-şaperon" denilmektedir (Dimant ve ark. 2012).

sHsp'ler ve f-aSyn etkileşimi, özellikle fibrillerin çoğalması aşamasından önemli yer tutmaktadır. Filizlenme aşamasında serbest uçlar, ortamda bulunan monomer aSyn'lerin yapıya katıldığı bölgelerdir. sHsp'lerden αB-kristalinin aSyn fibrillerine bağlandığı ve filizlenme aşamasını sekteye uğrattığı gösterilmiştir (Waudby ve ark. 2010). Yapılan başka pek çok çalışmada da fibril çoğalmasının sHsp'ler tarafından azaltıldığı, fibriler yapının dağılmasının sağlandığı veya inklüzyon cisimlerinin oluşumunun azaltıldığı gibi sonuçlar elde edilmiştir (Outeiro ve ark. 2006; Rekas ve ark. 2004, 2007).



Şekil 2-9: Kinezin-1 taşıma kompleksinden vezikül ayrılmasında ve sitoplazmik proteinlerin aksonal taşınmasında Hsc70.

Terada ve ark. (2010)'dan uyarlanmıştır.

Nöron gövdesinde sentezlenen proteinlerin bazılarının görev yerlerine bağlı olarak hücresel uzantılarca taşınması gerekmektedir. Bu süreçte -muhtemel sebeplerden biri olarak- enerji sarfının en aza indirgenmesi için protein molekülleri tek tek değil, bir araya getirilerek kinezin-1 taşıma kompleksine yüklenerek taşınırlar (Roy, 2014). Bu taşıma kompleksi hem FC tipi taşımada hem de SCb tipi taşımada kullanılmaktadır (Scott ve ark. 2011). Bu iki tip arasındaki geçişte Hsp70 ailesi içinde yer alan ve hücre içinde sürekli ekspresyonu yapılan "heat shock cognate 70 (Hsc70 veya HSPA8)" görev alabilmektedir (Terada ve ark. 2010) (Şekil 2-9). Hsc70 bu nedenle proteinlerin aksonal taşımasında görevli bir adaptör görevi görmektedir (Ganguly ve ark. 2017). Ayrıca,

Hsc70 ve f-aSyn ilişkisi üzerine yapılan çalışmalara göre Hsc70, f-aSyn'e monomer aSyn'ye bağlandığından 5 kat daha fazla bağlanmakta ve fibrilizasyonu yavaşlatmaktadır (Pemberton ve ark. 2011).

Şaperonlar f-aSyn ile doğrudan etkileşebildiği gibi ko-şaperon ilişkileri üzerinden de etkileşebilir. Hsp70 şaperonları yapısal olarak ATPaz aktivitesi gösteren bir enzim bölgesine ve bir substrat bağlanma bölgesine sahiptir (Saibil, 2013). Bu iki bölgenin düzenlenmesinde, dolayısıyla Hsp70'lerin hedefleriyle ilişkilerinde farklı şaperonlar görev almaktadır. Hsp40'lar, Hsp70'ler için ko-şaperon görevi görmektedir. Bu şaperonlara, Hsp70'ler ile etkileşime girdikleri J domainleri nedeniyle "J proteinleri" de denilmektedir (Rassow, 1995). J proteinleri, hedef proteinlerin Hsp70'lerce alınmasını sağlamaktır (Rassow, 1995). Dolayısıyla benzer bir süreçte f-aSyn'lerin Hsp70'ler tarafından tanınmasında aracı olabileceklerdir. Dahası, taşınmaları sırasında da fibrillere bağlı kalarak refakatçı görevi de görebilirler. Hsp90 sınıfı şaperonlar ise basitçe "V" şeklindedir ve ATP hidroliziyle kapanıp açılırlar (Gorenberg ve Chandra, 2017). Bu şaperonlar da Hsp70 ailesiyle birlikte çalışabilir. Hsp70'ler proteinlerin ubikitinlenerek yıkıma gitmesini teşvik ederken, Hsp90 protein sağ kalımını teşvik eder (Scheckel ve Aguzzi, 2018). Öte yandan, Hsp90'nın monomer aSyn ile etkileşime geçebildiği ve ATP-bağımlı olarak aSyn fibrilizasyonunu etkilediği görülmüştür (Falsone ve ark. 2009). Bu sonuçları destekleyen ve önceki yıllarda yapılan bir çalışma, Hsp90'nın insan PH ve LBD beyinlerinde LC yapısındaki filamentöz aSyn yapılarıyla kolokalize olduğu gösterilmiştir (Uryu ve ark. 2006). Özetle, Hsp'ler doğrudan ya da dolaylı olarak f-aSyn'ler ile bir araya gelmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışmasında, sırasıyla f-aSyn'in hücre içine alınıp alınmadığı, f-aSyn'nin hücre içinde şaperon ekspresyonuna etki edip etmediği, f-aSyn'nin hücre içi taşınımında şaperonların rolü ve f-aSyn'nin hücre dışına salınımında şaperonların rolü araştırılmıştır. Hücre kültürüne yapılan uygulamalar, immünofloresan işaretlemeleri, Western blot ve dot blot deneyleri, alfa-Sinüklein fibrilizasyonu, hücre üst sıvısında yapılan florometrik ölçümler, sitotoksisite ölçümleri ve immünçöktürme deneyleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında (Mart 2020 ve Eylül 2020); fibirl kırma işlemi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında (Haziran 2020); Thioflavin T ölçümleri Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya laboratuvarında (Haziran 2020); konfokal mikroskobu incelemeleri Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Teknoloji Enstitüsünde (Temmuz 2020) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışma Basamakları ve Çalışmalara Göre Deney Grupları

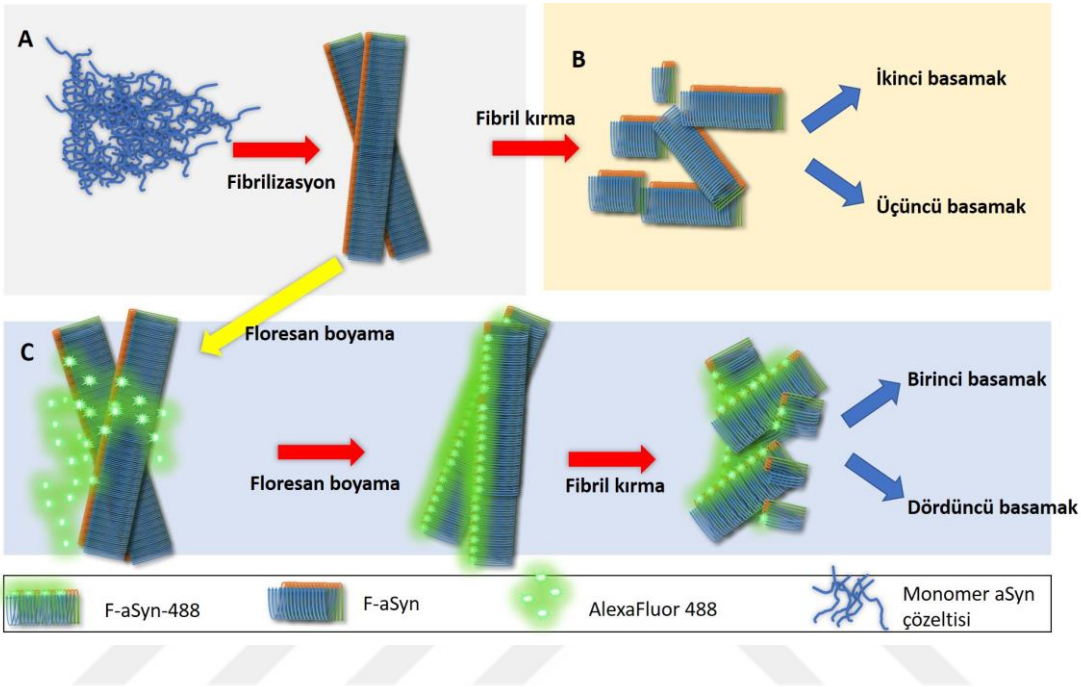
Hücre kültür deneyleri, insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılmasıyla oluşturulan "nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y (N-SH)" hücrelerinde gerçekleştirildi. Her bir basamakta oluşturulan deney grupları ve çalışmadaki yerleri aşağıdaki başlıklar altında açıklanmıştır. F-aSyn'nin çalışmada kullanımına göre geçirildiği hazırlanma basamakları Şekil 3-1'de şematize edilmiştir.

3.1.1. Birinci Basamak: Hücre İçine Fibril Alımının Belirlenmesi

Çalışmanın ilk ayağında f-aSyn'nin hücre içine alınıp alınmadığı ve alınıyorsa hangi saat aralıklarında alındığı belirlendi. Bu amaçla N-SH hücrelerine, AlexaFluor 488 ile boyanan f-aSyn (f-aSyn-488) uygulandı. Farklı saatlerde inkübasyonun ardından hücreler fikse edildi. Ardından nöron belirteci olarak mikrotübül ilişkili protein 2 (MAP2) antikoru ile immünişaretleme yapılıp konfokal mikroskobuyla analiz edildi (Şekil 3-2).

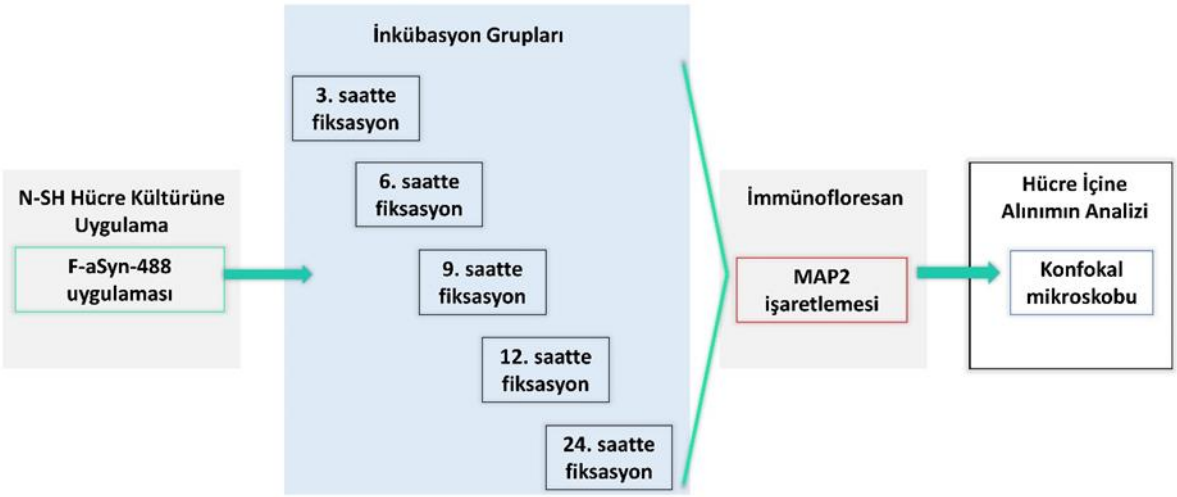
- **Kontrol:** Herhangi bir uygulama yapılmamış grup.

- **Uygulama:** F-aSyn-488 uygulaması yapılmış grup. Uygulamayı takiben 3 saat, 6 saat, 9 saat, 12 saat ve 24 saatlik inkübasyonlar sonrası hücreler fikse edildi. Anti-MAP2 antikoru ile immünofloresan işaretleme yapıldı. Konfokal mikroskopta fibrillerin hücre içine giriş saat aralığı belirlendi.



Şekil 3-1: F-aSyn'nin çalışmalara göre hazırlanma şeması.

A. Fibrilizasyon ile monomerlerden f-aSyn elde edilmesi. **B.** F-aSyn'nin kırılması, ikinci ve üçüncü basamaklarda kullanımı. **C.** F-aSyn'nin boyanmasıyla f-aSyn-488 elde edilmesi, kırılması ve birinci basamak ve dördüncü basamaklarda kullanımı.



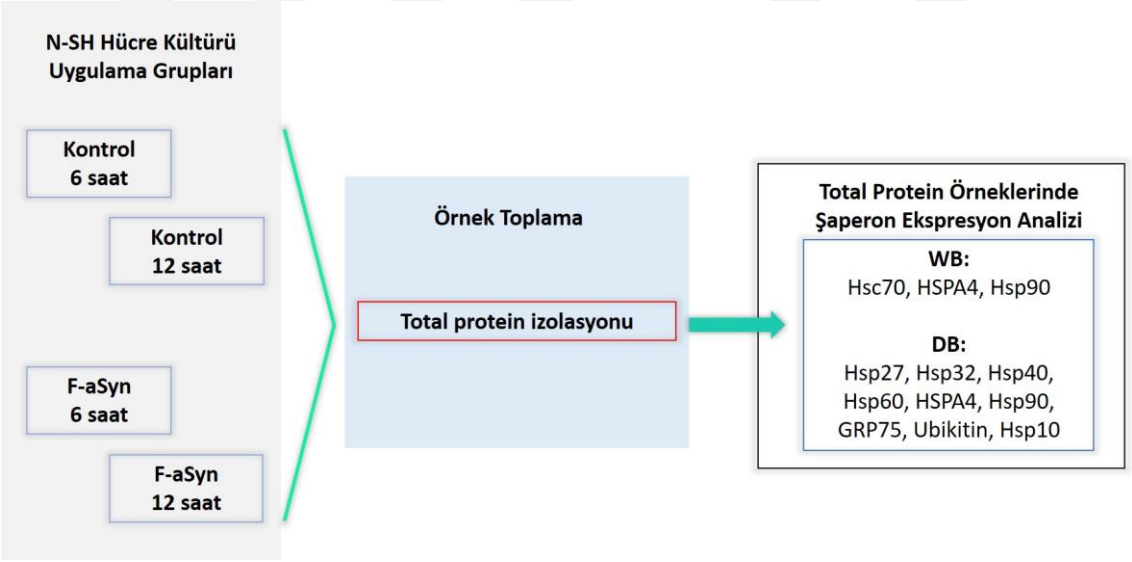
Şekil 3-2: Birinci basamak iş akış şeması.

3.1.2. İkinci Basamak: Şaperonların Ekspresyon Değişiminin Belirlenmesi

Çalışmanın ikinci ayağında f-aSyn'nin hücre içinde şaperon ekspresyonlarına etkisi araştırıldı. Bunun için N-SH hücre kültürüne f-aSyn uygulaması gerçekleştirildi. Birinci basamak sonuçlarına göre belirlenen saatlerde inkübasyonlar gerçekleştirildi. Ardından tüm gruplardan total protein izolasyonu yapıldı. Western blot (WB) ve dot blot (DB) deneyleri gerçekleştirildi. ImageJ yazılımıyla ölçümler alındı ve istatistiksel analizler ile araştırılan şaperonların ekspresyon değişimleri belirlendi (Şekil 3-3).

- **Kontrol grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamış grup. 6 ve 12 saatlik inkübasyonlar sonrası N-SH hücrelerinden total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu grup, hücre kültürü şartlarında şaperonların hücre içi seviyelerinin belirlenmesi amacıyla oluşturuldu.

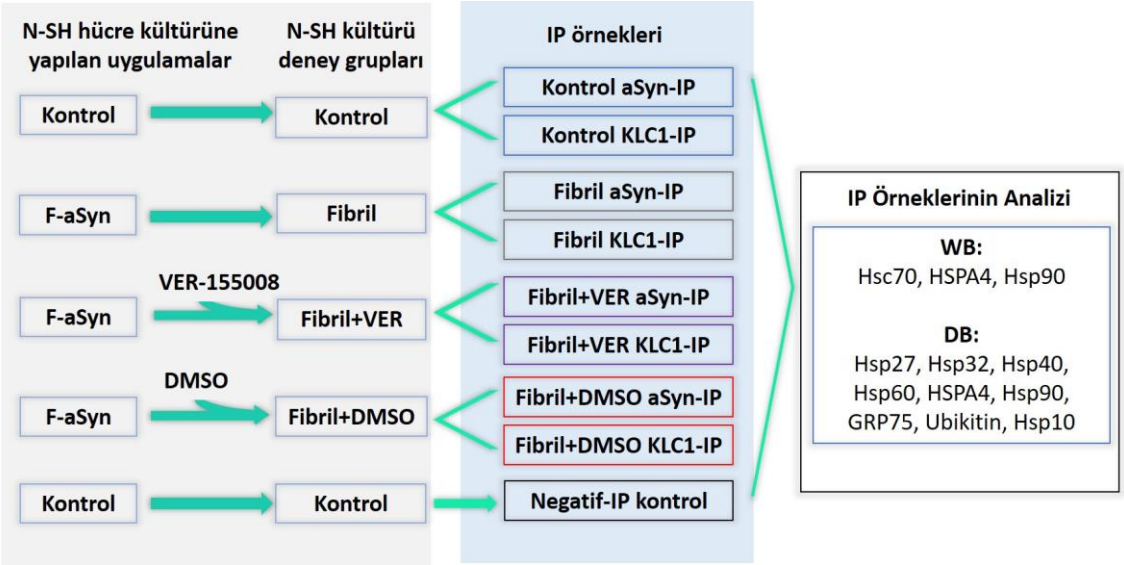
- **Fibril grubu:** F-aSyn uygulaması yapılan gruplardır. N-SH hücrelerine yapılan f-aSyn uygulamasını takiben 6 ve 12 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirildi. Ardından total protein izolasyonları yapıldı. Bu gruplar, hücrelerin farklı sürelerde f-aSyn'e maruz kaldıklarında verdikleri şaperon cevabının belirlenmesini sağlamıştır.



Şekil 3-3: İkinci basamak iş akış şeması.

3.1.3. Üçüncü Basamak: Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınımında Şaperonların Rolünün Araştırılması

Çalışmanın 3. ayağında f-aSyn'in hücre içi taşınımında şaperonların refakatçı veya adaptör olarak rol alıp almadıkları araştırıldı. N-SH hücre kültüründe deney grupları oluşturuldu ve belirlenen saatlerde uygulama ve inkübasyonlar gerçekleştirildi. Uygulamayı takiben 12. saatte tüm gruplarda immün çöktürme (immunoprecipitation, IP) deneyi yapıldı. IP örnekleri WB ve DB ile analiz edildi. ImageJ yazılımıyla ölçümler alındı ve istatistiksel analizler ile araştırılan şaperonların ekspresyon değişimleri belirlendi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Üçüncü basamak iş akış şeması ve grupların isimlendirmesi.

- **Kontrol:** N-SH hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmayan deney grubudur. Bu gruptan elde edilen IP örnekleri: Kontrol aSyn-IP ve kontrol KLC1-IP.
- **Fibril:** N-SH kültürüne f-aSyn uygulanan gruptur. Bu gruptan elde edilen IP örnekleri: Fibril aSyn-IP ve fibril KLC1-IP.
- **Fibril+VER:** N-SH kültürüne f-aSyn ve Hsp70 inhibitörü VER-155008 (VER) uygulanan gruptur. Bu gruptan elde edilen IP örnekleri: Fibril+VER aSyn-IP ve fibril+VER KLC1-IP.
- **Fibril+DMSO:** İnhibitörün (VER) içinde çözündürüldüğü dimetil sülfoksit (DMSO)'in uygulandığı kontrol grubudur. DMSO uygulaması VER

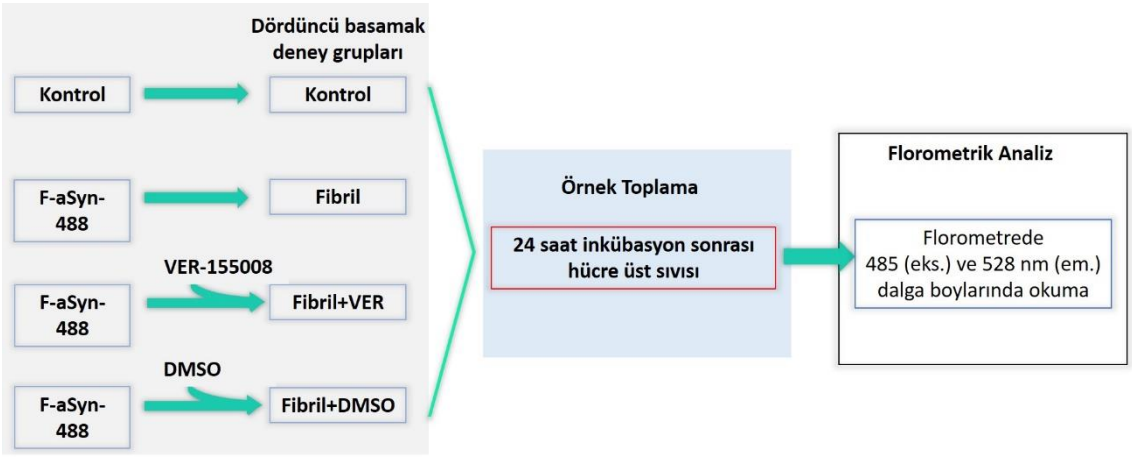
uygulamasıyla aynı zamanda ve aynı protokol izlenerek gerçekleştirildi. Bu gruptan elde edilen IP örnekleri: Fibril+DMSO aSyn-IP ve fibril+DMSO KLC1-IP.

- **Negatif-IP:** Uygulama yapılmayan deney grubudur. IP protokolünün kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu deney grubunda amaç, IP deneylerinde kullanılan sefaroz boncukların özgün olmayan bağlanma yapıp yapmadığını görmektir.

3.1.4. Dördüncü Basamak: Fibriller Alfa-Sinükleinin Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolünün Araştırılması

Şaperon inhibitörü kullanılarak f-aSyn'in hücre dışına salınmasının nasıl etkilendiği araştırıldı. N-SH hücreleri, f-aSyn-488 uygulamasını takiben 9. saatte 3 kez kültür medyumuyla yıkanıp son medyum ile inkübe edildi. Uygulamasını takiben 24. saatte hücre üst sıvıları toplanarak florometrede ölçüm yapıldı (Şekil 3-5).

- **Kontrol:** N-SH hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmayan deney grubudur. Floresan okuma sonrası diğer grupların ölçülmesinde kör değer olarak kullanıldı.
- **Fibril:** N-SH kültürüne f-aSyn-488 uygulanan gruptur.
- **Fibril+VER:** N-SH kültürüne f-aSyn-488 ve VER uygulanan gruptur.
- **Fibril+DMSO:** İnhibitörün (VER) içinde çözündürüldüğü DMSO'nun uygulandığı kontrol grubudur.



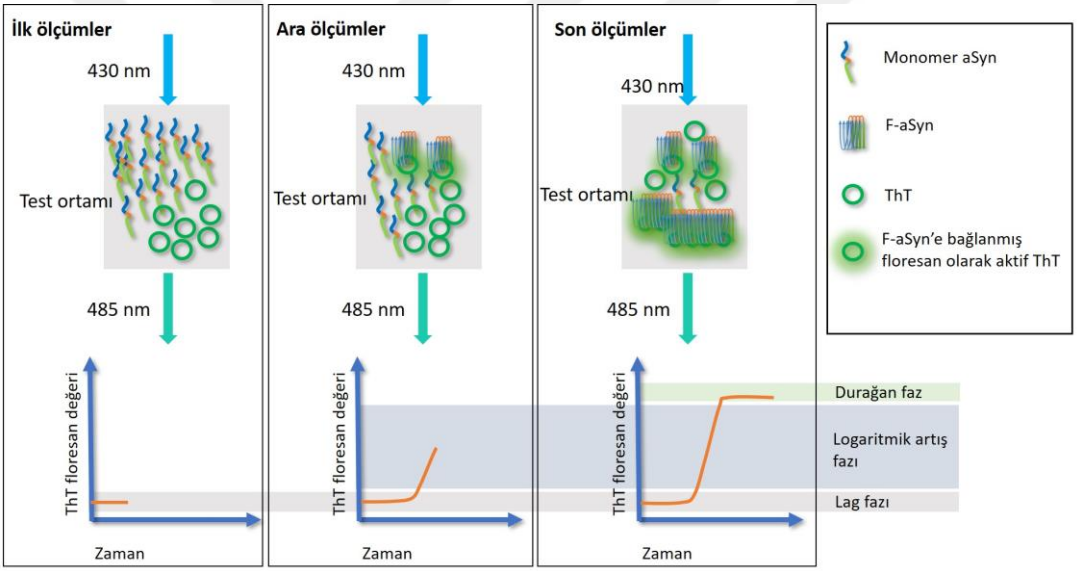
Şekil 3-5: Dördüncü basamak iş akış şeması ve deney grupları.

3.2. Çalışma Protokolleri

3.2.1. Alfa-Sinükleinin Fibrilizasyonu ve Floresan Boya ile Boyanması

3.2.1.1. Alfa-Sinüklein Fibrilizasyonu

Alfa-Sinüklein fibrilizasyonu literatürde tarif edildiği şekliyle gerçekleştirildi (Ihse ve ark. 2017). 1 mg rekombinant aSyn peptidi (Millipore, AG938-1MG), üzerine final konsantrasyonu 2 mg/ml (140 µM) olacak şekilde PBS (Gibco, 10010023) içinde çözdürüldü. Peptid çözeltisi steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 37ºC 400 rpm'de inkübe edildi. Fibrilizasyonun takibi için, fibrilizasyon protokolü boyunca farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak Thioflavin T testi yapıldı (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Thioflavin T testinde ölçüm aralıklarına göre grafik ve reaksiyonun takibi.

3.2.1.2. Thioflavin T (ThT) Testi

- Fibrilizasyon reaksiyonunda inkübe edilen aSyn çözeltisinden, ThT test karışımındaki son hacmi 4,5 µM olacak şekilde alınıp 20 µM Thioflavin T (Sigma, T3516-5G) ile karıştırıldı.

- Test karışımı 96 kuyulu plaka kuyularına konuldu.

- Plaka 37ºC 400 rpm'de inkübe edildi.

- 430 nm eksitasyon ve 485 nm emisyon dalga boylarında florometrede (BioTek, FLx800) ölçüldü.

- Kontrol olarak boş plaka kuyuları, sadece PBS bulunan ve sadece ThT bulunan kuyular aynı değerlerde okutuldu.

- Ölçümler kör okumalar çıkarıldıktan sonra grafiğe döküldü.

- Plato oluşumunda fibrilizasyon sonlandırıldı. Fibriller kullanım zamanına kadar -80 derecede saklandı.

3.2.1.3. Fibriler Alfa-Sinükleinin Floresan Boya ile Boyanması

F-aSyn'in boyanmasında AlexaFluor 488 NHS ester boyası kullanıldı. Bu boya ile boyanan fibriller f-aSyn-488 olarak gösterilmiştir. Boyama reaksiyonu üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi (ThermoFisher, A20000). Boyama protokolünde protein:boya oranı 1:2 ile 1:4 aralığında tutuldu. Protein konsantrasyonu en az 2 mg/ml olacak şekilde çalışıldı (Brahic ve ark. 2016).

- -20^{o}C'de saklanan toz haldeki AlexaFluor 488 NHS ester 10 mg/ml olacak şekilde DMSO (SigmaAldrich, D8418-100ML) içinde çözdürüldü.

- -80 ^{o}C'de saklanan f-aSyn çözdürüldükten sonra, üst sıvıdan kurtulmak için 20000 g'de 30 dk santrifüj edildi.

- F-aSyn tüp dibinde pelet oluşturdu.

- PBS ile resüspanse edilen fibril peletinin konsantrasyonu NanoDrop One'da (ThermoFisher, ND-ONE-W) 280 nm dalga boyundaki absorbans (A280) ölçümüyle belirlendi.

- F-aSyn peleti üzerine 0,1 M sodyum bikarbonat tamponu (pH 8,3) eklendi. Tüp dibine vurarak pelet dağıtıldı ve kısa süreli santrifüj edildi.

- Fibril üzerine yavaş yavaş boya eklendi.

- 1 saat karanlıkta, oda sıcaklığında manyetik döndürücüde inkübe edildi.

- Bağlanmamış boyaları uzaklaştırmak için 2 kez 20000xg 30 dk santrifüj edildi. Her seferinde PBS ile karıştırıldı.

- Son santrifüj ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra PBS eklenip pelet resüspanse edildi.

3.2.1.4. Fibril Kırma

Hücre kültürüne uygulanmadan önce, f-aSyn ve f-aSyn-488'in hücre içine alınabilecek boyuta getirilmesi için ultrasonikasyonla kırılması gerçekleştirildi (Ihse ve ark. 2017). Bu işlem "fibril kırma" olarak tanımlanmıştır. Fibril kırma işlemi, hücre kültürü uygulamalarından hemen önce gerçekleştirildi. F-aSyn ve f-aSyn-488 buz kalıbı içinde problu ultrasonikatörde 20 kez 5 saniye %25 güç ve %10 döngü ayarlarında sonikasyona maruz bırakıldı. F-aSyn-488 fibirl kırma işleminin ardından Leica DMIL invert mikroskopta görüntülendi.

3.2.2. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) kullanıldı. Bu hücrelerin nöral uzantı oluşturmaları amacıyla birimimizde geliştirilen ve nöral belirteçlerin işaretlendiği nörona farklılaştırma protokolü (yayın aşamasında) uygulandı.

3.2.2.1. Çözdürülen SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürü

Sıvı azottan alınan hücreler çözdürüldükten sonra antibiyotik-antimokotik içeren taze hücre kültür medyumunda kültüre edildi. Sadece hücreler sıvı azottan alınıp ilk kez kültür edilecekleri zaman medyum içerisine antibiyotik-antimikotik konuldu. Farklı hacimlerde hazırlanacak yenileme medyumları aşağıdaki tabloya göre oranlanarak antibiyotik-antimikotik içermeyecek şekilde hazırlandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: 40 ml SH-SY5Y hücre kültür medyumunun içeriği.

Bileşen	Miktar
Minimum Essential Medium (MEM) (ThermoFisher, 31095029)	%44
F-12 Nutrient Mix (ThermoFisher, 21765029)	%44
Fetal sığır serumu (FBS) (ThermoFisher, 10270106)	%10
Sodyum piruvat (Sigma, P5280-25G) çözeltisi (steril)	1 mM
Esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (100X) (ThermoFisher, 11140-050)	%1
Antibiyotik-antimikotik (100X) (ThermoFisher, 15240062)	%0,05

- Hazırlanan kültür medyumu 0,22 μm'lik steril filtreden (Corning, 430767) geçirildikten sonra 37^{o}C ısıtıldı.

- Hazırlanan medyumdan 9 ml alınıp 100 mm'lik steril hücre kültür tabağına ve 9 ml ayrı bir 15 ml'lik tüpe alındı ve 37 ^{o}C, %5 CO_2 nemli atmosferli inkübatöre kaldırıldı.

- Sıvı azottan çıkarılan hücreler %70'lik etanolde dezenfekte edildikten sonra su banyosunda eritildi.

- Hücreler 37^{o}C'ye ısıtılmış 9 ml medyuma eklendi ve 125 g 6 dk santrifüj edildi.

- Üst sıvı atılıp 1 ml taze kültür medyumu eklenip resüspanse edildi.

-Hücreler 100 mm'lik kültür tabağına ekilip 37^{o}C, %5 CO_2 nemli atmosferli hücre kültür inkübatörüne kaldırıldı.

- Her 2-3 günde bir kez antibiyotik-antimikotik içermeyen hücre kültür medyumu ile hücre medyumu yenilendi.

3.2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

- Eski hücre kültür medyumu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

- 2 ml %0,25 tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056) ile hücreler 1 kez yıkandı.

- Hücrelere 5 ml %0,25 tripsin-EDTA konuldu, hücre kültür inkübatöründe 5 dk inkübe edildi.

- 5 ml hücre medyumu ile tripsin nötralize edildi ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril tüpe toplandı.

- 125 g 6 dk santrifüj edildi.

- Üst sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

- Hücre peleti 5 ml taze hücre kültür medyumuyla resüspanse edildi.

- Önceden Poli-L-ornitin ile kaplanmış lamel bulunan plaka kuyularına hücre ekimi yapılıp hücre kültür inkübatörüne kaldırıldı.

- Farklılaştırma protokolüne geçilene kadar her 2-3 günde bir kez taze kültür medyumuyla yenileme yapıldı.

3.2.2.3. Poli-L-Ornitin Kaplı Hücre Kültür Plakalarının Hazırlanması.

Hücreler %90 yoğunluğa ulaştıklarında çalışmalara göre uygun ölçütlerdeki hücre kültür plakalarına pasajlandı. Nörona farklılaştırma protokolü poli-L-ornitin (PLO) kaplanmış plakalarda gerçekleştirildi.

- 1:50 oranında PLO (Sigma, P4957) ve steril deiyonize su karışımı hazırlanıp 0,22 µm'lik steril şırınga filtresinden (JetBioFil, FCA-206-025) geçirildi.

- Hücre kültür plakalarına otoklavlanmış steril hücre kültür lamelleri konuldu.

- Lamel konulan plaka kuyularına hazırlanan PLO solüsyonu konulup 2 saat 37 ^{o}C, %5 CO_2 nemli atmosferli hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi.

- Kuyular 3 kez hızlıca steril deiyonize su ile yıkandı.

- Kuyulara antibiyotik-antimikotik içermeyen taze hücre kültür medyumu konuldu ve plaka hücre kültür inkübatörüne kaldırıldı.

3.2.2.4. Hücrelerin Nörona Farklılaştırılması

SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılmasında aşağıdaki Tablo 3-2'de içeriği belirtilen farklılaştırma medyumu kullanıldı. Farklı hacimlerde hazırlanan medyumda içeriğinde aşağıdaki konsantrasyonlar korundu. Uygulamadan 1 gün öncesinde konalbümin ve FBS içermeyen medyum ile tazeleme yapıldı. Hücreler nörona farklılaştırılmadan önce PLO kaplı yüzeylere ekildi.

Tablo 3-2: 21 ml N-SH hücre kültür medyumunun içeriği.

Bileşen	Miktar
Neurobasal medium (NBM) (Gibco, 21103-49)	%95,5
B27 (50X) (Gibco, 17504-044)	%2
%9 Steril NaCl (SigmaAldrich, S-3014) çözeltisi	%0,7
L-glutamin (100X) (Gibco, 25030-024)	%1
Putreskin (100 mM) (Sigma, P7505)	100 nM
İnsülin (40 µg/ml) (Gibco, 12585-014)	10 ng/ml
Progesteron (40 mM) (SigmaAldrich, P6149)	20 nM
Konalbümin (SigmaAldrich, C7786)	%0,25
FBS (Gibco, 10270106)	%1
Retinoik asit (10 mM)	10 nM
Beyin-türevli nörotrofik faktör **(**BDNF**)** (100 ng/µl)	50 ng/ml

- Nörona farklılaştırma medyumu hazırlandı ve filtreden geçirildi (Tablo 3-2).

- Medyum 37 ºC'de ısıtılmaya bırakıldı.

- Yeterli yoğunluktaki (yaklaşık %40) hücrelerden eski kültür medyumu uzaklaştırıldı.

- 37 ºC'ye getirilmiş nörona farklılaştırma medyumu uygulandı.

- Hücreler, hücre kültür inkübatörüne kaldırıldı.

3.2.2.5. Hücre Fiksasyonu

Kültür lamellerinde nörona farklılaştırılan hücreler IF deneylerinde kullanılmadan önce fikse edildi. Fiksasyonun tüm basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hücreler %3,7'lik paraformaldehit ile fikse edildi.

- Farklı inkübasyon süreleri sonunda petrilerden kültür medyumu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

- 1 ml %3,7 PFA (pH 7,4) uygulandı.

- 15 dk inkübe edildi.

- PFA uzaklaştırılıp 2 kez 5 dk 1 ml PBS ile inkübe edildi.

- 2 ml PBS eklenen hücreler immünofloresan işaretlemelere kadar +4 ºC derecede saklandı.

%3,7'lik paraformaldehit (PFA) hazırlanışı: Son hacimdeki konsantrasyonu %3,7 olacak şekilde PFA tartıldı ve distile su içerisinde çözdürüldü. HCl ve NaOH ile pH 7,4 olarak ayarlandı. PBS ile son hacime tamamlandı. Kullanım zamanına kadar -20 ºC'de saklandı.

3.2.2.6. Hücre kültüründe gerçekleştirilen uygulamalar

Hsp70 inhibitörü (VER-155008) uygulaması: VER-155008 (Sigma, SML0271), Hsp70 sınıfı şaperonların inhibisyonunda kullanılır. İnhibitör 16 mM olarak DMSO içinde çözdürüldükten sonra kullanım gününe kadar -20 ºC'de saklandı. Uygulama yapılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Hücre kültür medyumundan steril 15 ml'lik polipropilen tüpe belirli miktarda alındı. Son konsatrasyon 100 µM olacak şekilde gereken miktarda inhibitör tüp içindeki medyumda iyice karıştırıldıktan sonra

hücrelere geri uygulandı. İnhibitör DMSO (Sigma, D8418-100ML) içinde çözdürüldüğü için kontrol grubu olarak hücrelere DMSO uygulandı.

DMSO uygulaması: VER-155008 çözücüsü olarak kontrol grubu oluşturmada kullanıldı. Hücrelere inhibitörle aynı miktarda ve aynı şekilde uygulandı.

Fibriler alfa-Sinüklein uygulamaları: F-aSyn ve f-aSyn-488 hücre medyumlarına son hacimleri 1 μM olacak şekilde damlatma yoluyla uygulandı. Uygulamanın ardından hücreler ileri-geri ve sağ-sol çalkalanarak fibrillerin dağıtılması sağlandı. Hücreler belirlenen sürelerde fibrillerle inkübe edildi.

3.2.3. Fibrillerin hücre içine girişinin araştırılması

İleride yapılacak uygulamalar ve deneylerin saat aralıklarının belirlenmesi için f-aSyn'in hücre içine hangi saat aralıklarında girdiği analiz edildi. Bu nedenle hücre kültür lamellerinde kültüre edilen N-SH hücrelerine floresan boya ile işaretlenip fibril kırma işleminden geçirilen f-aSyn-488 uygulandı. Uygulamadan 3, 6, 9, 12 ve 24 saat sonrasında hücreler fikse edildi. Fiksasyon ardından hücre içi bir nöron belirteci olan MAP2 proteininin immünfloresan işaretlemesi yapıldı. Konfokal mikroskobunda hücre içine alım analiz edildi.

3.2.4. İmmünofloresan işaretleme

F-aSyn-488'in (yeşil) hücre içine girip girmediğinin belirlenmesi için nöron belirteci olması yanında, hücre içi bir protein olan MAP2 proteininin işaretlenmesinden yararlanıldı. IF çalışmasında kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları Tablo 3-3'de verilmiştir.

- Her bir kültür lameli 24 kuyulu plakanın bir kuyusuna aktarıldı.

- Lamellere bloklama solüsyonu uygulandı.

Bloklama solüsyonu: %0,02 TPBS [%0,02 triton x-100 (Sigma, X-100) içeren PBS] içinde %30 keçi serumu

- 1 saat oda koşullarında çalkalayıcıda inkübe edildi.

- Hızlıca 3 kez PBS ile yıkandı, primer antikor uygulandı.

Primer antikor uygulama solüsyonu: %0,02 TPBS içinde %1,5 keçi serumu ve primer antikor

- 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

- Primer antikor toplandı, 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- Sekonder antikor konuldu, 1 saat çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi.

Sekonder *antikor uygulama solüsyonu: %0,02 TPBS içinde %1,5 keçi serumu ve* Sekonder *antikor*

- Sekonder antikor toplandı, 1 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- Her kuyuya 1:15000 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI) uygulandı, 15 sn bekletilip çekildi.

- 2 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- Lameller, kapatma medyumu (ThermoFisher, P36970) damlatılmış lamların üzerine ters şekilde kapatıldı.

Görüntüleme: Fibrillerin hücre içine girişi konfokal mikroskobunda analiz edildi. Diğer IF çalışmalarının görüntülemeleri BioTek Lionheart FX canlı hücre görübtüleme sisteminde gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: IF deneylerinde kullanılan antikor listesi.

Antikor tipi	Antikor	Seyreltme oranı
Primer antikor	Anti-MAP2 (Invitrogen, MA5-12826)	1/500
	Anti-Hsc70 (Novusbio, NBP2-67335)	1/75
	Anti-Hsp90 alfa (Invitrogen, PA3-013)	1/200
	Anti-KLC1 (Novusbio, NP1-46840)	1/75
	Anti-Alfa-Sinüklein (Invitrogen, 328100)	1/100
Sekonder antikor	Anti-mouse IgG AlexaFluor 568 (Abcam, ab175473)	1/200
	Anti-rabbit IgG AlexaFluor 568 (Abcam, ab17547)	1/200

3.2.5. İmmünopresipitasyon

Fibrillerin hücre içinde taşınmaları IP deneyleri ile analiz edildi. N-SH hücrelerine son hacim 1 µM olacak şekilde f-aSyn uygulandı. Hsp70 sınıfı şaperonların aSyn taşınmasında etkili olup olmadığının belirlenmesi için f-aSyn ugulamasının 6. saatinde hücre kültürüne 100 µM VER uygulandı. IP süresinde hücre lizatlarında 50 µM VER olması sağlandı. VER'in kontrolü olarak, oluşturulan farklı bir gruba, VER ile eş zamanlı olarak ve eşit hacimde DMSO uygulandı. 12. saatte IP deneyi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz üzerinde veya +4 ^{o}C'de gerçekleştirildi. Bu deney gruplarından elde edilen örnekler WB ve DB çalışmalarıyla analiz edileceğinden her bir IP örneğinden 2 adet oluşturuldu.

IP tamponu içeriği:150 mM NaCl (Sigma, S-3014), 50 mM Tris (AppliChem, A2264, 1000), 0,5 mM EDTA (Sigma, E5134), %1 Triton X-100 (Sigma, x-100), 1:100 proteaz inhibitör kokteyl (PIC) (ThermoFisher, 1861280)

- 60 mm'lik petrilerde %90-%100 yoğunluktaki hücreler buz üzerinde konuldu ve eski medyum çekildi.

- Hücreler bir kez 2 ml buzda soğutulmuş PBS ile yıkandı.

- 0,5 ml buzda soğutulmuş PIC içeren lizis tamponu eklendi ve hücre kazıyıcı ile kazındı.

- Hücre lizatları soğuk bloktaki 1,5 ml'lik tüplere alındı.

- 1 dk vortekslendi ve +4^{o}C'de çalkalayıcıda 30 dk inkübe edildi. Bu sırada sefaroz boncukların hazırlanmasına geçildi.

Sefaroz boncukların hazırlanması

*Sefaroz bocukların alınmasında her seferinde kesik pipet ucu kullanıldı. Yıkama işleminde konulan sıvının uzaklaştırılması için 8000g 5 dk santrifüj edildi.

- Hesaplanan miktarda %20 etanolde saklanan protein G sefaroz boncuklardan (SigmaAldrich, P-3296) alınıp 1,5 ml'lik tüpe konuldu.

- Yıkama için alınan sefaroz boncuk miktarının 4 katı sigma su (Sigma, W4502) boncukların üzerine konuldu ve tüpe vurarak karıştırıldı.

- Total boncuklar 8000 g 5 dk santrifüj edildi, üst sıvı boncuklara dokunulmadan atıldı.

- 3 kez boncuk hacminin 4 katı PBS ile yıkandı, üst sıvı boncuklara dokunulmadan atıldı.

- 1 kez PIC içermeyen lizis tamponu ile yıkandı, üst sıvı boncuklara dokunulmadan atıldı.

- 3 kez PBS ile yıkandı, üst sıvı boncuklara dokunulmadan atıldı.

- 1:1 oranında PIC içeren lizis tamponu boncukların üzerine yavaşça eklendi.

- Ön yıkama aşamasına geçildi.

Ön yıkama

- İnkübasyon sonrası hücre lizatları +4ºC'de en yüksek hızda 15 dk santrifüj edildi.

- Süpernatantlar buzda soğutulmuş yeni 1,5 ml'lik tüplere alındı.

- Ön yıkama için tüplere 15 µl boncuk konuldu, 1 saat +4 ºC'de çalkalayıcıda inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası +4 ºC'de 8000 g'de 5 dk santrifüj edildi.

- Süpernatantlar buzda soğutulmuş1,5 ml'lik yeni bir tüpe alındı.

- Ön yıkama yapılan lizatlara 5 µg anti-aSyn (ThermoFisher, 328100) antikoru konularak aSyn-IP lizatları; 4 µg anti-KLC1 (Novusbio, NP1-46840) antikoru konularak KLC1-IP lizatları oluşturuldu. IP negatif kontrol olarak kullanılacak olan lizata antikor konulmadı.

- Lizatlar gece boyu +4 ºC'de çalkalayıcıda inkübe edildi.

- Lizatlara 35 µl sefaroz boncuk eklendi, +4 ºC'de çalkalayıcıda 4 saat inkübe edildi.

- Lizatlar +4 ºC'de 6000 g 3 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atıldı, buzda soğutulmuş PBS eklendi.

- 3000 g 2 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atıldı, buzda soğutulmuş PBS eklendi.

- 3000 g 2 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atıldı, pelet –80 ºC'de saklandı.

- IP örnekleri WB ve DB ile analiz edildi.

IP örneklerinin analizi: WB ile analizde IP örnekleri 1:3 oranında %10 β-merkaptoetanol içeren 4X WB yükleme tamponuyla (ThermoFisher, 2156477) karıştırılıp kaynayan suda denatüre edildi. 20000 g 1 dk santrifüj edildikten sonra sefaroz boncuklar alınmamasına dikkat edilerek jele yüklendi. DB analizi için IP örnekleri 1:3 4X WB yükleme tamponuyla (ThermoFisher, 2156477) karıştırıldı. 50 derecede 10 dk inkübe edildikten sonra santrifüjlendi. Üst sıvı B protokolünde olduğu gibi bloklama tamponuyla karıştırıldıktan sonra membranlara uygulandı.

3.2.6. Dot blot protokolü

Şaperon ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi için ticari olarak temin edilen dot blot membranları (RayBiotech, AAH-HSP-1-8) kullanıldı. DB protokolü üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

- Tüm bileşenler oda sıcaklığına getirildikten sonra membranlar set ile gelen plaka kuyularına yerleştirildi.

- Kuyulara yerleştirilen membranlara yavaşça 2 ml bloklama tamponu uygulandı.

- 30 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

- Protein örnekleri uygulanmadan önce 14000 rpm 3 dk santrifüj edildi.

- Total protein örneğinden 230 µg sabitlenmiş miktarda alınıp bloklama tamponuyla 1 ml'ye tamamlandı ve kuyulardaki memranlara uygulandı. IP örnekleri

- Gece boyu +4 ºC'de çalkalayıcıda inkübe edildi.

- Protein örnekleri pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

- 2 ml 1. yıkama tamponu ile 3 kez 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve sonra tampon tamamen uzaklaştırıldı.

- 2 ml 2. yıkama tamponu ile 2 kez 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve sonra tampon tamamen uzaklaştırıldı.

- Her membrana bloklama tamponuyla 40 kat seyreltilen 1 ml biyotinli antikor karışımı uygulandı.

- Gece boyu +4 ºC'de çalkalayıcıda inkübe edildi.

- 2 ml 1. yıkama tamponu ile 3 kez 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve sonra tampon tamamen uzaklaştırıldı.

- 2 ml 2. yıkama tamponu ile 2 kez 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve sonra tampon tamamen uzaklaştırıldı.

- Her membrana bloklama tamponuyla 1000 kat seyreltilen 2 ml HRP-streptavidin uygulandı.

- 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

- HRP-streptavidin uzaklaştırıldı.

- 2 ml 1. yıkama tamponu ile 3 kez 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve sonra tampon tamamen uzaklaştırıldı.

- 2 ml 2. yıkama tamponu ile 2 kez 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve sonra tampon tamamen uzaklaştırıldı.

- Membranlar işaretli yüzeyi yukarıda kalacak şekilde blotlama kağıdının üzerine alındı ve peçete veya filtre kağıdıyla fazla sıvı üzerinden alındı.

- Membranlar setle gelen şeffaf plastiklerin üzerine alındı.

- Her membran için 250'şer µl tespit ajanı C ve D pipet yardımıyla iyice karıştırıldı.

- Her membrana bu karışımdan 0,5 ml uygulandı ve 2 dk inkübe edildi.

- Setle gelen diğer şeffaf plastik membranların üzerine konularak sandviç haline getirildi.

- Fazla tespit ajanı rulo yardımıyla uzaklaştırıldı.

- DNR microchemi 4.2 görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.2.7. Western blot protokolü

Şaperon ekspresyon analizleri ve IP örneklerinin analizinde DB deneyine ek olarak WB deneyi yapıldı. Çalışmada kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları aşağıdaki gibidir (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: WB deneylerinde kullanılan antikorlar listesi.

Antikor tipi	Antikor	Seyreltme oranı
Primer antikor	Anti-Hsc70 (Novusbio, NBP2-67335)	1/750
	Anti-HSPA4 (Invitrogen, MA5-15578)	1/1000
	Anti-Hsp90 alfa (Invitrogen, PA3-013)	1/1000
	Anti-beta aktin (ACTB) (Abcam, ab8226)	1/3000
Sekonder antikor	Anti-mouse IgG + HRP (Invitrogen, 65-6120)	1/3000
	Anti-rabbit IgG + HRP (Abcam, ab97040)	1/3000
	Veriblot (Abcam, ab131366)	1/2000

- Birinci normalizasyon olarak her kuyuya 30 ng protein yüklenecek şekilde örnekler hazırlandı.

- Proteinler %10 beta-merkapto etanol (Applichem, A1108,0500) içeren yükleme tamponuyla (ThermoFisher, 2156477) karıştırılıp 5 dk 95^{o}C'de kaynayan suda bekletildi.

- Örnekler kısa süreli santrifüj edildikten sonra yüklenecek miktarda alınıp %4-12 SDS poliakrilamid jele (ThermoFisher, NW04120BOX) yüklendi.

- Jel tankına yürütme tamponu (ThermoFisher, B0002) konuldu.

- Örnekler ThermoFisher dikey jel elektroforez sisteminde yürütüldü.

Yürütme ayarı: 200 V, 500 mA, 25 dk

- Yürütme sonrasında Biorad Trans-Blot Turbo cihazında nitroselüloz membrana (ThermoFisher, PB3210) yarı kuru transfer gerçekleştirildi.

- Bloklama için %5 süt tozu içeren PBS içerisinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi.

- 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- %5 süt tozu içeren PBS içerisinde primer antikor uygulandı.

- 4 ^{o}C'de gece boyu inkübe edildi.

- Primer antikor toplandı.

- 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- %5 süt tozu içeren PBS içerisinde yaban turbu peroksidaz (horseradish peroxidase, HRP) konjugeli sekonder antikor (Invitrogen, 65-6120) uygulandı. IP örneklerinin işaretlemesinde veriblot kullanıldı.

- 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- 3 kez 5 dk yıkandı.

- Luminol ve H_2O_2 içeren görüntüleme solüsyonuyla (Advansta, K-12045-D50) muamele edildi.

- DNR microchemi 4.2 görüntüleme cihazında görüntülendi.

- Görüntüler ImageJ yazılımıyla ölçüldü.

3.2.7.1. Membran soyma ve referans protein işaretlemesi

İkinci normalizasyon için, Hsc70 işaretlenen membranda soyma protokolü uygulandıktan sonra referans protein olarak beta aktin (ACTB) işaretlemesi yapıldı.

Soyma tamponu içeriği: 25 mM glisin (Sigma, G2879-100G), %1 SDS (Sigma, L-4509)

- Membran 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda soyma solüsyonu (pH 2,0) ile inkübe edildi.

- 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- 1 saat %5 süt tozu içeren PBS ile bloklama yapıldı.

- 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- %5 süt tozu içeren PBS içinde 1/3000 seyreltme oranıyla çözdürülen ACTB hedefleyen primer antikor (Abcam, ab8226) uygulandı.

- Gece boyu +4^{o}C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

- Primer antikor toplandı.

- 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı.

- %5 süt tozu içeren PBS içerisinde fare IgG hedefleyen HRP konjugeli sekonder antikor (Abcam, ab97040) uygulandı.

- 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- 3 kez 5 dk yıkandı.

- Luminol ve H_2O_2 içeren görüntüleme solüsyonuyla (Advansta, K-12045-D50) muamele edildi.

- DNR microchemi 4.2 görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.2.8. Fibrillerin hücre dışına salınımının analizi

N-SH hücre kültür medyumuna son konsantrasyon 1 μM olacak şekilde f-aSyn-488 uygulandı. 9 saat inkübasyon yapıldıktan sonra fibril uygulanan tüm gruplardan üst sıvılar toplandı ve kuyular 37^{o}C sıcaklıktaki NBM ile 3 kez hassas şekilde yıkandı. Son olarak kuyulara taze farklılaştırma medyumu konuldu. Kontrol, fibril, fibril+VER ve fibril+DMSO olarak 4 deney grubu oluşturuldu. Hücreler inkübatöre kaldırıldı. F-aSyn-488 uygulamasından 24 saat sonra hücre üst sıvıları toplandı. Üst sıvılar florometrede (BioTek, FLx800) 485 eksitasyon 528 nm emisyon dalga boylarında okutuldu. **Negatif kontrol** olarak N-SH hücre kültür medyumu okutularak, medyumun floresan ışımadaki etkisi ölçüldü.

Deney gruplarının floresan ölçümlerinden negatif kontrolün floresan ölçümü çıkartıldı. Ardından kontrol grubundan alınan hücre kültür üst sıvılarının floresan ölçümleri kalan 3 deney grubununkilerden çıkartıldı. Fibril, fibirl+VER ve fibril+DMSO deney guplarındaki floresan ölçüm değerleri, hazırlanan **standart grafiğin** eğim formülündeki "y" değerinin yerine yerleştirilerek karşılığındaki salınan f-aSyn-488 konsantrasyonu belirlendi. Gruplar arasında hücre dışına salınan f-aSyn-488 miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı saptandı.

Standart grafiğinin oluşturulması: Farklı tüplerdeki N-SH hücre kültür medyumuna eklenen 1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0,0001 μM f-aSyn-488'in floresan ışıma değerlerindeki karşılığa göre hazırlandı. Hazırlanan standart grafikteki formül kullanılarak hücre dışına salınan f-aSyn-488 konsantrasyonları hesaplandı (Brahic ve ark. 2016).

3.2.9. Sitotoksisite Ölçümü

Hücresel stres seviyesinin belirlenmesi için hücre kültür medyumundaki LDH miktarları dikkate alındı. Bu amaçla, çalışmanın deney gruplarına ek olarak sitotoksisite testlerinde kullanılmak üzere yüksek salınımlı kontrol ve düşük salınımlı kontrol grupları oluşturuldu. **Düşük salınımlı kontrol** deney grubu uygulama yapılmayan N-SH hücre kültürüdür. **Yüksek salınımlı kontrol** deney grubu, N-SH hücre kültür medyumunda son

konsantrasyon %2 olacak şekilde Triton X-100 eklenerek oluşturuldu. Yüksek kontrol grubu hücreleri Triton X-100 içeren medyumla 24 saat inkübe edildi. Ek olarak, deney sırasında cihaza sadece kültür medyumu okutularak, kültür medyumundan kaynaklı OD değişimleri elimine edildi.

Deney gruplarından ve LDH ölçüm gruplarından hücre kültür üst sıvıları toplandı ve ölçüm zamanına kadar -80^{o}C'de muhafaza edildi. Ölçüm gününde, oda sıcaklığına getirilen LDH ölçüm seti (Roche, 11644793001) içindeki boya ve seyreltici belirtilen oranda karıştırılarak **LDH ölçüm boya karışımı** hazırlandı. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna -80^{o}C'den çıkarılıp oda sıcaklığına getirilen kültür medyumlarından 100'er µl dağıtıldı (her deney grubu için 3 kuyu). Kuyulara dağıtılan medyumların üzerine 100 µl LDH ölçüm boya karışımı eklendi. 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ardından Thermo Multiskan Ex cihazında 492 nm'de kolorimetrik ölçüm alındı. Tüm ölçümler kültür medyumunun ölçümünden çıkarıldıktan sonra Şekil 3-7'daki formüle göre LDH yüzdesi hesaplandı. Gruplar arasındaki LDH salınım miktarlarının istatistiksel analizleri yapıldı.

$$\frac{\text{LDH ölçümü - Düşük kontrol LDH ölçümü}}{\text{Yüksek kontrol LDH ölçümü - Düşük kontrol LDH ölçümü}} \times 100$$

Şekil 3-7: LDH salınım yüzdesinin hesaplanmasında kullanılan denklem.

3.2.10. İstatistiksel Analizler

Şaperon ekspresyon deneylerinin istatistiksel analizi, gruplar arasındaki farkın anlamlılığı ve grup içinde zamana bağlı değişimin anlamlılığının belirlenmesi şeklinde iki şekilde yapıldı. Gruplar arası değerlendirmede 6 ve 12 saat zaman aralıklarındaki kontrol ve fibril grupları karşılaştırıldı. Hsc70 WB işaretlemesinin Image J yazılımıyla alınan ölçümleri, ACTB WB işaretlemesinin Image J yazılımıyla alınan ölçümlerine oranlanarak işlenmiş veriler elde edildi. Hsp27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, HSPA4, Hsp90, GRP75, ubikitin ve Hsp10'un DB işaretlemelerinin Image J ile alınan ölçümleri işlendi. İşlenmiş veriler unpaired t test ile gruplar arası ve grup içi karşılaştırmaya sokuldu. Normalite testini geçemeyen gruplar için Mann-Whitney Test'i; normalite testini geçen

fakat aralarında standart sapma (SD) farkı olan gruplar için Welch düzeltmesi yapılan unpaired t testi kullanıldı.

Fibriler alfa-Sinükleinin hücre içi taşınımının istatistiksel analizi için, Image J yazılımıyla elde edilen WB ve DB ölçümleri işlendi. **Hücre dışına salınımının istatistiksel analizi** için, işlenen florometrik ölçümler standart grafiğin eğim denklemindeki "y" değeri yerine yerleştirildi. Gruplara ait ölçüm verilerin dağılımı veya SD değerleri arasındaki fark anlamlı değilse önce One-Way ANNOVA, ardından Tukey-çoklu karşılaştırma testine sokuldu. Gruplar arasındaki SD değerleri anlamlı dercede değişiyor ve/veya gruplar normalite testini geçemiyorsa, önce Kruskal Wallis, ardından Dunn's çoklu karşılaştırma testine sokuldu. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler GraphPad InStat 3.06 yazılımında yapıldı.

4. BULGULAR

Tüm hücre kültür çalışmaları N-SH hücrelerine yapılmış ve fibriler alfa-Sinüklein (F-aSyn)'nin hücre içine alınmasını takip edebilmemizi sağlayan bir model oluşturulmuştur. Bu amaçla, aSyn overekspresyonu yerine, laboratuvar koşullarında hazırlanan f-aSyn uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Konfokal mikroskobunda f-aSyn'nin hücre içine girdiği ve hücresel uzantılarda tespit edildiği inkübasyon saat aralıkları baz alınarak deneyler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak şaperon ekspresyon seviyelerinin f-aSyn ve zamana bağlı değişimi incelenmiştir. Ardından, aSyn ve KLC1 ile bağlanan şaperonların toplanması için IP deneyleri; IP deneylerini takiben WB ve DB analizleri yapılmıştır.

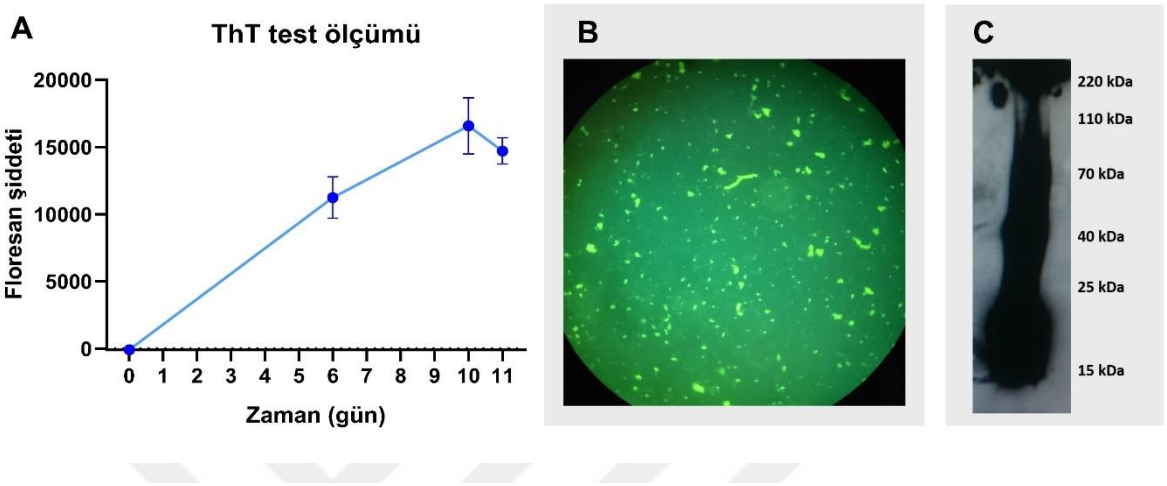
4.1. Alfa-Sinükleinin Fibrilizasyonu, Floresan boyanması ve Kırılması

Alfa-Sinüklein fibrilizasyonu (f-aSyn oluşturma), f-aSyn'nin floresan boyanması (f-aSyn-488 oluşturma) ve fibril kırma çalışmaları başarılı şekilde gerçekleştirildi. Fibrilizasyon reaksiyonu süresince, 0, 6, 10 ve 11. günlerinde alınan örneklerle gerçekleştirilen ThT testleriyle, aSyn fibrilizasyonunun takibi yapıldı. Reaksiyonun tamamlanması 10. günde maksimum floresan ışıma değerinin yakalanmasıyla doğrulandı ve reaksiyon 11. günde sonlandırıldı (Şekil 4-1A).

Fibrilizasyondan sonra gerekli miktarda f-aSyn alınıp floresan boyama ve fibril kırma işlemlerinden geçirildi. Floresan boyama ve fibril kırma işlemlerinin ardından elde edilen f-aSyn-488, içinde PBS bulunan hücre kültür plakasının bir kuyusuna uygulandı ve floresan mikroskopta GFP filtresi altında incelendi. F-aSyn'nin bu görüntülemede alınan görüntüsü Şekil 4-1B'de gösterilmiştir. Buna göre, f-aSyn'nin floresan boya ile işaretlendiği, uygun filtre yardımıyla mikroskop altında görüntülenerek doğrulandı. Öte yandan, bu görüntülemede hücre içine giremeyecek büyüklükte amiloid plakların yanı sıra hücrelerin içeri alabileceği kadar küçük boyutlu fibriller de görülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda fibril kırma işleminin başarılı olarak gerçekleştiği doğrulanmıştır. Bu doğrulamaların ardından N-SH hücrelerinde uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

Fibrilizasyon reaksiyonun 6. gününde elde edilen f-aSyn örnekleri WB tekniği ile işaretlendi (Şekil 4-1C). Farklı boyutlarda aSyn görülmesi, ThT test sonuçlarıyla uyumlu olarak reaksiyon sırasında monomer, oligomer ve daha büyük yapılı fibrillerin reaksiyon tüpünde bulunduğunu gösterdi. Ayrıca WB işaretlemeri sonucu, anti-aSyn antikorunun f-

aSyn gibi büyük aSyn yapılarına da bağlanabildiği saptandı. Bu nedenle, IP deneyinde kullanılan anti-aSyn antikorunun hücre içinde monomer aSyn'lere bağlamasının yanı sıra, hücrelere uygulanan f-aSyn'leri de bağlayabildiği gösterilmiş oldu.



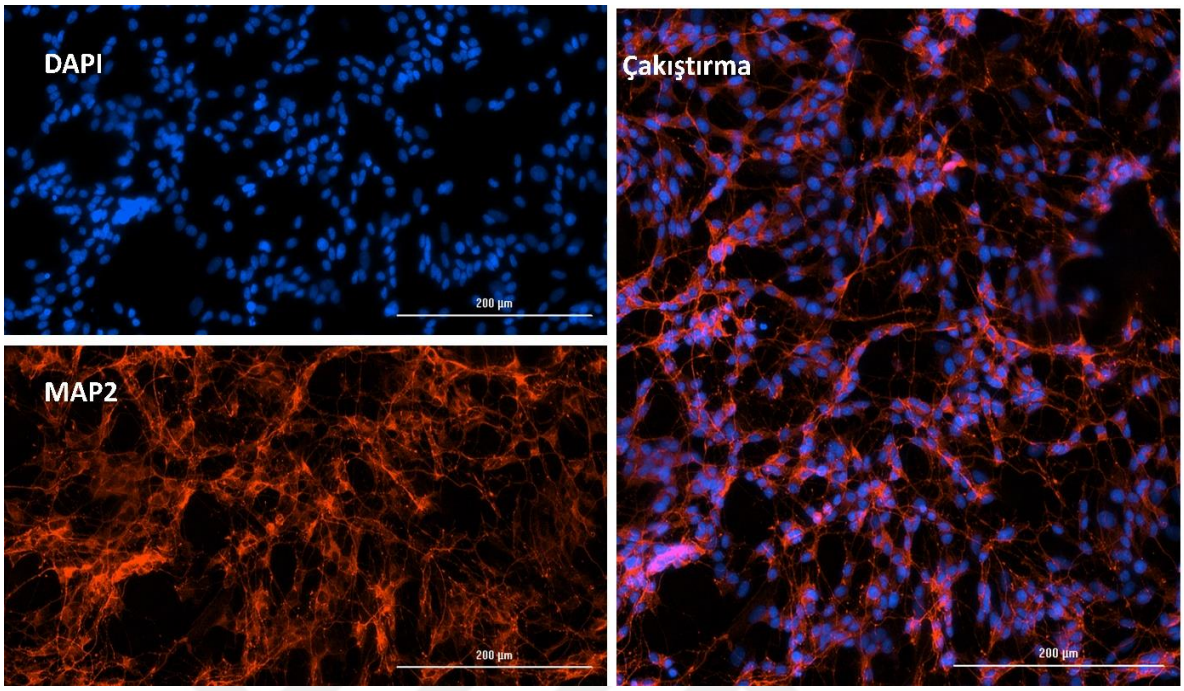
Şekil 4-1: aSyn fibirlizasyonu, floresan boyaması ve fibril kırma işlemlerinin doğrulamaları.

A.ThT test ölçümlerini gösteren grafik. Reaksiyon 10. günde zirve noktasına ulaşmıştır. 11. günde reaksiyon sonlandırıldı. **B.**Fibril kırma işlemi sonrası f-aSyn-488'in floresan mikroskobundaki görüntüsü. Büyütme 20X. **C.** Fibrilizasyon reaksiyonunun 6. gününde alınan örneğin anti-aSyn antikoru ile işaretlendiği WB görüntüsü. Farklı molekül ağırlığında aSyn işaretlemeleri gerçekleşmiştir.

4.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

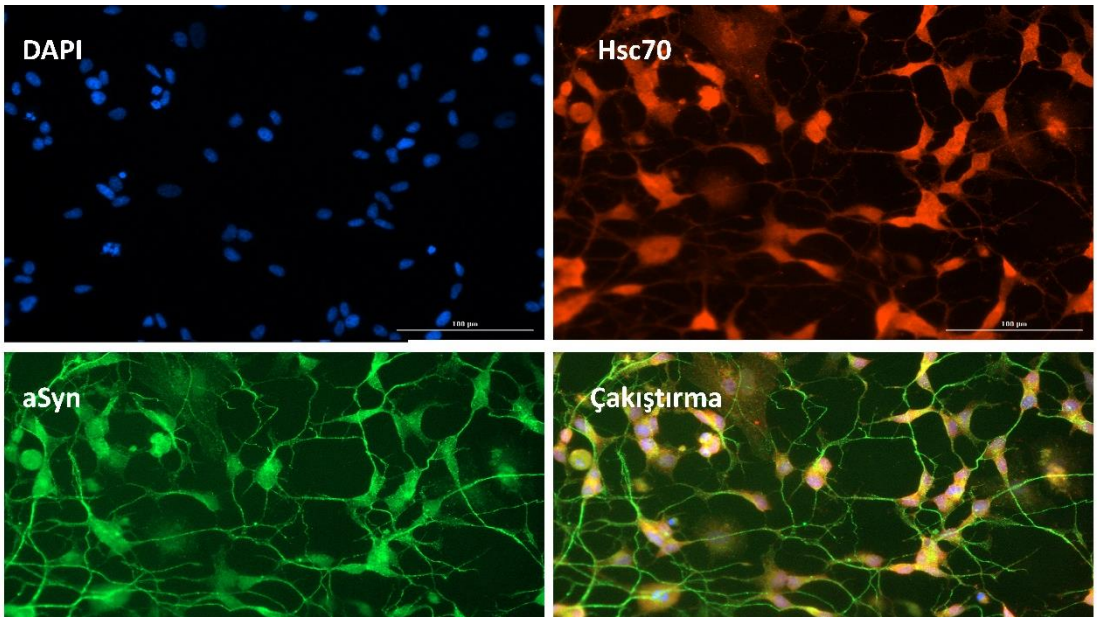
Çalışmada kullanılan nörona farklılaştırma protokolünün başarısı morfolojik olarak hücrelerin nöronal uzantılar sergilemesiyle ve bir nöron belirteci olan mikrotübül ilişkili protein 2 (MAP2) proteininin immünfloresan yöntemi ile işaretlenmesiyle gösterildi (Şekil 4-2).

Farklılaştırmanın doğrulanmasının ardından, N-SH hücrelerindeki endojen aSyn ve Hsc70 proteinlerinin immünfloresan yöntemiyle işaretlemeleri yapıldı ve floresan mikroskopta görüntülendi (Şekil 4-3). Hücrelerin aSyn ve Hsc70 eksprese ettiği ve uzantılarında da söz konusu proteinlerin bulunduğu gösterildi. Ayrıca, fizyolojik koşullarda N-SH hücrelerinde Hsc70 ve aSyn'nin bir arada bulunabileceği saptandı.



Şekil 4-2: N-SH hücrelerinde nöron belirteci olan MAP2 işaretlemesi ve hücre uzantılarının görüntüsü.

Büyütme 4X.

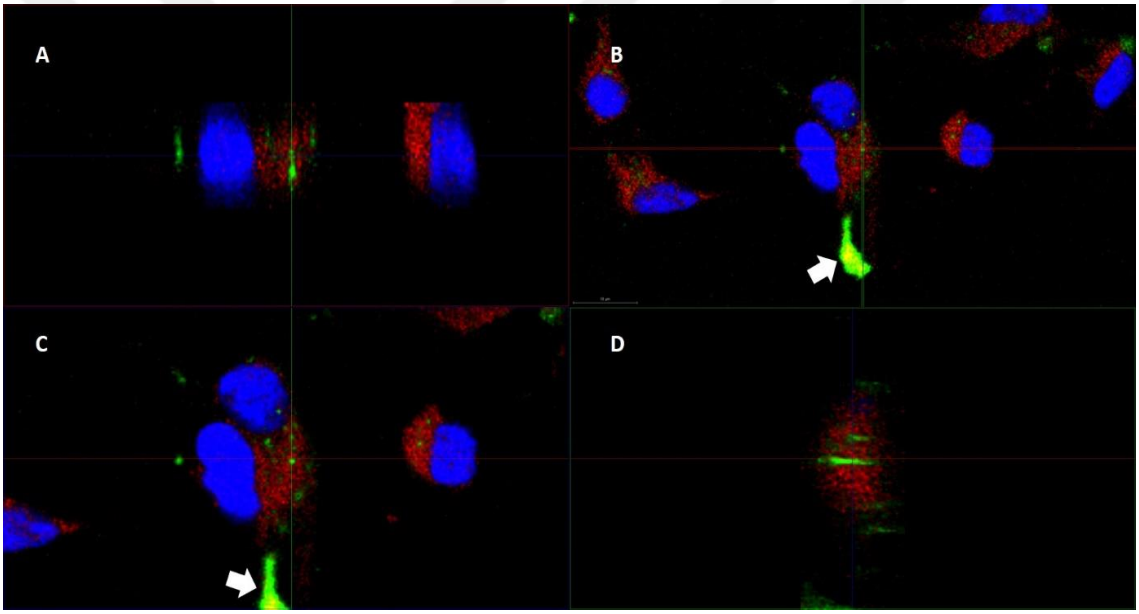


Şekil 4-3: N-SH hücrelerinde Hsc70 ve aSyn işaretlemeleri.

Büyütme 20X.

4.3. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçine Alınması

Farklı petrilerde kültüre edilen N-SH hücreleri, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat f-aSyn-488 ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi biten hücreler fikse edildi. Fikse edilen hücreler, bir nöron belirteci olan MAP2 proteini ile işaretlendikten sonra konfokal mikroskobunda incelendi. Konfokal mikroskobunda hücrenin farklı katmanlarının görüntülenmesine olanak sağlayan Z-yığınlama tekniği ile f-aSyn-488'in hücrenin içinde bulunup bulunmadığı saptanabildi. F-aSyn-488'le 3 saat inkübe edilen hücrelerde f-aSyn-488'in hücre içinde olduğu belirlendi (Şekil 4-4). Buna göre ilk 3 saatlik inkübasyonda f-aSyn hücre içine alınmaktadır. Uzantılarda yeşil floresan sinyal tespit edilmediğinden, ilk 3 saatte f-aSyn-488'in büyük oranda hücre gövdesinde toplandığı saptanmıştır.



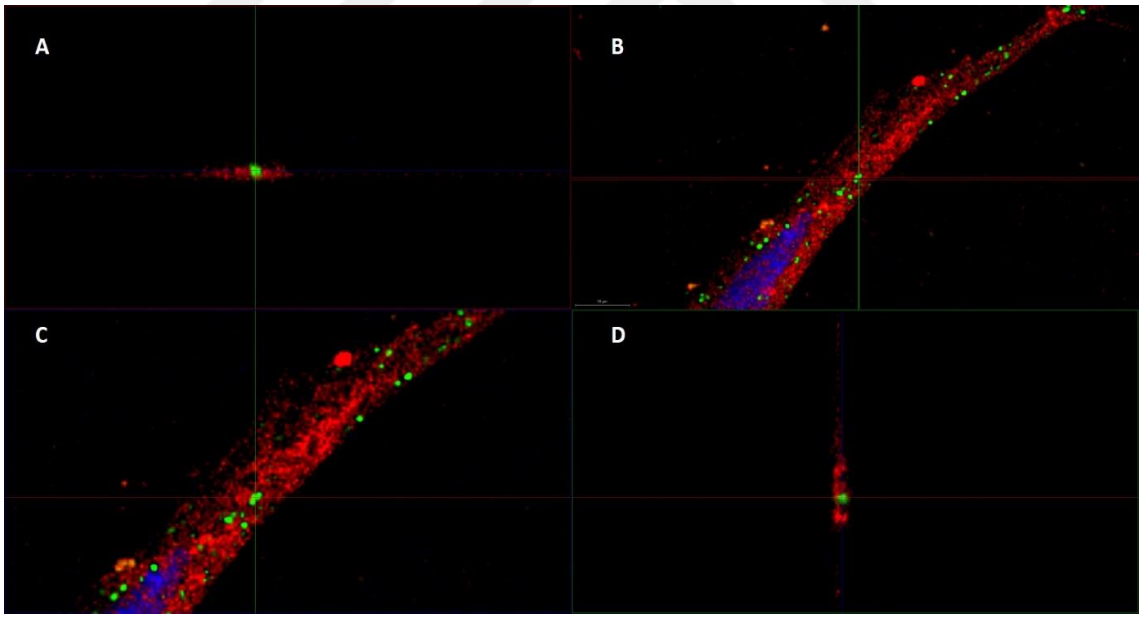
Şekil 4-4: 3 saat f-aSyn-488 inkübasyonu yapılan N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntülemesi.

Farklı açılardan çekilen aynı bölgenin görüntülerine göre f-aSyn-488 (yeşil) hücre içindedir (**D**). Hücre içine giremeyecek boyuttaki f-aSyn plakları beyaz ok ile gösterildi. Büyütme 60X. (MAP2: kırmızı, nükleus:mavi)

F-aSyn-488'in 6 saat inkübasyonun ardından hücre içinde bulunmaya devam ettiği, ancak 6 saatlik inkübasyonda 3 saatlik inkübasyona göre daha fazla f-aSyn-488 girişinin olduğu belirlendi (Şekil 4-5). Öte yandan f-aSyn'nin ilk 3 saatte olduğu gibi hücre gövdesinde toplandığı görüldü. F-aSyn'e bağlı gelişen şaperon ekspresyon değişimlerinin çalışılması karar verilen ilk inkübasyon zaman aralığı 6 saat olarak seçildi.

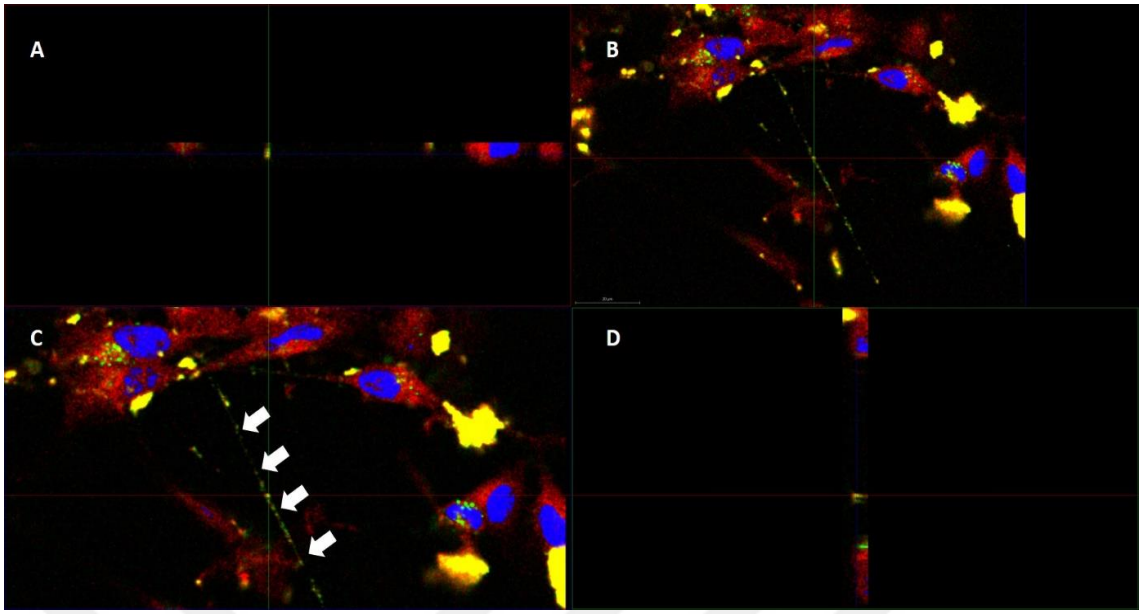
9 saatlik inkübasyonda f-aSyn-488, hücre içinde gövdede ve uzantılarda görüldü (Şekil 4-6). Gövdedekilere oranla uzantılarda görülen fibriller, küçük noktalar şeklindedir. Bu nedenle 9. saatten itibaren fibrillerin taşınıyor olabileceği değerlendirilmiştir.

12. saatte f-aSyn-488, 9 saat inkübe edilenler gibi hücre gövdesinde ve uzantılarında tespit edildi (Şekil 4-7). Yine 9 saat inkübe edilenlerde olduğu gibi fibriller küçük noktalar halinde görüntülendi. Uzantılardaki fibrillerin "boncuk taneleri" gibi ard arda dizili olması bu aşamada f-aSyn'nin aktif şekilde taşınıyor olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, f-aSyn'le birlikte taşınan şaperonlar varsa, 12. saatte f-aSyn'ye bağlı olarak taşınmalıdır. Bu sebeple, taşınımı sırasında f-aSyn'ye bağlı olan şaperonların 12 saat f-aSyn inkübasyonundan sonra yapılan IP ile incelenmesi kararlaştırıldı. Ayrıca, f-aSyn'e bağlı gelişen şaperon ekspresyon değişimlerinin çalışılması karar verilen ikinci inkübasyon zaman aralığı da 12 saat olarak seçildi. Öte yandan, 24. saatte hücre içinde f-aSyn-488 tespit edilmemiştir.



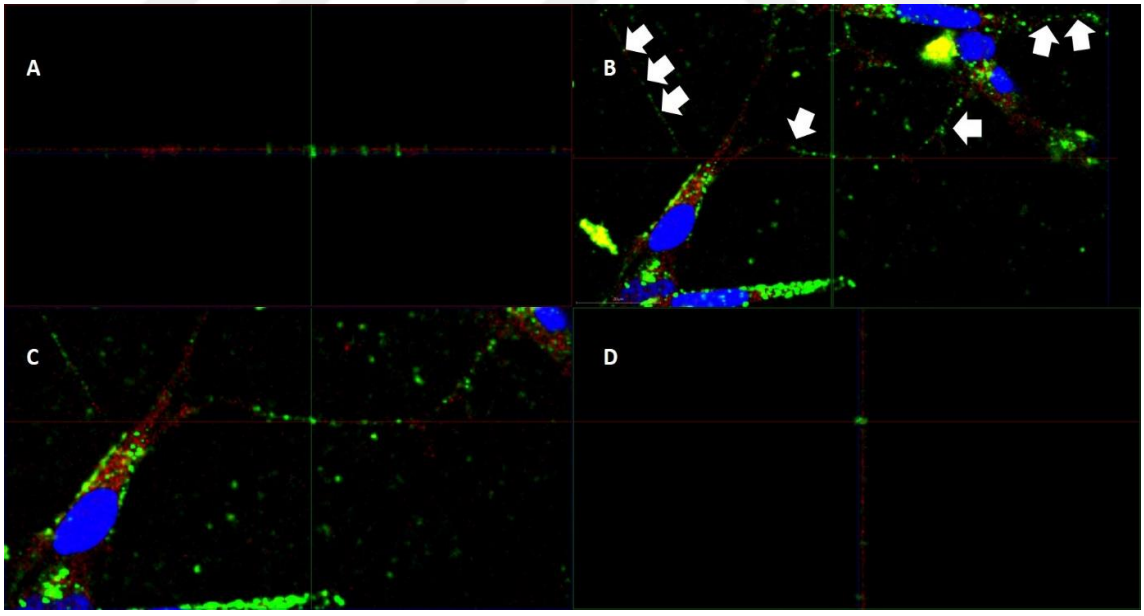
Şekil 4-5: 6 saat f-aSyn-488 inkübasyonu gerçekleştirilen N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntüsü.

Aynı bölgenin farklı açılardan çekilen görüntüleri analiz edildiğinde f-aSyn-488 (yeşil) hücre içinde görünmektedir (D). Büyütme 60X. (MAP2: kırmızı, nükleus:mavi)



Şekil 4-7: 9 saat f-aSyn-488 inkübasyonu gerçekleştirilen N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntüsü.

Farklı açılardan alınan aynı bölgenin görüntülerine göre uzantılardaki f-aSyn-488 (yeşil) hücre içerisinde görülmektedir (D). Büyütme 60X. Uzantılardaki f-aSyn488 beyaz oklar ile işaretlenmiştir. (MAP2: kırmızı, nükleus:mavi)



Şekil 4-6: 12 saat f-aSyn-488 inkübasyonu gerçekleştirilen N-SH hücrelerinde MAP2 ve f-aSyn-488'in konfokal mikroskobu görüntüsü.

Bu aşamada uzantılardaki f-aSyn-488 (yeşil) miktarı artmıştır ve boncuk taneleri gibi ard arda dizilidir (**B**). Beyaz oklar: Seçilen uzantıdaki ard arda sıralı F-aSyn488 işaretlenmesi. Farklı açılardan alınan aynı bölgenin görüntülerine göre uzantılardaki f-aSyn-488 hücre içerisinde görünmektedir (**D**). Büyütme 60X. (MAP2: kırmızı, nükleus:mavi)

4.4. Hücre İçi Şaperon Ekspresyonunun Fibriler Alfa-Sinüklein Uygulamasına ve Zamana Bağlı Değişimi

Konfokal mikroskobunda elde edilen bulgular, şaperonların ekspresyon analizlerinin yapılmasında rehber olarak kullanıldı. Buna göre, f-aSyn'nin hücrelerin içinde baskın şekilde bulunduğu ilk 6 saatte ve hücresel uzantılarda görüldüğü sonraki 6 saatte, hücrelerin f-aSyn'ye karşı verdiği şaperon cevabı nedir sorusuna yanıt arandı. Bu amaçla, N-SH hücreleri 6 ve 12 saat boyunca f-aSyn ile inkübe edildi. Aynı zaman aralıklarında uygulama yapılmayan N-SH hücreleri kontrol grubu olarak inkübe edildi. Ardından hücrelerden total protein izolasyonları yapıldı. Total protein örneklerinden WB ile Hsc70; ve DB ile Hsp27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, HSPA4, Hsp90, GRP75, ubikitin ve Hsp10 şaperonlarının hücre içi seviyeleri analiz edilip (Şekil 4-8) ölçümler alındı. Alınan ölçümlerin istatistiksel analizleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 4-9, Şekil 4-10 ve Şekil 4-11). Verilerin istatistiksel analizi, aynı zaman aralığında gruplar arasındaki farkın anlamlılığını ve grupların kendi içindeki zamana bağlı değişiminin anlamlılığını sorgulayarak iki farklı şekilde gerçekleştirildi.

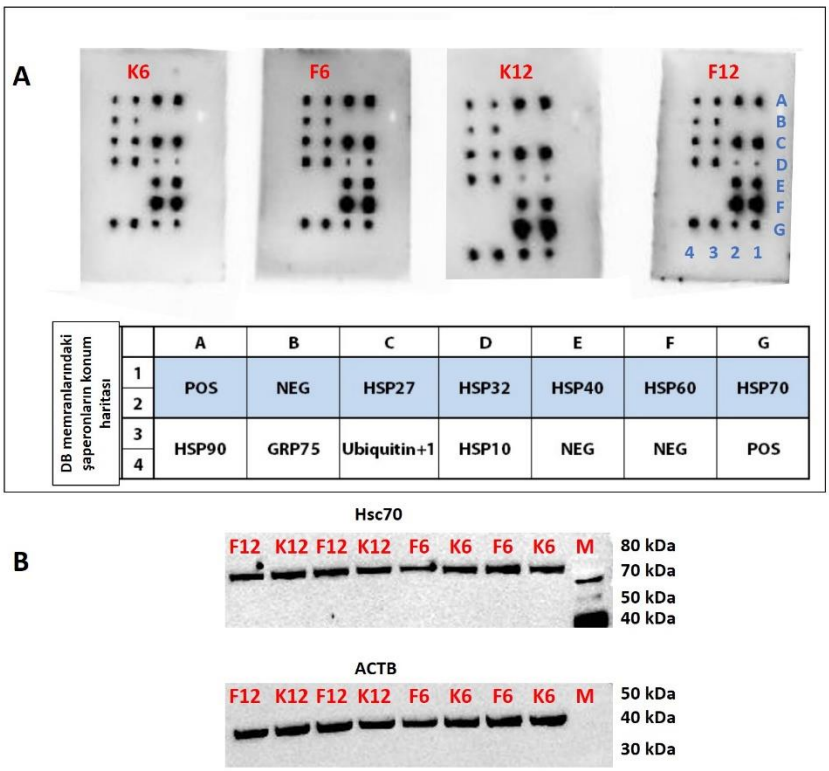
Kontrol ve fibril uygulama grupları karşılaştırıldığında**, Hsp27** seviyesi 6 ve 12 saatlik f-aSyn uygulamasına bağlı olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi ($p>0,05$). Kontrol grubunda 6 ve 12 saatlik ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında zamana bağlı olarak anlamlı bir değişiklik belirlenmedi ($p>0,05$). F-aSyn uygulanan hücrelerde de zamana bağlı olarak anlamlı bir değişiklik belirlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 4-9).

Hsp32 (HMOX1) hücre içi seviyesinde 6 saatlik f-aSyn uygulamasına bağlı olarak gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). Diğer yandan, 12 saat süre içerisinde kontrol grubunda şaperonun hücre içi seviyesi f-aSyn uygulanan hücrelere göre anlamlı ölçüde arttı ($p<0,009$). Zamana bağlı değişimler incelendiğinde, kontrol grubu hücrelerinde Hsp32 seviyesinin 12. saatte 6. saate göre anlamlı ölçüde arttığı ($p<0,005$), ancak f-aSyn uygulanan hücrelerde 6 ve 12. saatlerde şaperonun hücre içi seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 4-9).

Hsp40 (DNAjB5) ekspresyonu 6 saatlik f-aSyn uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artarken ($p<0,009$), 12 saatlik f-aSyn uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azaldı ($p<0,05$). Kontrol grubunda zamana

bağlı olarak şaperonun hücre içi seviyesinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05). Diğer yandan, 12 saat boyunca f-aSyn ile inkübe edilen hücrelerde şaperonun hücre içi seviyesinin 6 saat inkübe edilenlere kıyasla anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi (p<0,0008) (Şekil 4-9).

Hsp60 seviyesi, 6 saat inkübe edilen hücrelerde gruplar arasında anlamlı bir fark göstermezken (p>0,05), 12 saat f-aSyn uygulanan hücrelerde anlamlı ölçüde düştü (p<0,03). Zamana bağlı değişim incelendiğinde, şaperonun hücre içi seviyesinin 12 saat sonunda 6. saate oranla kontrol ve fibril gruplarında anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi (kontrol için p<0,0001; fibril için p<0,0001) (Şekil 4-9).



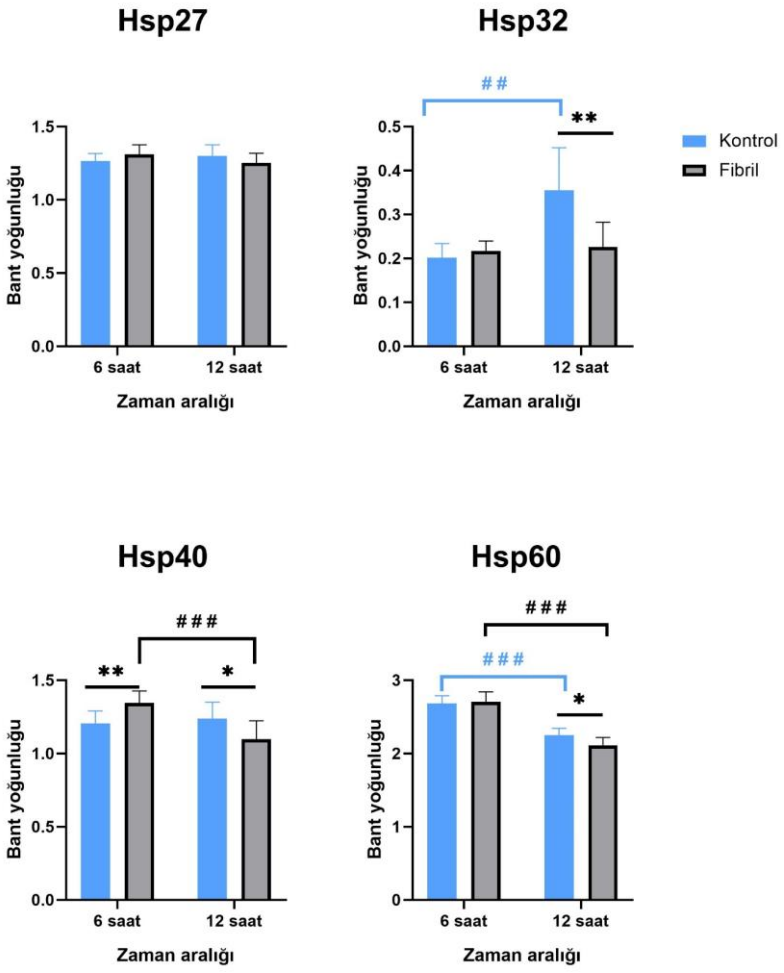
	A	B	C	D	E	F	G
1	POS	NEG	HSP27	HSP32	HSP40	HSP60	HSP70
2							
3	HSP90	GRP75	Ubiquitin+1	HSP10	NEG	NEG	POS
4							

Şekil 4-8: Şaperon ekspresyon analizlerinin DB ve WB deneylerinin görüntüleri.

A.DB membranlarının görüntüsü (üstte) ve şaperonların membranlardaki konumları (altta). Haritadaki konumların membranlardaki yerleşimi F12 membranı üzerinde gösterilmiştir. **B.** Total protein örneklerinde Hsc70 ve referans protein olarak kullanılan ACTB işaretlemeleri. (K6: kontrol 6 saat; F6: fibril uygulama 6 saat; K12: kontrol 12 saat; F12: fibril uygulama 12 saat; M: moleküler belirteç)

HSPA4 seviyesi 6 saat inkübasyonda gruplar arasında anlamlı bir değişim göstermedi. 12 saatlik inkübasyonda f-aSyn uygulanan hücrelerde şaperonun hücre içi

seviyesinin anlamlı şekilde değiştiği belirlendi (p<0,002). Zamana bağlı olarak her iki grupta da HSPA4 seviyesinin 12. saatte 6. saate göre düştüğü görüldü. Ancak, kontrol grubundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değilken (p>0,05), f-aSyn uygulanan hücrelerdeki düşüşün anlamlı olduğu belirlendi (p<0,0006) (Şekil 4-10).

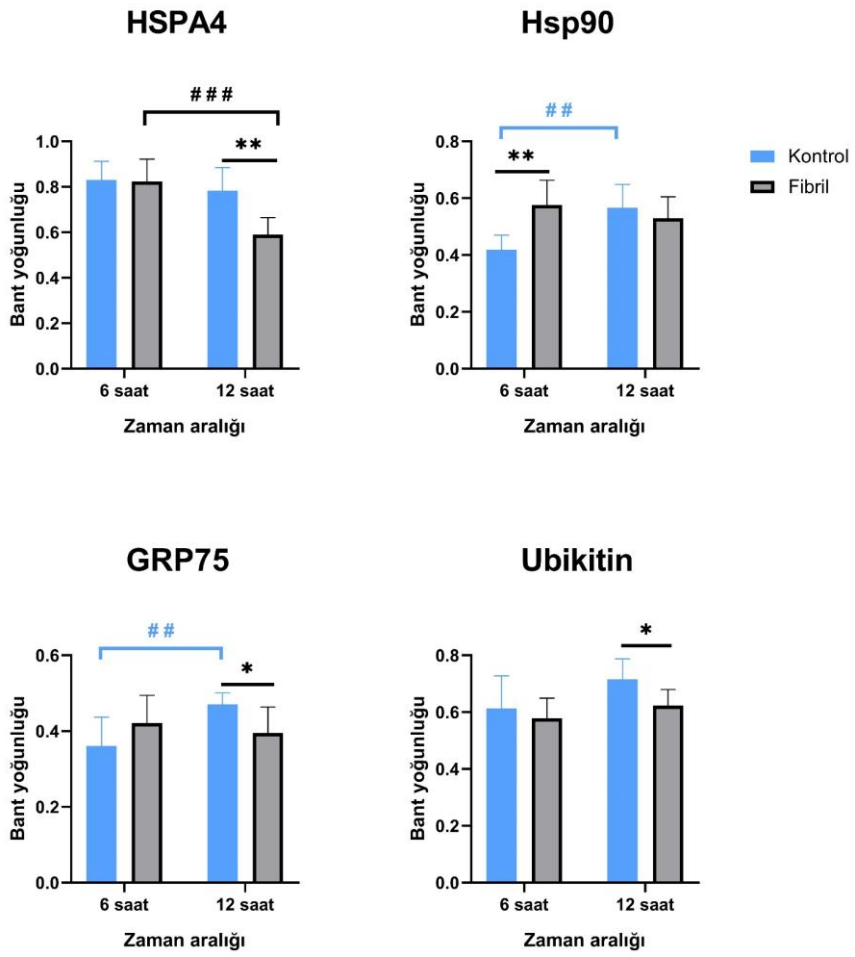


Şekil 4-9: Hsp27, Hsp32, Hsp40 ve Hsp60 şaperonlarının hücre içi seviyelerindeki değişim.

: kontrol ve fibril grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı. #: kontrol 6 saat - kontrol 12 saat ve fibril 6 saat – fibril 12 saat karşılaştırmasında fark istatistiksel olarak anlamlı. (ve #: p<0.05; ** ve ##: p<0.01; *** ve ###: p<0.001)

Hsp90 seviyesi, 6 saat f-aSyn inkübasyonu yapılan hücrelerde 6. saat kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artış gösterdi (p<0,002). Diğer yandan, 12. saatte gruplar

arasındaki ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). Şaperonun hücre içi seviyesinde zamana bağlı gerçekleşen değişimler incelendiğinde, f-aSyn uygulanan hücrelerdeki Hsp90 seviyesi 6. saatten 12. saate anlamlı bir değişiklik göstermezken (p>0,05), kontrol grubunda Hsp90 seviyesi 12. saatte 6. saate göre anlamlı ölçüde artış gösterdi (p<0,002) (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: HSPA4, Hsp90, GRP75 ve ubikitinin hücre içi seviyelerindeki değişim.

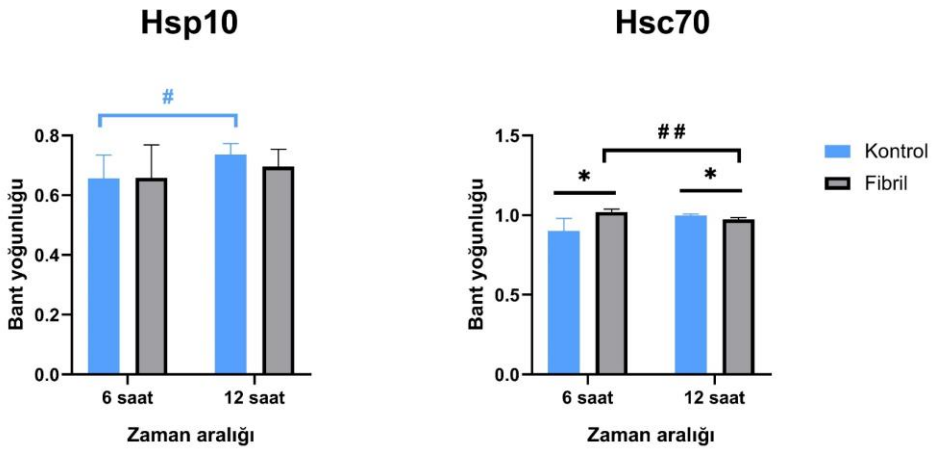
: kontrol ve fibril grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı. #: kontrol 6 saat - kontrol 12 saat ve fibril 6 saat – fibril 12 saat karşılaştırmasında fark istatistiksel olarak anlamlı. (ve #: p<0.05; ** ve ##: p<0.01; *** ve ###: p<0.001)

GRP75 seviyesinde ilk 6 saatte gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı (p>0,05). 12 saat inkübasyon verileri incelendiğinde, f-aSyn uygulanan hücrelerdeki

GRP75 ekspresyonu uygulama yapılmayan hücrelerdekine göre anlamlı seviyede düşüş gösterdi ($p<0,03$). Grupların kendi içindeki zamana bağlı değişimi incelendiğinde, 6 ve 12 saat f-aSyn uygulanan hücrelerde şaperonun hücre içi seviyesindeki değişim anlamlı değilken, kontrol grubunda 12. saatte 6. saate göre anlamlı ölçüde artış gösterdi ($p<0,007$) (Şekil 4-10).

Ubikitin seviyesi 6. saatte gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi ($p>0,05$). Diğer yandan, 12. saatte kontrol f-aSyn uygulanan hücrelerdeki ubikitin seviyesindeki fark anlamlı bulundu ($p<0,02$). Grupların kendi içinde zamana bağlı değişimleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-10).

Hsp10 seviyesinde uygulamaya bağlı olarak herhangi bir değişiklik saptanmadı ($p>0,05$). Gruplar zamana bağlı olarak kendi içinde değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 12. saatte 6. saate göre anlamlı bir artış görüldü ($p<0,03$). 6 saat ve 12 saat f-aSyn uygulanan hücrelerin Hsp10 hücre içi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: Hsp10 ve Hsc70 şaperonlarının hücre içi seviyelerindeki değişim.

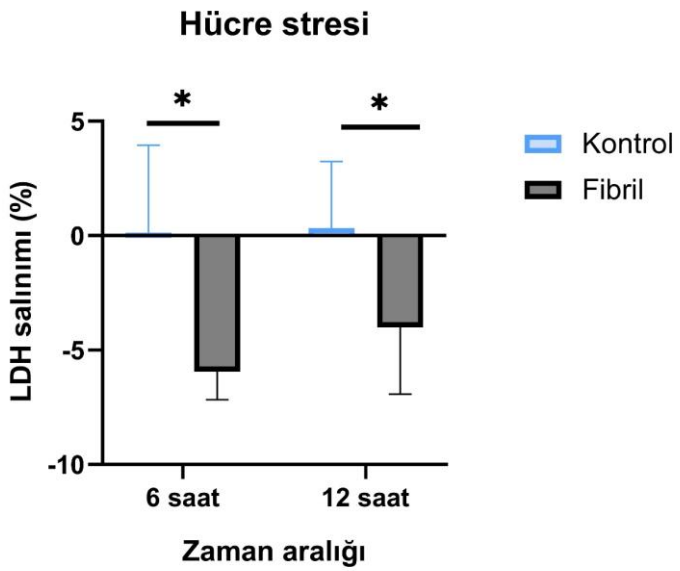
: kontrol ve fibril grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı. #: kontrol 6 saat - kontrol 12 saat ve fibril 6 saat – fibril 12 saat karşılaştırmasında fark istatistiksel olarak anlamlı. (ve #: $p<0.05$; ** ve ##: $p<0.01$; *** ve ###: $p<0.001$)

Hsc70 ekspresyonu, 6 saat f-aSyn uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,03$). Diğer yandan, 12 saat f-aSyn uygulanan hücrelerde, Hsc70 seviyesi

kontrole göre anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,02). Gruplar zamana bağlı olarak kendi içinde değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki 6 ve 12. saatlerdeki hücre içi seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermezken (p>0,05), f-aSyn uygulanan hücrelerde şaperonun 12. saatteki hücre içi seviyesinin 6. saatteki seviyesine göre anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi (p<0,002) (Şekil 4-11).

4.5. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücresel Stres Seviyesine Etkisi

Şaperon ekspresyon analizleri için oluşturulan hücre kültürlerinden total protein izolasyonu öncesi hücre kültür üst sıvısı toplandı. Üst sıvıdaki LDH salınımın yüzdesine bakılarak hücrelerin maruz kaldıkları sitotoksisite ölçüldü. 6. saatteki LDH salınımı kontrol grubunda %0,14, fibril grubunda %-5,4 olarak hesaplandı. 6. Saatte gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,03). Ayrıca, 12. saatteki LDH salınımı kontrol grubunda %0,33, fibril grubunda %-4 olarak hesaplandı. 12. saatte gruplar arasındaki LDH salınım farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Buna göre, her iki zaman aralığında da f-aSyn uygulanan hücrelerdeki stres seviyesi azalmıştır (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: Gruplar arası LDH salınım seviyelerinin karşılaştırılması.

(*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001)

4.6. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınımında Şaperonların Rolü

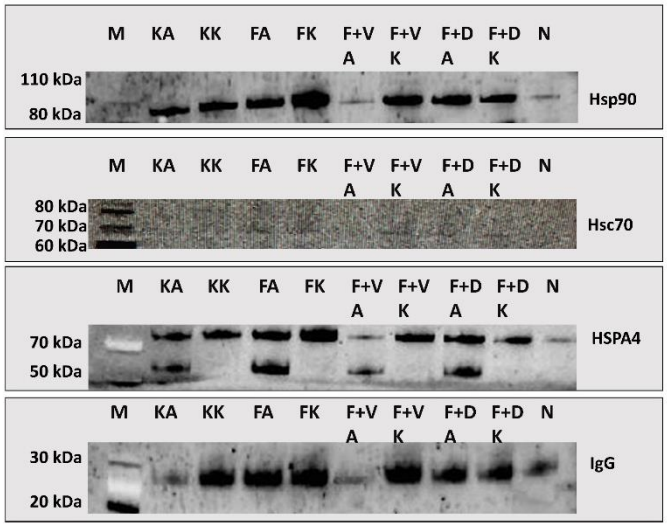
Taşınım analizi için deney grupları bölüm 3.1.3'de açıklandığı şekilde oluşturulmuştur: Kontrol, f-aSyn, fibril+VER, fibril+DMSO. Konfokal mikroskobunda yapılan incelemeler doğrultusunda (Bölüm 4.3) 12. saatte bu gruplardan total hücre lizatı elde edildi. Her deney grubuna ayrı ayrı anti-aSyn veya anti-KLC1 antikorları uygulanarak ko-IP deneyi yapıldı. IP deneyinden elde edilen örnekler kullanılan antikora göre aSyn-IP ve KLC1-IP olarak sınıflandırıldı. aSyn-IP örnekleri deney gruplarına göre kontrol aSyn-IP, fibril aSyn-IP, fibril+VER aSyn-IP ve fibril+DMSO aSyn-IP şeklinde isimlendirildi. Benzer şekilde KLC1-IP örnekleri deney gruplarına göre kontrol-KLC1-IP, fibril KLC1-IP, Fibril+VER KLC1-IP ve Fibril+DMSO KLC1-IP olarak isimlendirildi. Ayrıca IP örneklerinin kontrolü olarak negatif-IP örneği de oluşturuldu. IP örnekleri WB ve DB ile analiz edildi. WB ile Hsc70, HSPA4 ve Hsp90 şaperonları analiz edildi; DB ile Hsp27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, HSPA4, Hsp90, GRP75, ubikitin ve Hsp10 şaperonları analiz edildi ve ölçümler alındı. İstatistiksel analizleri aşağıda sunulan bulgular göre Hsc70 haricindeki tüm şaperonlar aSyn ve KLC1 ile bağlanmaktadır.

4.6.1. Western Blot Bulguları

IP örneklerinin WB deneyinde Hsc70 işaretlemesinden ölçülebilir bir görüntü elde edilemedi. Bu nedenle, Hsc70 görüntülemesinin istatistiksel analizi yapılmadı. IP örneklerinin HSPA4 ve Hsp90 WB analizleri gerçekleştirildi ve ölçümler alındı (Şekil 4-13). Buna göre, HSPA4 ve Hsp90'ın hem aSyn hem de KLC1 ile bağlandığı görüldü. Aşağıdaki bulgular, HSPA4 ve Hsp90 WB görüntülemesinin analiziyle elde edilmiştir (Şekil 4-14).

aSyn-IP örneklerinin HSPA4 ve Hsp90 WB işaretlemelerinin istatistiksel analizlerine göre, şaperonların fibril aSyn-IP örneğindeki bant yoğunlukları, kontrol aSyn-IP örneğindekilere göre anlamlı ölçüde düşük bulundu (HSPA4 ve Hsp90 için $p<0,05$). Diğer taraftan, iki şaperonun da fibril aSyn-IP örneğindeki bant yoğunluklarıyla fibril+VER aSyn-IP örneklerindeki bant yoğunlukları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (HSPA4 ve Hsp90 için $p>0,05$). Şaperonların fibril+VER aSyn-IP örneğindeki bant yoğunlukları fibril+DMSO aSyn-IP örneğindekilere göre anlamlı ölçüde düşük bulundu (HSPA4 ve Hsp90 için $p<0,05$). Fibril+VER aSyn-IP örneğindeki bant yoğunlukları her iki şaperon için kontrol aSyn-IP örneğindeki bant yoğunluklarından

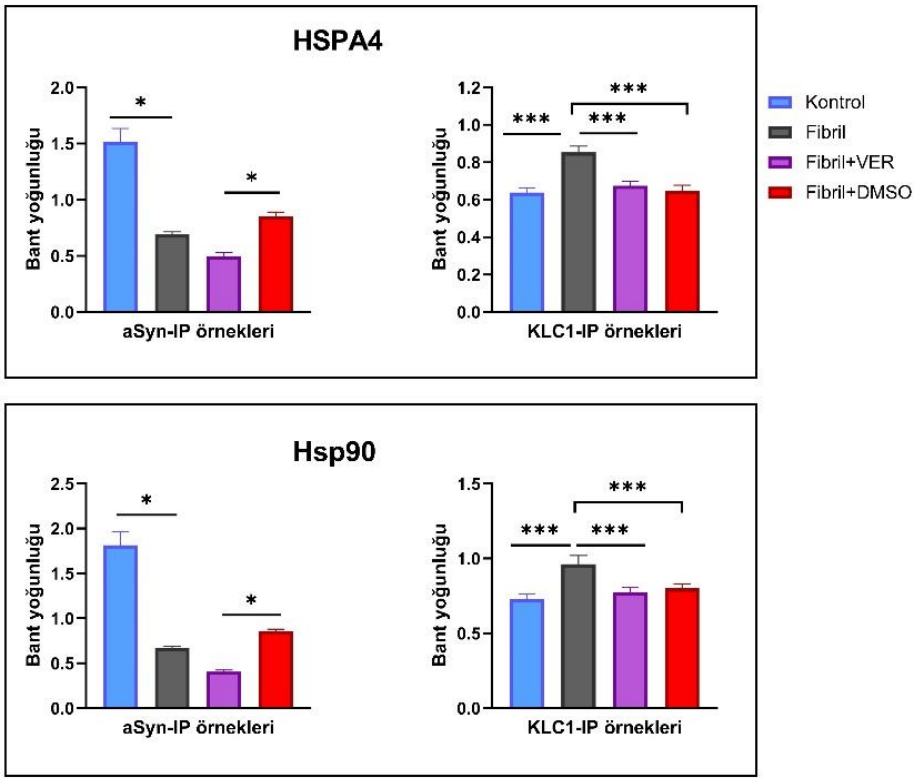
anlamlı ölçüde düşük bulundu (HSPA4 ve Hsp90 için p>0,001). İki şaperon için de kontrol aSyn-IP ve fibril+DMSO aSyn-IP örneklerindeki bant yoğunlukları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (HSPA4 ve Hsp90 için p>0,05) (Şekil 4-14).



Şekil 4-13: IP örneklerinin Hsp90, Hsc70, HSPA4 ve IgG hafif zincir WB işaretlemeleri.

(KA: kontrol aSyn-IP; FA: fibril aSyn-IP; KK: kontrol KLC1-IP; FK; fibril KLC1-IP; F+V A: fibril+VER aSyn-IP; F+V K: fibril+VER KLC1-IP; F+D A: fibril+DMSO aSyn-IP; F+D K: fibril+DMSO KLC1-IP; N: negatif-IP kontrol; M: moleküler belirteç)

KLC1-IP örneklerinin HSPA4 ve Hsp90 WB işaretlemelerinin istatistiksel analizlerine göre, şaperonların fibril KLC1-IP örneğindeki bant yoğunlukları, kontrol KLC1-IP örneğindeki bant yoğunluklarından anlamlı ölçüde fazla bulundu (HSPA4 ve Hsp90 için p<0,001). Her iki şaperon için kontrol KLC1-IP örneğindeki bant yoğunlukları, fibril+VER KLC1-IP ve fibril+DMSO KLC1-IP örneklerindeki bant yoğunluklarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmedi (HSPA4 ve Hsp90 için p>0,05). Diğer yandan, fibril KLC1-IP'deki bant yoğunlukları fibril+VER KLC1-IP'deki bant yoğunluklarından her iki şaperon için anlamlı ölçüde fazla bulundu (HSPA4 ve Hsp90 için p<0,001). Benzer şekilde, fibril KLC1-IP'deki bant yoğunlukları fibril+DMSO KLC1-IP'deki bant yoğunluklarından her iki şaperon için anlamlı ölçüde fazla bulundu (HSPA4 ve Hsp90 için p<0,001). Fibril+VER KLC1-IP ve fibril+DMSO KLC1-IP arasındaki fark iki şaperon için de anlamlı bulunmadı (HSPA4 ve Hsp90 için p>0,05) (Şekil 4-14).

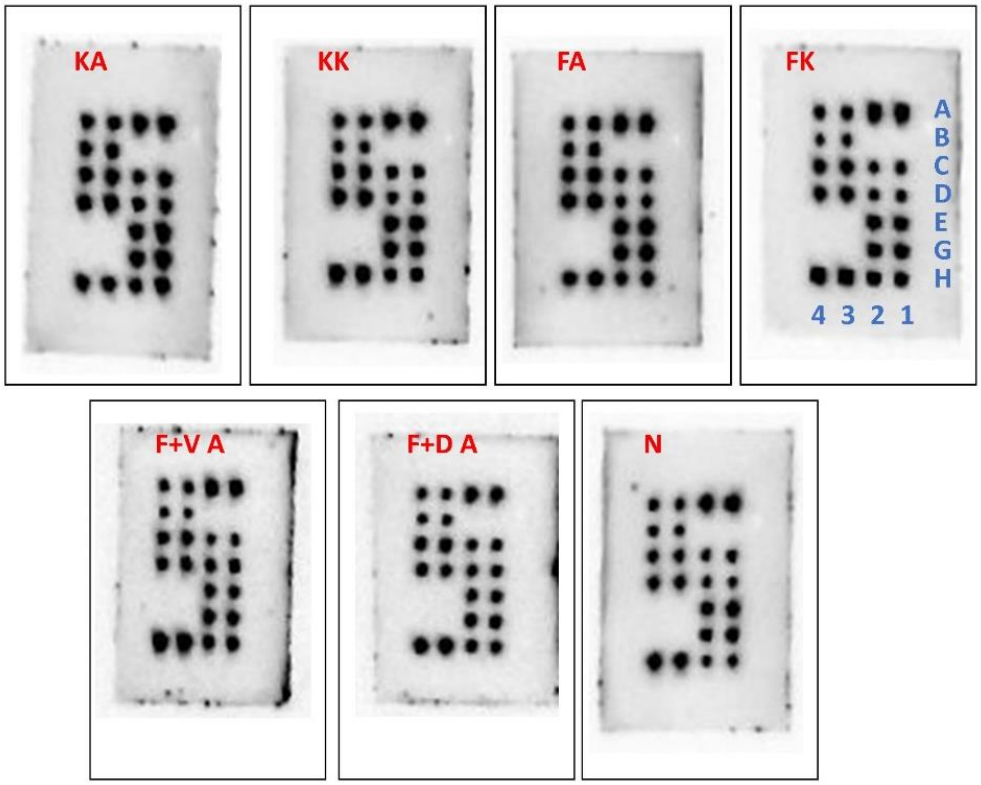


Şekil 4-14: IP örneklerinin WB ölçümlerinden yapılan istatistiksel analizlerin grafikleri.

(*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001)

4.6.2. Dot blot Bulguları

Kontrol aSyn-IP, fibril aSyn-IP, fibril+VER aSyn-IP, fibril+DMSO aSyn-IP, kontrol KLC1-IP, fibril KLC1-IP, negatif kontrol-IP olmak üzere 7 IP grubunun DB analizleri, ölçümler ve istatistiksel analizleri gerçekleştirildi. Kontrol aSyn-IP ve kontrol KLC1-IP örneklerinin DB analizleri, tüm şaperonların aSyn ve KLC1 ile bağlandığını göstermiştir (Şekil 4-15). WB analizlerinde kullanılan "bant yoğunluğu" ifadesi yerine, DB analizinde işaretlemeler için "nokta yoğunluğu" ifadesi kullanıldı. Her bir IP örneğindeki şaperon nokta yoğunlukları ölçülerek negatif-IP membranına oranlanarak işlendi.



Şekil 4-15: IP örneklerinin DB analizindeki membran görüntüleri.

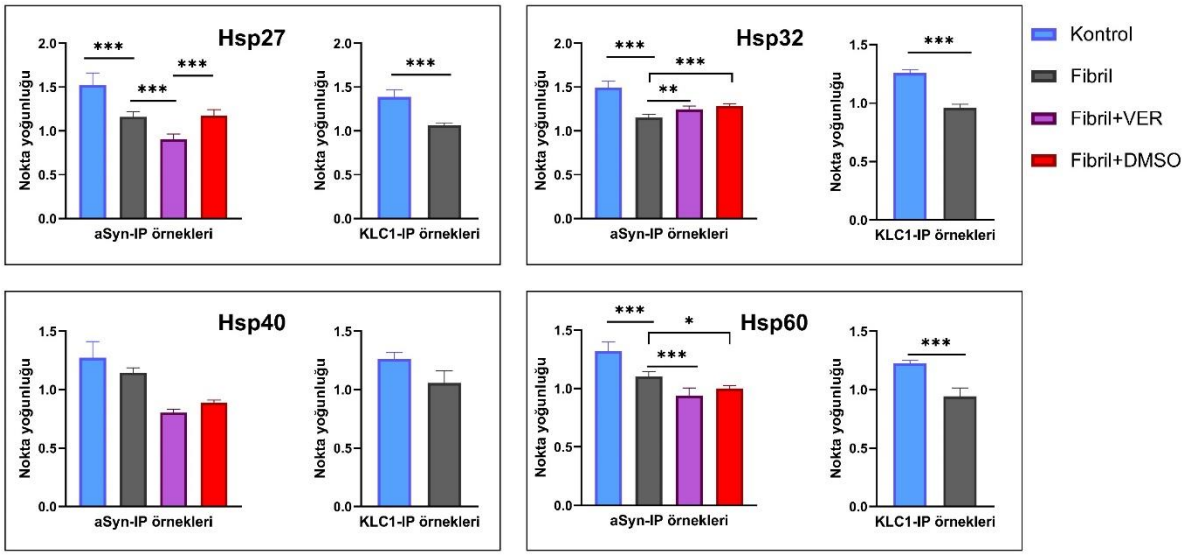
FK membranında Şekil 8A'daki haritaya göre işaretlemeler yapılmıştır. (KA: kontrol aSyn-IP; FA: fibril aSyn-IP; KK: kontrol KLC1-IP; FK; fibril KLC1-IP; F+V A: fibril+VER aSyn-IP; F+V K: fibril+VER KLC1-IP; F+D A: fibril+DMSO aSyn-IP; F+D K: fibril+DMSO KLC1-IP; negatif-IP kontrol).

Hsp27'nin fibril aSyn-IP örneği uygulanan membralardaki nokta yoğunluğunun kontrol aSyn-IP örneğine göre anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi ($p<0,001$). Fibril+VER aSyn-IP örneğindeki Hsp27 nokta yoğunluğu fibril aSyn-IP örneğindekine göre anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi ($p<0,001$). Fibril aSyn-IP ve fibril+DMSO aSyn-IP örneklerindeki Hsp27 nokta yoğunluğu karşılaştırıldığında fark anlamlı değildir ($p>0,05$). Diğer yandan, Fibril KLC1-IP'deki Hsp27 nokta yoğunluğunun kontrol KLC1-IP'deki nokta yoğunluğuna göre anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4-16).

Fibril aSyn-IP'deki **Hsp32** nokta yoğunluğunun, kontrol aSyn-IP'ye oranla anlamlı ölçüde azaldığı belirlendi ($p<0,001$). Fibril aSyn-IP'deki Hsp32 nokta yoğunluğu, fibril+VER aSyn-IP'deki nokta yoğunluğuna göre anlamlı ölçüde arttı ($p<0,02$). Fibril aSyn-IP'deki Hsp32 nokta yoğunluğunun fibril+DMSO aSyn-IP'deki

nokta yoğunluğuna göre anlamlı ölçüde düştüğü saptandı (p<0,001). KLC1-IP örneklerindeki Hsp32 bant yoğunlukları karşılaştırıldığında, fibril KLC1-IP'de kontrol KLC1-IP'ye göre anlamlı düşüş belirlendi (p<0,001) (Şekil 4-16). **Hsp40** nokta yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (tüm karşılaştırmalar için p>0,05) (Şekil 4-16).

Hsp60 nokta yoğunluğu, fibril aSyn-IP örneğinde kontrol aSyn-IP'dekine göre (p<0,001); Fibril+VER aSyn-IP'deki Hsp60 bant yoğunluğu, fibril aSyn-IP'deki bant yoğunluğuna göre (p<0,001); Fibril aSyn-IP'deki bant yoğunluğu fibril+DMSO aSyn-IP'dekine göre (p<0,05) ve KLC1-IP örneklerinde, fibril KLC1-IP'deki bant yoğunluğu kontrol KLC1-IP'ye göre anlamlı ölçüde azaldı (p<0,001) (Şekil 4-16).

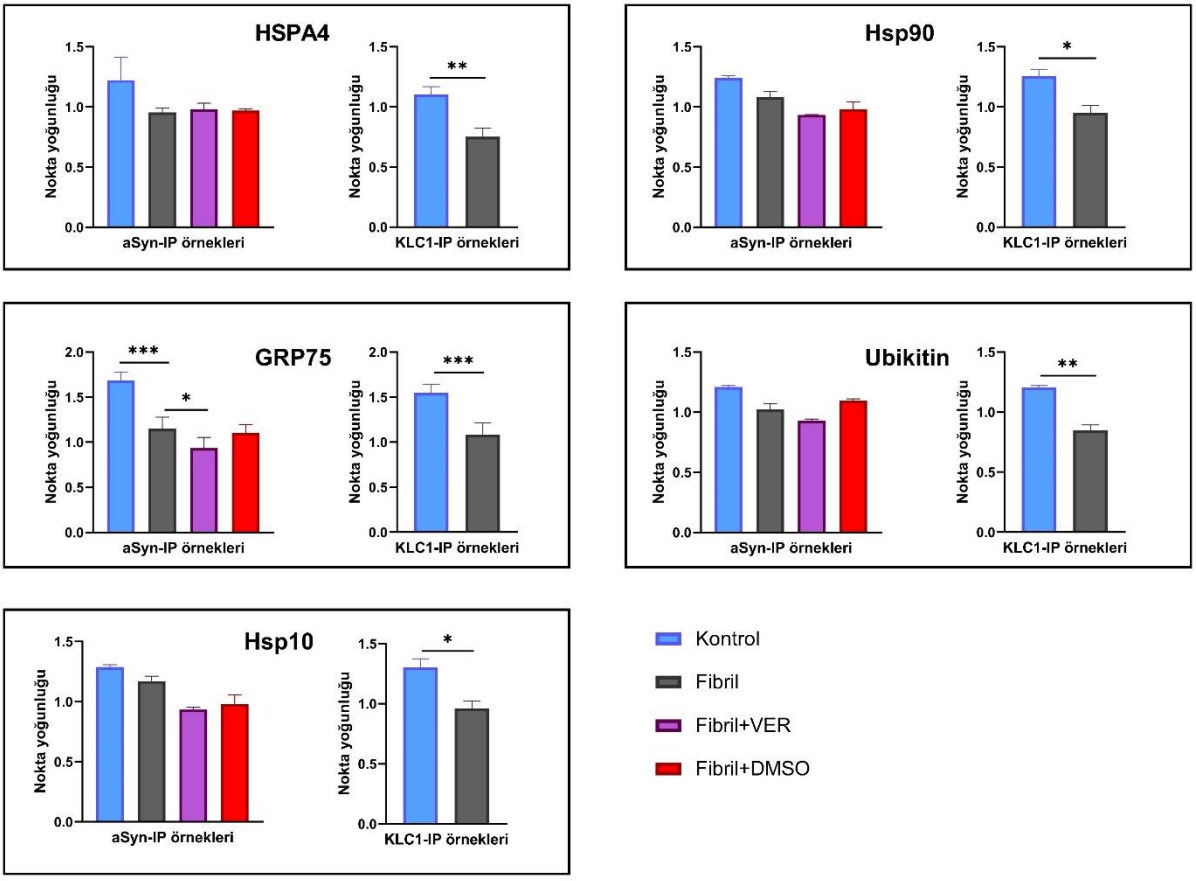


Şekil 4-16: IP örneklerindeki Hsp27, Hsp32, Hsp40 ve Hsp60 şaperonlarının DB ölçümlerinin istatistiksel analiz sonuçları.

(*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001)

HSPA4 ve **Hsp90** nokta yoğunlukları aSyn-IP örneklerinde gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedi (HSPA4 ve Hsp90 tüm aSyn-IP karşılaştırmalarında p>0,05). Diğer yandan, KLC1-IP örneklerinde gruplar arası karşılaştırmada anlamlı değişiklikler belirlendi. Buna göre, HSPA4 ve Hsp90'ın kontrol KLC1-IP örneğindeki nokta yoğunlukları, fibril KLC1-IP örneklerindeki nokta yoğunluklarına göre anlamlı ölçüde düşmüştür (HSPA4 için p<0,01; Hsp90 için p<0,05) (Şekil 4-17).

GRP75'in kontrol aSyn-IP'deki nokta yoğunluğu fibril aSyn-IP örneğindekine göre anlamlı ölçüde azaldı ($p<0,001$). Fibril+VER aSyn-IP örneğindeki GRP75 nokta yoğunluğu fibril aSyn-IP'deki ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi ($p<0,05$). Fibril+DMSO aSyn-IP ve fibril aSyn-IP örneklerinin Grp75 nokta yoğunlukları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Fibril KLC1-IP örneğindeki GRP75 nokta yoğunluğu kontrol KLC1-IP örneğindekine göre anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: IP örneklerindeki HSPA4, Hsp90, GRP75, ubikitin ve Hsp10 şaperonlarının DB ölçümlerinin istatistiksel analiz sonuçları.

(*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001)

aSyn-IP örneklerinde, **Ubikitin** ve **Hsp10** bant yoğunluklarının gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (ubikitin ve Hsp10 tüm aSyn-IP karşılaştırmalarında $p>0,05$). KLC1-IP örnekleri incelendiğinde, her iki

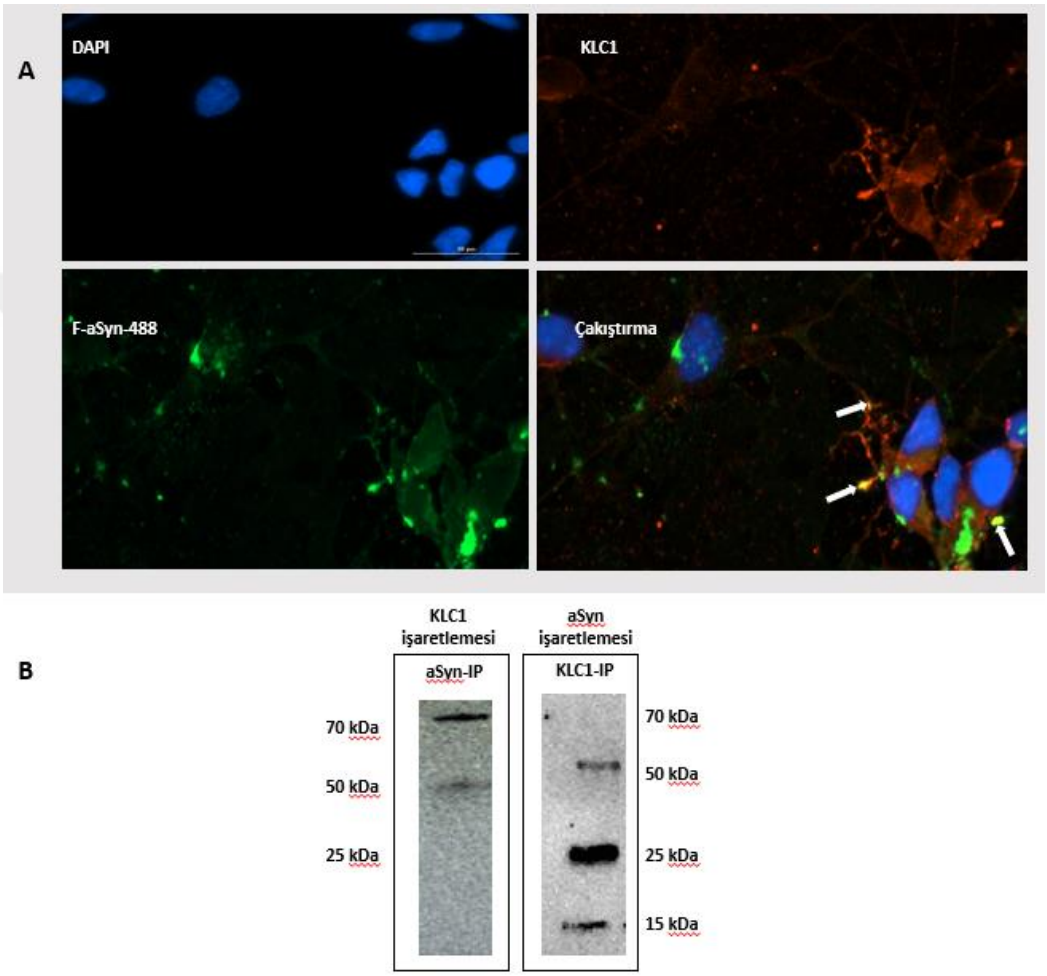
şaperonun fibril KLC1-IP örneğindeki bant yoğunlukları kontrol KLC1-IP'dekilere göre anlamlı ölçüde azalmıştır (Ubikitin için $p<0,01$; Hsp10 için $p<0,05$) (Şekil 4-17).

Özetle, yukarıda detayları sunulan DB analizlerine göre, N-SH hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmaksızın tüm şaperonların aSyn ve KLC1 ile bağlandığı belirlendi. Hücrelere f-aSyn uygulandığında sadece Hsp32, Hsp60 ve GRP75 şaperonlarının aSyn ile bağlanma seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüş görüldü. Öte yandan f-aSyn uygulanan hücrelerde Hsp40 hariç tüm şaperonların KLC1 ile bağlanma seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir azalma olduğu belirlendi. Fibril+VER uygulaması yapıldığında Hsp27 Hsp60 ve GRP75 şaperonlarının aSyn ile bağlanma seviyesi sadece fibril uygulanan hücrelere göre anlamlı ölçüde düşüş gösterdi. Öte yandan, istisnai olarak f-aSyn+VER uygulandığında şaperonlar içinde sadece Hsp32'nin aSyn bağlanma seviyesi fibril uygulanan hücrelere göre anlamlı ölçüde artış gösterdi. Şaperonlar içinde sadece Hsp40'ın aSyn ve KLC1 ile bağlanma seviyesinde uygulama veya kontrol grupları arasında anlamlı bir değişiklik göstermedi.

4.7. IP Deneylerinin Doğrulamaları

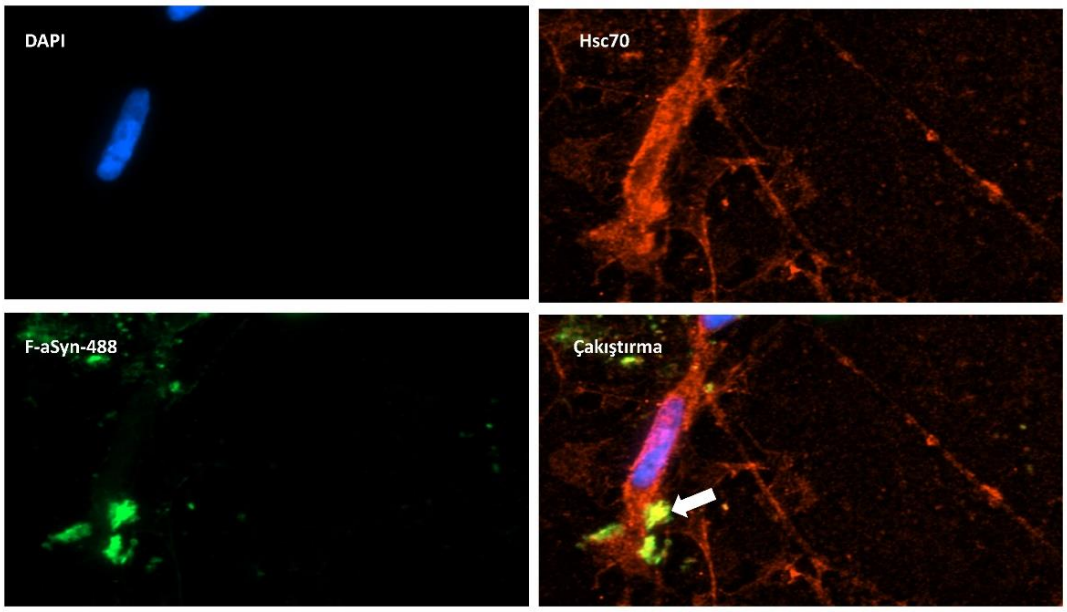
IP örneklerinin WB ve DB analizlerinin ardından elde edilen sonuçlar şaperonların f-aSyn ile hareket edebileceklerini göstermiştir. Bu bulguların desteklenmesi için şaperonların f-aSyn-488 ile kolokalize olup olmadığını saptamak üzere immünfloresan işaretlemeler yapıldı. Bu amaçla, 9 ve 12 saat f-aSyn-488 ile inkübe edilip fiksasyonu yapılmış olan hücrelerde, Hsc70, Hsp90 ve KLC1 IF işaretlemeleri gerçekleştirildi. Ardından floresan mikroskobunda görüntüler alındı.

Görüntülemede f-aSyn-488'in pek çok noktada KLC1 ile kolokalize olduğu görüldü (Şekil 4-18A). Ayrıca WB yöntemi kullanılarak KLC1-IP örnekleri anti-aSyn antikoru ile işaretlendi ve 14 kDA'luk aSyn'nin moleküler ağırlığına denk gelen 15 kDa bölgesinde bant saptandı. Benzer şekilde, aSyn-IP örneğinin KLC1 işaretlemesinde de 70 kDa bölgesinde bant görüldü (Şekil 4-18B). Ayrıca, f-aSyn-488'in hücrelerde pek çok noktada Hsp90 ve Hsc70 ile kolokalize olduğu görüldü (Şekil 4-19 ve Şekil 4-20).



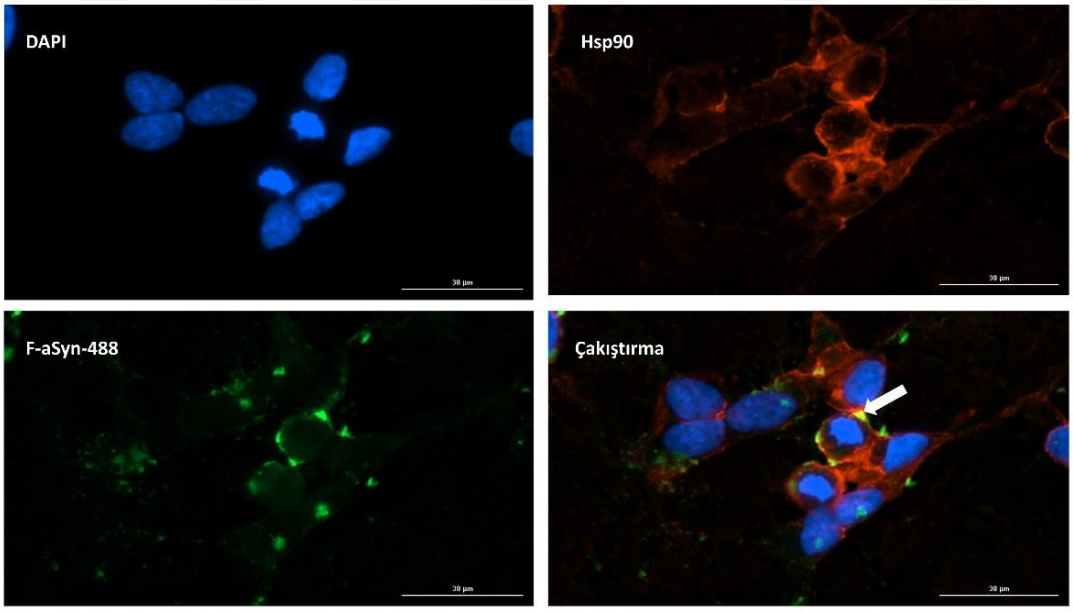
Şekil 4-18: Şekil 18: aSyn ve KLC1 arasındaki bağlanmanın IF ve WB ile gösterilmesi.

A.F-aSyn-488 ve KLC1'in kolokalize olduğu beyaz oklarla işaretlenen sarı bölgelerde gösterilmiştir. Büyütme 60X. **B**. aSyn-IP örneğinde 70 kDa bölgesindeki KLC1 işaretlemesi. Aynı şekilde KLC1-IP örneğinde 15 kDa bölgesinde aSyn işaretlemesi.



Şekil 4-19: F-aSyn-488 ve Hsp90'ın IF işaretlemesi.

Beyaz okla işaretlenen sarı bölgede kolokalizasyon gösterilmiştir. Büyütme 60X

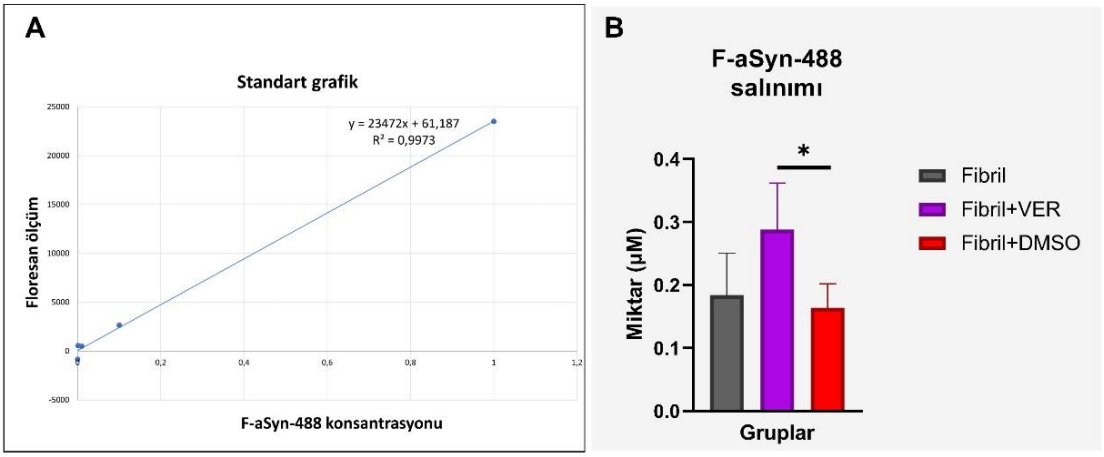


Şekil 4-20: F-aSyn-488 ve Hsc70'in IF işaretlemesi.

Beyaz okla işaretlenen sarı bölgede kolokalizasyon gösterilmiştir. Büyütme 60X

4.8. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolü

Fibril, fibril+VER ve fibril+DMSO hücre deney gruplarından hücre üst sıvıları toplandı. Üst sıvılar florometrede ölçüldü. 1 µM'dan 0,0001 µM'a kadar azalan konsatrasyonlardaki f-aSyn-488 ölçümlerinden standart grafik oluşturuldu (Şekil 4-21A). Standart grafikteki eğim değeri üzerinden gruplar arsından salınan f-aSyn-488 miktarları belirlendi. Salınan miktarlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığı hesaplandı. Buna göre, fibril ve fibril+VER gruplarından salınan f-aSyn-488 miktarları arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Fibril ve fibril+DMSO uygulanma grupları karşılaştırıldığında salınan miktarlar arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Fibril+VER grubundan salınan f-aSyn-488 miktarı fibril+DMSO grubundakinden anlamlı ölçüde fazla bulundu ($p<0,03$) (Şekil 4-21B).



Şekil 4-21: F-aSyn-488 salınımının belirleme grafikleri.

Standart grafik (**A**) ve salınım miktarlarının istatistiksel analiz grafiği (**B**). (*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001)

5. TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında f-aSyn'nin hücre içi taşınımında ve hücre dışına salınımında şaperonların rolleri araştırılmıştır. Bu amaçla, Hsp100 sınıfı haricinde kalan tüm şaperon sınıflarından en az bir tane hsp ile çalışılmıştır. Ubitikin de protein kalite kontrol sisteminin önemli bir bileşeni olduğundan çalışmaya dahil edilmiştir. Hazırlanan çalışma düzeneğinde f-aSyn ve KLC1 ile bağlanabilen şaperonlar IP deneyleriyle araştırılmıştır. IP deneylerinden önce hücrelere f-aSyn uygulaması yapılmış ve konfokal mikroskobunda yapılan incelemeler doğrultusunda belirlenen sürelerle inkübasyon yapılması planlanmıştır. F-aSyn uygulamasına bağlı olarak hücresel stres seviyesi değişebileceğinden şaperonların hücre içi seviyelerinde artma veya azalma gerçekleşebilir. Bu nedenle, ilk olarak f-aSyn'nin hücre içinde şaperon ekspresyonuna etkili olup olmadığı ve şaperonların ekspresyon değişimlerinin stresle bağlantısı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, hangi şaperonların hücre içi taşınımında f-aSyn'ye bağlanabileceğinin göstermiştir. Ayrıca f-aSyn'nin hücrelere ilk giriş yaptığında şaperon ekspresyonlarına ve hücresel stres seviyesine etkisini ortaya koymuştur. Çalışma bütünüyle ele alındığında, prionoid hipotezi, PH'de mitokondriyal işlev bozulmaları ve hipometabolik aktivite arasındaki ilişkiye köprü oluşturur nitelikte değerlendirilmiştir.

5.1. Şaperonların Ekspresyon Değişimlerinin İncelenmesi

Sunulan çalışma kapsamında, konfokal mikroskobunda yapılan görüntüleme çalışmalarında, f-aSyn-488'in 9 ve 12. saatlerde hücresel uzantılarda olduğu belirlenmiştir. Uzantılardaki f-aSyn-488, hücre içinde taşınmakta olan sitoplazmik protein yığınlarının tanımına uygun şekilde (Scott ve ark. 2011) bir yerde toplanmış küçük noktalar şeklindedir. Ayrıca, ard arda dizili boncuk taneleri gibi dizili durumdadırlar ve f-aSyn'nin hücre içi taşınımı üzerine yapılan diğer çalışmalarla (Freundt ve ark. 2012) uyumlu gözükmektedir. Hücre içi taşıma üzerine yapılan bu bulgu ve betimlemelerden yola çıkarak, f-aSyn'nin taşınımının 9 ve 12. saatlerde gerçekleştiğini değerlendirdik. Nitekim literatürde de ilk 24 saat içinde f-aSyn'nin hücre içinde taşındığı gösterilmiştir (Brahic ve ark. 2016). Bu sebeple f-aSyn uygulamasını takiben 12 saatlik inkübasyonun ardından IP deneyleri yapılması planlanmıştır. Diğer yandan, şaperonların ekspresyonları, çevresel uyaranlara bağlı olarak çok hızlı şekilde değişiklik gösterebildiğinden (Honrath ve ark. 2017; Tang ve ark. 2016; Whitley ve ark. 1999), ilk

6 ve 12 saatler içinde hücre içinde şaperon miktarlarının ne yönde değiştiğinin belirlenmesine karar verilmiştir.

İncelediğimiz şaperonlardan Hsp32, Hsp40, Hsp60, HSPA4, Hsc70, GRP75 ve ubikitinin hücre içi seviyesi 12 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmıştır. Şaperonların seviyelerindeki düşüş, LDH salınımını baz alarak yaptığımız ölçümlerde görülen hücresel stres seviyesindeki düşüşle açıklanabilir. Diğer taraftan, Hsp10, Hsp90 ve Hsp27'nin hücre içi seviyesleri 12 saat inkübasyon sonunda düşmemiştir. Hsp27'nin f-aSyn'ye bağlanabildiği ve fibrilizasyonunu engelleyici rollerinin olduğu gösterilmiştir (Cox ve ark. 2018). Bu nedenle Hsp27 ekspresyonunun f-aSyn uygulamasına bağlı bir değişiklik göstermemesi, şaperonun f-aSyn'e karşı verilen yanıtta etkili bir rol almasından kaynaklanabilir.

Diğer yandan, şaperonların hücre içindeki işlevlerine bağlı olarak stres koşullarına farklı cevap vermeleri de açıklanabilir bir durumdur. Örneğin, hücre içinde pek çok alanda görev alabilen Hsc70, Hsp70 sınıfı şaperonların stres uyaranları olmadan da sürekli ekspresyonu yapılan bir üyesidir (Gorenberg ve Chandra, 2017). Bu nedenle hücre içi seviyesi her zaman stres koşullarına bağlı olamadan düzenlenebilir. Hsp27, Hsp60, GRP75, Hsp90 ve Hsp10 da sürekli ekspresyonu yapılan şaperonlar olarak tanımlanmaktadır (Chen ve Brown, 2007; Choi ve ark. 2009). Bu nedenle hücre içi seviyelerinde 12 saat sonunda kontrole göre fark olmaması bu şekilde açıklanabilir. Ancak, bu şaperonlar içinde Hsp60 ve GRP75'in seviyesi 12 saatlik f-aSyn inkübasyonuna bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşmüştür.

GRP75 ve Hsp60'ın hücre içindeki rolleri göz önüne alındığında, f-aSyn'nin bu iki şaperonu da etkileyerek mitokondri üzerine etki edebileceği düşünülebilir. Hsp60, Hsp10'la birlikte ko-şaperon ilişkisi kurmakta ve daha çok mitokondride görev almaktadır (Bie ve ark. 2020). GRP75 ise endoplazmik retikulum-mitokondri ilişkili membranda ve mitokondrilerde görev almaktadır (Honrath ve ark. 2017). F-aSyn'nin mitokondride görev alan iki şaperonu da baskılaması, PH'da görülen mitokondriyal işlev bozukluklarına ışık tutabilir. Nitekim, ailesel PH ile ilişkili genlerden PINK1, PARKIN mitokondri ile ilişkilidir ve yakın zamanda grubumuz tarafından yayımlanan bir çalışmada, bu genler ile mitokondriyal genomda kodlanan genlerin ekspresyonlarında, PH vakalarında yaşa bağlı olarak sağlıklı bireylere göre değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Gezen-Ak ve ark. 2020). Diğer yandan, f-aSyn'nin mitokondri üzerinde

nasıl bir etki ettiğiyle ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır. Bulgularımız, f-aSyn'nin mitokondride görev alan şaperonların baskılanmasına neden olarak mitokondriyal işlev bozukluklarına yol açabileceğine işaret ediyor. Bu nedenle, çalışma sonuçlarımız, prionoid hipotezi ve nörodejenerasyonda mitokondriyal işlev bozuklukları arasında yeni bir köprü oluşturma potansiyeline sahiptir. Diğer yandan, f-aSyn uygulamasına bağlı olarak düşen Hsp60 seviyesi aslında kontrol grubunda da düşüş göstermektedir. Bir başka ifadeyle, f-aSyn Hsp60 seviyesinin düşüşünü arttırmıştır.

Hsp32'ye ise ayrı bir paragraf açmak gereklidir. Hsp32 ekspresyonu 12 saatlik f-aSyn inkübasyonuna bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşüktür. Bulgular incelendiğinde, f-aSyn'in şaperonun ekspresyonunu azaltmadığı, ancak kontrol grubunda artış olmasına rağmen bu artışı baskıladığı görülmektedir. Hsp32 ya da diğer adıyla HMOX1, hem grubunun bilirubine dönüştürülmesinde görev alır (Schipper ve ark. 2019). Dolayısıyla eritrosit hücre döngüsünde, özellikle yıkım aşamasında, rol almaktadır. Şaperonun beyindeki ekspresyonu ise oldukça azdır. İlk başlarda, daha çok eritrositlerle ilişkili görevlerde kullanıldığı bilgisini göze alarak, f-aSyn'ye karşı en az cevap verecek şaperon olarak değerlendirilmiştik. Fakat bulgularımız, hücrelere f-aSyn uygulandığında, hücre içi seviyesinde anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir. Daha çok eritrositlerle ilişkilendirilen bu şaperonun aSyn'le ilişkisi yine eritrositlerle ilişkilendirilebilir. Her ne kadar aSyn en çok sinir sistemiyle ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilse de, protein aynı zamanda eritrositlerde de bulunmaktadır. Dahası, veri tabanlarına göre proteinin en fazla ekspresyonunun yapıldığı bölgelerden biri kemik iliğidir (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622) ve buradaki eritrosit öncü hücrelerdir (Scherzer ve ark. 2008). Hatta eritrositler kan dolaşımındaki aSyn kaynağı olarak tanımlanmaktadır (Barbour ve ark. 2008). Dolayısıyla, bu bulgu aSyn'nin eritrositlerdeki işlevine odaklanılması gerektiğini de göstermektedir. Son yıllarda eritrosit kaynaklı aSyn'nin nörodejeneratif hastalıklardaki rollerine dikkat çeken yayınlar literatürde sunulmuştur (Li ve ark. 2020; Liu ve ark. 2019).

Diğer yandan, ilk 6 saatteki değişimler de dikkate alındığında Hsp40, Hsc70 ve Hsp90'ın ekspresyon seviyelerinde dalgalanmalar dikkat çekmektedir. Hsc70 ve Hsp40 ekspresyonu, f-aSyn'ye maruz kalınan ilk 6 saatte kontrol grubuna göre artmışsa da 12. saat sonunda hücre içi seviyelerinde azalma meydana gelmiştir. Şaperonların hücre içi seviyesindeki bu dalgalanma, stres seviyesinden bağımsız olarak ilk 6 saat içinde,

hücrelerin protein agregatlarına karşı tepki vermesi olarak yorumlanabilir. F-aSyn uygulamasında hücresel stres seviyesi düştüğünden, Hsp40 ve Hsc70'in sonraki 6 saatte hücre içi seviyelerinin azalma sebebi bu olabilir. Öte yandan, Hsp90'ın ekspresyonu f-aSyn uygulamasına bağlı olarak ilk 6 saatte artış göstermiştir. Sonraki 6 saatte kontrol grubundaki ekspresyonu f-aSyn uygulananlardaki seviyeye yetişmiştir. Hsp90'ın aSyn agregasyonunu ilerletici özellik gösterebildiği yönünde kanıtlar mevcuttur. Örneğin, Hsp90 inhibisyonunun nörodejenerasyonun önlenmesindeki etkinliği gösterilmiştir (Putcha ve ark. 2010). Diğer yandan Hsp90'nın koruyuculuğuna dair kanıtlar da bulunmaktadır (Daturpalli ve ark. 2013).

Hsp90 ekspresyon artışı Hsc70 ve Hsp40 ekspresyonlarıyla birlikte incelendiğinde, prionoid hipoteziyle açıklanabilir bir görüntü oluşmaktadır. Şöyle ki, 3 şaperonun ekspresyonunda ilk saatlerde artış olsa da ilerleyen saatlerde Hsc70 ve Hsp40 ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak hücre içindeki agregat çözme fonksiyonunda azalma olacaktır (Lackie ve ark. 2017). Diğer taraftan, Hsp90 ekpresyonunun ilerleyen saatlerde sabitleşmesiyle agregat yapısının stabilizasyonu artabilecektir. Bu durum, tıpkı kanser hücrelerinin immün sistemi aşarak vücutta çoğalması için zaman kazanmasında olduğu gibi, f-aSyn'ye hücre içinde çoğalmak için zaman yaratıyor olabilir.

Prionoid hipotezine göre, f-aSyn hücre içine alındığında henüz tam olarak kesin bir mekanizma açıklanmamış olsa da, endozomlardan kurtularak, şaperonları inhibe ederek veya proteazom sistemini bozarak hücresel müdahalelerden kurtulmaktadır (Bieri ve ark. 2018). Dolayısıyla, hücre içine girişin gerçekleştiği erken aşamalar, hücrenin, henüz çok fazla çoğalmadan bu "patojenle" mücadele edebileceği kritik bir zaman aralığıdır. Sunulan çalışmada elde edilen bulgular, ilk bakışta, f-aSyn'nin "hücresel stres seviyesini düşürerek toksik bir etki yapmadığı" şeklinde olumlu bir görüntü oluştursa da f-aSyn hücre içinde şaperonların seviyesini azaltarak olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Şaperonlar, agregatlarla mücadelede rol alan kritik savunma birimleridir. Dolayısıyla, hücre içinde kendisini çoğaltması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, f-aSyn'nin hücresel müdahalelerden kurtulmasına yardımcı olacak şekilde kendisini çoğaltmasına fırsat tanıyan bir zaman aralığı yarattığı düşünülebilir.

Diğer yandan, f-aSyn uygulanan hücrelerdeki stres seviyesindeki azalma nasıl açıklanabilir? Fibriler ve oligomer formlardaki aSyn'lerin hücreler üzerinde toksisiteye sebep olduğu literatürde pek çok çalışmada gösterilmişse de hangi formun daha toksik

olduğu konusu tartışmalıdır (Wu ve ark. 2020). F-aSyn'nin hücreler üzerindeki toksik etkisi yakın zamanda yayımlanan bir çalışmada da gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2020). Söz konusu çalışmada, sunulan tez çalışmasındaki gibi SH-SY5Y hücreleri kullanılmış ve hücrelere farklı büyüklüklerdeki 1 μM f-aSyn uygulamıştır. 24 saat inkübasyon sonunda tetrazolyum tuzunun renk değişiminin kolorimetrik ölçümüne dayanan test ile sitotoksisite testi (MTT testi) yapılmıştır. Elde ettikleri bulgulara göre f-aSyn fibirl boyutuna bağlı olarak hücreler üzerinde tosik etki bırakmıştır. Bizim de öngörümüz, f-aSyn'nin hücrelerde toksik etki yapacağı ve buna bağlı olarak hücresel stresle ilişkili şaperonların ekspresyonlarının artacağı şeklindeydi. Oysaki elde ettiğimiz bulgular, f-aSyn'nin -en azından- ilk 12 saatte hücreler üzerinde strese sebep olmak yerine hücresel stresi azalttığını da göstermiştir. Aynı hücrelerin kullanıldığı iki çalışmada farklı sonuçlar çıkması nasıl açıklanabilir? Bu soruya iki şekilde açıklama yapılabilir: ilki iki çalışmada kullanılan hücrelerin farklı olması, ikincisi ise hücrelerin f-aSyn'ye maruz kaldığı zaman.

Esasında, iki çalışmada kullanılan hücreler aynı değildir. Her ne kadar çalışmamızdaki hücre hattı SH-SY5Y olsa da kullandığımız hücreler bu hücrelerden farklılaştırılan N-SH'dir. F-aSyn'nin her hücre tipinde aynı cevabı oluşturmayacağı da göz önüne alındığında (Heiko Braak ve ark. 2003), iki çalışmada farklı sonuçlar elde edilmesi daha da netleşmektedir. Örneğin MSA'daki GCI ve PH'deki LC'lerin baskın bileşeni f-aSyn olsa da bu iki patolojik yapıyı oluşturan f-aSyn'lerin konformasyonel özellikleri birbirinden farklıdır. GCI'daki f-aSyn'lerin katlanma gücünün LC'lerdekilerden 1000 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Shahnawaz ve ark. 2020). Dolayısıyla nöronlarda LC oluşumuna sebep olan f-aSyn'nin glial hücrelerde patolojik yapı oluşturması için çok daha zor çözünen bir yapı oluşturması gerektiği söylenebilir. Diğer yandan, Braak hipotezine göre, patoloji SNc'ye ulaşmasından çok daha önce beynin farklı bölgelerini etkilemektedir (Heiko Braak ve ark. 2003). Ancak, PH'de en fazla hasar hasar alan bölgelerin başında PH'nin ortalarına doğru etkilenen SNc gelmektedir. Dolayısıyla, patoloji aynı hücreler olan nöronlar üzerinde bile işlevsel ve fizyolojik farklılıklara göre farklı etkiler göstermektedir.

Diğer yandan f-aSyn'ye maruz kalma süresi de stresin oluşumundaki seyri de etkileyebilecektir. F-aSyn'nin hücresel stresle ilişkisini inceleyen çalışmalarda model sistemler genellikle uzun süre f-aSyn'ye maruz kalmıştır. Örneğin Zhang ve ark. (2020) 24 saatlik f-aSyn inkübasyonun hücresel stres üzerindeki etkisini incelemiştir. Sunulan

tez çalışmasında ise 6 ve 12 saatlik kısa süreli inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla kronikleşen maruz kalma durumunda hücrelerin stes seviyesi artabilir.

5.2. Şaperonların Fibriler Alfa-Sinüklein ile Birlikteliğinin Hücre Içi Seviyelerinin Değişimleriyle İlişkisi

Elde edilen bulgular incelendiğinde, f-aSyn uygulanan hücrelerde bazı şaperonların aSyn-IP ve KLC1-IP örneklerinde kontrollere göre azalma olduğu belirlendi. Ancak IP örneklerindeki bu azalmanın, söz konusu şaperonların hücre içi seviyelerindeki azalmadan kaynaklanabileceği dikkate alınmalıdır. Nitekim bazı şaperonların hücre içi seviyesi 12 saatlik f-aSyn uygulamasına bağlı olarak düşmüştü. Şaperonun hücre içi seviyesi azaldığında hedeflerine bağlanacak şaperon miktarı da azalacağından, IP örneklerinin DB işaretlemelerinde de azalma olacaktı. Bu nedenle, IP örneklerinin DB ve WB işaretlemelerinin bulguları, şaperon ekspresyon seviyelerinin DB ve WB bulgularıyla karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonuçlarının özeti Tablo 5-1'de sunulmuştur.

NB bulgularına göre aSyn-IP (aSyn ile birliktelik) incelemesi

Bulgular incelendiğinde, fibril aSyn-IP örneklerindeki Hsp27, Hsp32, Hsp60 ve GRP75 şaperonlarının varlığı, kontrol aSyn-IP örneklerindekinden anlamlı ölçüde az olduğu görülmektedir. Bu azalma, şaperonların ekspresyonlarındaki azalmayla ilişkili olabilir. Örneğin, 12 saat f-aSyn'ye maruz bırakılan hücrelerde Hsp32 şaperon seviyesi kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşmüştür. Benzer şekilde, f-aSyn uygulanan hücrelerde şaperonun aSyn-IP örneğinin NB işaretlemesinin şiddeti de kontrol grubundakine göre anlamlı şekilde düşmüştür. Dolayısıyla, iki farklı deney bulgusu birleştirildiğinde, Hsp32'nin fibril aSyn-IP'deki NB işaretlemesinin düşme nedeni, şaperonun hücre içi seviyesinin f-aSyn uygulandığında düşmesinden kaynaklanabilir. Benzer şekilde, Hsp60 ve GRP75'in hücre içi seviyesi 12 saatlik f-aSyn uygulamasına bağlı olarak azalmış, yine 12 saatlik f-aSyn uygulamasında kontrol grubuna göre aSyn ile birlikteliğinin azaldığı görülmektedir.

Diğer yandan, Hsp40, HSPA4 ve ubikitinin hücre içi seviyeleri, f-aSyn uygulamasına bağlı olarak 12 saatlik inkübasyonun ardından kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşerken, aynı uygulama deneyi sonrası yapılan aSyn-IP örneklerinde bu şaperonların aSyn ile birlikteliği kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş sergilememiştir. Dolayısıyla bu şaperonların f-aSyn uygulandığında aSyn'e bağlanma oranları hücre içi seviyelerindeki azalmaya rağmen düşmemiştir. Bir başka bakış açısına

göre bağlanma oranının arttığı söylenebilir. Kullanılan hücrelerdeki endojen aSyn sessizleştirilmediğinden veya susturulmadığından, ilgili şaperonlar endojen aSyn'lere de bağlanabilecektir. Ancak, ekspresyonlarındaki azalmayla ilişkili olarak bu şaperonların aSyn ile birliktelikleri f-aSyn uygulandığında anlamlı bir düşüş sergilememiştir. Bu nedenle, Hsp40, HSPA4 ve ubikitinin f-aSyn ile bağlanabildiği düşünülebilir.

Tablo 5-1: Şaperon ekspresyon deneylerinin ve f-aSyn taşınım deneylerinin karşılaştırılması.

Ekspresyon değerlendirmesinde f-aSyn ile 12 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen bulgular baz alınmıştır. Karşılaştırmalar kontrol ve fibril grupları arasında yapılmıştır. (-1: istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldı; 0: istatistiksel olarak anlamlı değil; 1: istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttı)

Şaperon	Ekspresyon	aSyn-IP	KLC1-IP
Hsp27	0	-1	-1
Hsp32	-1	-1	-1
Hsp40	-1	0	0
Hsp60	-1	-1	-1
HSPA4	-1	0	-1
Hsp90	0	0	-1
GRP75	-1	-1	-1
Ubikitin	-1	0	-1
Hsp10	0	0	-1
Hsc70	-1	Veri yok	Veri yok

Hsp90 ve Hsp10'un hücre içi seviyesi, 12 saatlik f-aSyn inkübasyonunun ardından kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Bununla uyumlu şekilde, kontrol ve f-aSyn uygulanan hücrelerde aSyn-IP örneklerinin karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Dolayısıyla Hsp90 ve Hsp10'un hücre içi seviyesi değişmediği gibi aSyn ile birlikteliği de değişmemiştir.

NB deneyine göre KLC1-IP (KLC1 ile birliktelik) incelemesi

aSyn ile birlikteliğin ekspresyonla uyumluluğu konusunda yapılan inceleme KLC1 ile de yapılmıştır. Bu durumda, Hsp40 dışında kalan çalışma dahilindeki tüm şaperonların, KLC1 ile birlikteliği f-aSyn uygulanan hücrelerde anlamlı ölçüde azalmıştır. Hsp40 ekspresyonu f-aSyn uygulandığında düşmüştür. Dolayısıyla, Hsp40'ın KLC1 ile birlikteliğinde de buna bağlı olarak düşüş görülebilirdi. Ancak, f-aSyn uygulandığında hücre içi seviyesindeki azalmaya rağmen Hsp40'ın ne aSyn ile ne de KLC1 ile etkileşimi azalmamıştır. Bu bulgular göz önüne alındığında, Hsp40 (DNAJB5), f-aSyn'nin taşınımında en azından refakatçı olarak konumlandırılabildiğimiz ilk şaperondur.

Diğer yandan, F-aSyn uygulamasına bağlı olarak, Hsp60, GRP75 ve Hsp32'nin hem ekspresyon seviyelerinde hem aSyn ile birlikteliklerinde hem de KLC1 ile birlikteliklerinde düşüş görülmüştür. Dolayısıyla, bulgularımız bize bu 3 şaperonun f-aSyn'nin hücre içi taşınımında görev almayacağını ya da en azından Hsp40 kadar güçlü bir role sahip olmayacağını düşündürmüştür. Bu nedenle, Hsp32, Hsp60 ve GRP75 refakatçı veya adaptör adaylığından elenmiştir. Yine de görüntüleme veya IF temelli bir yaklaşımda bulunularak, varılan bu sonucun doğruluğunun teyit edilmesi gerekmektedir.

HSPA4 ve ubikitinin f-aSyn uygulamasına bağlı olarak ekspresyonları düştüğü gibi, aynı şekilde KLC1 ile birliktelikleri de düşmüştür. Bu iki sonuç birbiriyle uyumlu gibi görünmektedir. Diğer yandan söz konusu iki şaperonun aSyn ile birliktelikleri f-aSyn uygulamasındaki ekspresyon azalışlarına rağmen sürdürülmüştür. Bu durum, HSPA4 ve ubikitinin hücre içi taşınımı sırasında f-aSyn'ye bağlı olabileceği ancak çoğunlukla taşınmıyorken bağlı olacağı şeklinde yorumlanmıştır. Nitekim ubikitin yıkıma gitmesi için hedefleri işaretlerken, HSPA4 hücre içinde agregatların çözülmesinde görev almaktadır.

Hsp10 ve Hsp90'ın ekspresyon değişimleri, aSyn ile birliktelikleri ve KLC1 ile birlikteliklerinde benzer sonuçlar alınmıştır. Her iki şaperonun KLC1 ile birlikteliği

anlamlı ölçüde azalırken ne hücre içi seviyelerinde azalma ne de aSyn ile birlikteliklerinde ekspresyonlarından farklı bir sonuç elde edilmiştir. KLC1 ile etkileşimlerindeki azalma, bu iki şaperonun hedef değiştirmesinden kaynaklanıyor olabilir. Hsp90 agregatlara bağlanabilmektedir. Bir şekilde hücre içinde taşınmayan f-aSyn ile birliktelik kurmuş olabilir. Bu durumda hücre içinde taşınmakta olan Hsp90 miktarı azalabilmektedir. Öte yandan Hsp10 daha çok mitokondriyal şaperondur. F-aSyn'nin mitokondri üzerinde baskı oluşturmasının bir yolu da Hsp10'un mitokondriye hareketindeki bozulma olabilir.

Hsp27 ise, ekspresyon ve IP örneklerinin analiz sonuçları incelendiğinde Hsp40'la tersinir etki göstermektedir. Çünkü Hsp27, hücre içi seviyesi 6 ve 12 saat f-aSyn ile inkübasyona bağlı olarak en az tepki veren şaperon olurken, Hsp40 ise tam tersine her iki zaman aralığında da f-aSyn uygulamasına bağlı olarak ekspresyon düzeyinde tepki görülen Hsc70 dışındaki tek şaperondur. Ancak, söz konusu iki şaperonun IP örnekleri analiz edildiğinde rolleri değişmiş oldukları görülmüştür: Hsp27 f-aSyn uygulamasına tepki verirken, Hsp40'ta tepki görülmemiştir. Bu nedenle Hsp27 ve Hsp40'ın aSyn ve f-aSyn ile etkileşiminin hücre içi seviyelerinden bağımsız şekilde düzenlendiğini değerlendirmekteyiz. Nitekim her iki şaperonun da f-aSyn ile etkileşime girebildiği bilinmektedir (Cox ve ark. 2014; Gao ve ark. 2015).

WB ve IF bulgularının değerlendirilmesi

NB analizinde kullanılan IP örnekleri aynı zamanda WB ile de analiz edilmiştir. Bu analizlerde Hsc70, HSPA4 ve Hsp90 işaretlenmiştir. HSPA4 ekspresyonu f-aSyn uygulamasına bağlı olarak düşerken, WB sonuçlarına göre aSyn ile birlikteliği anlamlı ölçüde azalmıştır. Benzer şekilde Hsp90 ekspresyonu f-aSyn uygulamasına bağlı olarak değişmezken, WB bulgularına göre aSyn ile birlikteliği azalmıştır. Oysaki NB analizlerinde her iki şaperonun aSyn ile birlikteliğinde değişiklik bulunmamıştır. WB ve NB bulguları arasındaki fark, iki yöntemin ölçümlerinin farklı işlenmesinden kaynaklanabilir. Nitekim, şaperonların WB bant yoğunlukları IgG hafif zincirin bant yoğunluğuna oranlanmıştır. Bu sayede, IP deneyinde hücre lizatına koyulan antikor başına düşen şaperon miktarı belirlenmiş olunur. WB ile yapılan bu hesaplama yönteminin dezavantajı, her zaman yüklenen IgG miktarının hedef bağlayan IgG miktarını temsil etmeyeceğidir. F-aSyn'nin taşınımına yönelik doğrudan kanıt ise f-aSyn-488'in KLC1 ile kolokalize olduğunun gösterilmesidir. Aynı işaretlemelerde f-aSyn'nin

Hsp90 ve HSPA4 ile de kolokalize olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla HSPA4 ve HSP90 f-aSyn ile bağlanabilmektedir.

IP örneklerinin WB ile analizinde Hsc70 işaretlemesi de yapılmış, ancak ölçülebilir bir görüntü elde edilememiştir. Hsc70 fizyolojik koşullarda aSyn ile birliktedir (Pemberton ve ark. 2011) ve IF işaretlemelerimizden elde ettiğimi bulgularımızla da bu doğrulanmıştır (Şekil 1C). Ayrıca çalışmamızda, f-aSyn-488 ile 12 saat inkübe edilen hücrelerde Hsc70 ve aSyn'nin kolokalize olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, kullanılan anti-Hsc70 antikorunun WB deneyinde işaretleme yaptığını da yaptığımız deneylerde gösterdik. Diğer yandan oluşturulan deney gruplarında yapılan aSyn-IP ve KLC1-IP deneyi örneklerinin hem NB hem de WB ile işaretlemeleri yapılmış ve aSyn ve KLC1'e bağlı olan şaperonlar belirlenebilmiştir. Dolayısıyla çıkarabileceğimiz sonuç, Hsc70'in f-aSyn'ye bağlı olduğu ancak, IP örneklerinde aSyn ve KLC1 ile bağlı olan Hsc70 miktarının WB ile tespit edilmesine yeterli olmadığı; Hsc70'in aSyn ile etkileşirken iki protein arasında birden fazla aracı olabileceği ve bu nedenle IF deneylerinde iki proteinin bir arada görülmüş olabileceği ihtimaller dahilindedir. Eğer iki protein birbiriyle etkileşirken aralarında birden fazla aracılar bulunuyorsa,fazla sayıdaki aracı protein IP deneyinde aSyn ve Hsc70'in çökmesini engelleyebilir. Dolayısıyla f-aSyn-488 ve Hsc70'in IF işaretlemelerine göre Hsc70 f-aSyn ile bağlanabilir ve taşınımı sırasında f-aSyn için refakatçı olarak görev alabilir.

5.3. Şaperonların Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre İçi Taşınımındaki Rollerinin Hsp70'lerle İlişkisi

Eğer bir şaperon f-aSyn ile Hsp70'ler aracılığıyla bağlanıyorsa veya söz konusu şaperon Hsp70 sınıfındansa, VER uygulandığında söz konusu şaperonun f-aSyn'ye bağlanması azalmalıdır. VER DMSO içinde çözdürüldüğünden, şaperonun bağlanmasındaki azalma DMSO uygulanmasından farklı olmalı ve daha az olmalıdır. VER ve DMSO uygulaması, f-aSyn uygulamasından sonra yapıldığından, VER veya DMSO uygulanan hücre ifadesi bu maddelerin f-aSyn'le birlikte hücrelere uyguladığını belirtmektedir.

Hsp32, Hsp60 ve GRP75 şaperonlarının aSyn ile birlikteliği sadece f-aSyn uygulamasına göre VER uygulandığında anlamlı şekilde değişmiştir. Bu değişim Hsp32'de artış yönünde, Hsp60 ve GRP75'te azalma yönündedir. DMSO uygulamasının

bulguları dahil edildiğinde bu değişimlerin VER etkisiyle değil, DMSO etkisinden olduğu anlaşılmaktadır.

Öte yandan Hsp27'nin bağlanması Hsp70'lerce düzenleniyor ya da yönlendiriliyor gibi görünmektedir. Çünkü VER uygulandığında şaperonun aSyn ile birlikteliği sadece f-aSyn uygulanmasına göre anlamlı ölçüde düşerken, bu değişiklik DMSO ile ilişkili değildir. Diğer yandan, literatürde yaptığımız taramalarda, Hsp27'nin Hsp70'lerle düzenlenebileceğine yönelik bir bilgiye ulaşamadık. Bu bulgu daha önce üzerinde durulmamış bir Hsp70-Hsp27 birlikteliğine mi işaret etmekte veya f-aSyn uygulamasına karşı verilen özel bir yanıt mı olduğu konusunda belirsizlik taşımaktadır. Hsp27'nin ekspresyon değişiminden bağımsız olarak f-aSyn uygulandığında aSyn ve KLC1 ile birlikteliğinin azaldığı göz önünde bulundurulursa bu tepkilerin hücrelerde meydana gelen stres uyaranlarına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülebilir, ancak f-aSyn hücrelerde stresi arttırmamış, aksine azaltmıştır. Ek olarak, ATP yerine geçerek Hsp70'lerin etkisini baskılayan VER'in aynı şekilde Hsp27'yi de baskılayarak hedefini engelleyebileceği düşünülebilir. Ancak, Hsp27 çalışmak için ATP'ye ihtiyaç duymamaktadır (Sharp ve ark. 2013). Dolayısıyla elimizdeki bulgulara göre Hsp70'ler f-aSyn'le mücadele amacıyla Hsp27'leri hedefin üzerine göndermiş gibi durmaktadır. Yaptığımız literatür taramalarına göre Hsp27 ve Hsp70'lerin ko-şaperon ilişkisi olduğunu belirten 1 tane yayına (Choi ve ark. 2009) ulaştık. Ancak Hsp70'lerin bir şaperonu doğrudan yönlendirebileceğine yönelik bir yayına ulaşamadık.

Hsp40'lar Hsp70'lerle ko-şaperon ilişkisine sahiptir. Dolayısıyla VER uygulandığında Hsp70'ler inhibe oluyorsa Hsp40'ların da aSyn ile birlikteliğinde azalma beklenebilir. Ancak, Hsp40'ların rolü daha çok Hsp70'lere hedef tanıtmak olduğundan, yönlendirme rolü Hsp70'te değil Hsp40'ta görünmektedir. Bu bilgi, VER uygulandığında Hsp40'ın aSyn ile birlikteliğinin neden azalmadığını açıklamaktadır. Hsp90, Hsp10 ve ubikitinde VER veya DMSO bağlı bir değişim olmadığından bu şaperonların Hsp70'lerce düzenlenmediğini göstermektedir.

Diğer yandan, VER uygulamasına en çok tepki vermesi beklenen HSPA4 ise NB sonucuna göre değişiklik göstermemiştir. Bu bulgu sonrasında yaptığımız taramalarda HSPA4'ün sınıfından çok işlevinin böyle bir sonucu doğurabileceğini belirledik. İlk çalışmalarda HSPA4, Hsp70 üyesi olarak tanımlanmıştır (Dyer ve Rosenberg, 1994). Nitekim şaperonun molekül ağırlığı bizim çalışmalarımızda da 70 kDa'dur. Ancak ilk

yayının aksine daha sonraki çalışmalarda HSPA4'ün Hsp110 üyesi olduğu belirtilmiştir (Kaneko ve ark. 1997; Mohamed ve ark. 2012). Bu nedenle proteinin veri tabanlarındaki isimlerinden biri de Hsp70'le etkileşen protein APG2dir (https://www.uniprot.org/) ve Hsp110'dur (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). APG2, farelerdeki Hsp110'dur ve HSPA4 yerine APG2 ismi de kullanılmaktadır (Kaneko ve ark. 1997). Ayrıca, HSPA4'in diğer Hsp70'lerden önemli ölçüde farklı bir amino asit dizilişine sahip olduğu belirtilmiştir (Dyer ve Rosenberg, 1994). Dahası, HSPA4'ün işlev bakımından Hsp110'lara denk olduğu da belirtilmiştir (Gotoh ve ark. 2004). Buna göre HSPA4, moleküler ağırlığına göre Hsp70 ama işlevine göre Hsp110'dur. Her ne kadar VER ATP yerine geçse de seçici özelliğe sahiptir. İnhibitörün Hsc70 ve GRP78'i inhibe ettiği ve Hsp90'ı inhibe etmediği gösterilmiştir. İnhibitörün HSPA4 üzerindeki etkisini gösteren bir çalışma da bulunmamaktadır. Bu bulgulardan yola çıkarak ve çalışmamızda VER uygulamasıyla Hsp90'ın da inhibe edilmediğini göz önünde bulundurarak seçici inhibisyon yapan VER'in HSPA4'e diğer Hsp70'ler gibi etki etmediği söylenebilir.

5.4. Fibriler Alfa-Sinükleinin Hücre Dışına Salınımında Şaperonların Rolü

VER, Hsp70 sınıfı şaperonları inhibe ettiğinden, eğer f-aSyn'nin salınımında Hsp70'ler rol alıyorsa, VER uygulandığında f-aSyn-488 salınımında azalma olması gerekirdi. Salınım analizlerinin bulguları karşılaştırıldığında, fibril+VER uygulanan hücrelerdeki salınım miktarının fibril+DMSO uygulananlardan anlamlı ölçüde fazla olduğu belirlenmiştir. Ancak, fibril ve fibril+VER grupları arasındaki fark anlamlı olmadığından, bu bulgu Hsp70'lerin salınımda görev almadığına işaret etmektedir. Salınım araştırmalarında kullanılan tekniğin de elde edilen bulguda rolü olabilir. Bu nedenle salınım analizlerinin daha önce literatürde yapıldığı gibi (Brahic ve ark. 2016) mikro akışlı çipler ile yapılması elde ettiğimiz bulguların desteklenmesinin sağlanması açısından önemlidir.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışması bütünüyle değerlendirildiğinde, hücre içine girişinin ilk saatlerinden taşınımına kadar geçen süre içinde, f-aSyn'nin şaperonların ekspresyonlarına etkisi ve bu şaperonların f-aSyn'nin taşınımındaki rolleri sistemli bir şekilde aşama aşama ele alınmıştır. Bu yönüyle, hücresel stres, hücre içi şaperon seviyesi düzenlemeleri, prionoid hipotezi ve hücre içi taşıma konuları tek bir çatı altında incelenmeye çalışılmıştır. Çalışma ile f-aSyn'nin hücre içine alınmasının ilk saatlerinde hücresel stres seviyesinin düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca f-aSyn'nin kısa bir süre içinde

Hsp32, Hsp40, Hsp60, HSPA4, GRP75, ubikitin ve Hsc70 şaperonlarının hücre içi seviyelerini değiştirdiği ilk defa gösterilmiştir. Dahası, f-aSyn'nin GRP75 ve Hsp60 şaperonları üzerinden mitokondriyal işlevi etkileyebileceğine yönelik ilk kanıtları sunmuştur. Ayrıca, ilk defa bu çalışma ile f-aSyn'nin hücre içi taşınımı için "refakatçı" tanımı kullanılmış ve refakatçılık edebilecek şaperonlar araştırılmıştır. Çalışma çıktılarına göre Hsp40 ve Hsp27 en iyi refakatçı adayları olarak belirlenmiştir. Ancak bu bulgunun görüntüleme çalışmalarıyla da desteklenmesi gerekmektedir. Bunların yanı sıra, mikroskobik görüntülemeler de dahil edildiğinde Hsc70 ve Hsp90 refakatçı adayı olarak tanımlanmıştır. Refakatçılar, f-aSyn'nin yayılması için hedefler doğurabileceği gibi, hücre dışına salınımı sırasında da f-aSyn'ye bağlı olmaları durumlarında biyobelirteç adayları oluşturacaktır. Öte yandan, adaptör protein veya proteinlerin bulunabilmesi için canlı hücre görüntüleme sistemi gereklidir. Hücrelerde yapılacak şaperon inhibisyonları veya genetik müdahalesine sonrası f-aSyn-488'in hareketinin engellenip engellenmediği veya ne yönde değiştiği bulguları şaperonların adaptör olup olmadığının belirlenmesi için gereklidir.

KAYNAKLAR

Abounit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin, J., Melki, R., ve Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar α-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. The EMBO Journal, 35(19), 2120–2138. https://doi.org/10.15252/embj.201593411

Aguzzi, A., ve Rajendran, L. (2009). The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids. Neuron, 64(6), 783–790. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.016

Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M., ve Hirokawa, N. (1992). Kinesin family in murine central nervous system. Journal of Cell Biology, 119(5), 1287–1296. https://doi.org/10.1083/jcb.119.5.1287

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ve Walter, P. (2015). Molecular Biology of the Cell (6. baskı).

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A. H., Gardiner, C., Sargent, I. L., Wood, M. J. A., ve Cooper, J. M. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. Neurobiology of Disease, 42(3), 360–367. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.029

Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., De Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P., ve Chilcote, T. J. (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α-synuclein in familial and sporadic lewy body disease. Journal of Biological Chemistry, 281(40), 29739–29752. https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200

Angot, E., ve Brundin, P. (2009). Dissecting the potential molecular mechanisms underlying α-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. Parkinsonism and Related Disorders, 15(SUPPL. 3), S143–S147. https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70802-8

Angot, E., Steiner, J. A., Hansen, C., Li, J. Y., ve Brundin, P. (2010). Are synucleinopathies prion-like disorders? The Lancet Neurology, 9(11), 1128–1138. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70213-1

Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., Aasly, J. O., Rajput, A., Rajput, A. H., Jon Stoessl, A., ve Farrer, M. J. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. Movement Disorders, 28(6), 811–813. https://doi.org/10.1002/mds.25421

Aulić, S., Le, T. T. N., Moda, F., Abounit, S., Corvaglia, S., Casalis, L., Gustincich, S., Zurzolo, C., Tagliavini, F., ve Legname, G. (2014). Defined α-synuclein prion-like molecular assemblies spreading in cell culture. BMC Neuroscience, 15, 1–12. https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-69

Auluck, P. K., Chan, H. Y. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., ve Bonini, N. M. (2002). Chaperone suppression of α-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science, 295(5556), 865–868. https://doi.org/10.1126/science.1067389

Barbour, R., Kling, K., Anderson, J. P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., Fox, M., Goldstein, J. M., Soriano, F., Seubert, P., ve Chilcote, T. J. (2008). Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. Neurodegenerative Diseases, 5(2), 55–59. https://doi.org/10.1159/000112832

Barker, R. A., ve Williams-Gray, C. H. (2016). The spectrum of clinical features seen with alpha synuclein pathology. Neuropathology and Applied Neurobiology, 42(1), 6–19. https://doi.org/10.1111/nan.12303

Bartels, T., Choi, J. G., ve Selkoe, D. J. (2011). α-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. Nature, 477(7362), 107–111. https://doi.org/10.1038/nature10324

Bear, M. F., Connors, B. W., ve Paradiso, M. A. (2016). NEUROSCIENCE EXPLORING THE BRAIN (4. baskı).

Beiske, A. G., Loge, J. H., Rønningen, A., ve Svensson, E. (2009). Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. Pain, 141(1), 173–177. https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.004

Bendor, J. T., Logan, T. P., ve Edwards, R. H. (2013). The function of α-synuclein. Neuron, 79(6), 1044–1066. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004

Bengoa-Vergniory, N., Roberts, R. F., Wade-Martins, R., ve Alegre-Abarrategui, J. (2017). Alpha-synuclein oligomers: a new hope. Içinde Acta Neuropathologica (C. 134, Sayı 6, ss. 819–838). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1755-1

Berg, D., Postuma, R. B., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C. G., Halliday, G., Joseph, L., Lang, A. E., Liepelt-Scarfone, I., Litvan, I., Marek, K., Obeso, J., Oertel, W., Olanow, C. W., Poewe, W., Stern, M., ve Deuschl, G. (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. Movement Disorders, 30(12), 1600–1611. https://doi.org/10.1002/mds.26431

Bie, A. S., Cömert, C., Körner, R., Corydon, T. J., Palmfeldt, J., Hipp, M. S., Hartl, F. U., ve Bross, P. (2020). An inventory of interactors of the human HSP60/HSP10 chaperonin in the mitochondrial matrix space. Cell Stress and Chaperones, 25(3), 407–416. https://doi.org/10.1007/s12192-020-01080-6

Bieri, G., Gitler, A. D., ve Brahic, M. (2018). Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of alpha-synuclein. Neurobiology of Disease, 109, 219–225. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.007

Binolfi, A., Theillet, F. X., ve Selenko, P. (2012). Bacterial in-cell NMR of human α-synuclein: A disordered monomer by nature? Biochemical Society Transactions, 40(5), 950–954. https://doi.org/10.1042/BST20120096

Black, M. M., ve Lasek, R. J. (1979). Axonal transport of actin: Slow component b is the principal source of actin for the axon. Brain Research, 171(3), 401–413. https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)91045-X

Bohnen, N. I., Studenski, S. A., Constantine, G. M., ve Moore, R. Y. (2008). Diagnostic performance of clinical motor and non-motor tests of Parkinson disease: A matched case-control study. European Journal of Neurology, 15(7), 685–691. https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02148.x

Borbat, P., Ramlall, T. F., Freed, J. H., ve Eliezer, D. (2006). Inter-helix distances in lysophospholipid micelle-bound α-synuclein from pulsed ESR measurements. Journal of the American Chemical Society, 128(31), 10004–10005. https://doi.org/10.1021/ja063122l

Borghammer, P., ve Van Den Berge, N. (2019). Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. Içinde Journal of Parkinson's Disease (C. 9, Sayı s2, ss. S281–S295). IOS Press. https://doi.org/10.3233/JPD-191721

Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., ve Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. Journal of Neural Transmission, 110(5), 517–536. https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2

Braak, Heiko, Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R. A. I., Jansen, E. N. H., Bohl, J., ve Jellinger, K. (1994). Amygdala pathology in Parkinson's disease. Acta Neuropathologica, 88(6), 493–500. https://doi.org/10.1007/BF00296485

Braak, Heiko, Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., ve Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of Aging, 24(2), 197–211. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9

Brady, S. T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. Nature, 317(6032), 73–75. https://doi.org/10.1038/317073a0

Brady, S. T., ve Lasek, R. J. (1982). Axonal Transport: A Cell-Biological Method for Studying Proteins That Associate with the Cytoskeleton. Içinde Methods in Cell Biology (C. 25, Sayı C). https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61434-X

Brahic, M., Bousset, L., Bieri, G., Melki, R., ve Gitler, A. D. (2016). Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α-synuclein, Aβ42 peptide and HTTExon 1. Acta Neuropathologica, 131(4), 539–548. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1538-0

Brettschneider, J., Del Tredici, K., M-Y Lee, V., ve Trojanowski, J. Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. Nat Rev Neurosci, 16(2), 109–120. https://doi.org/10.1038/nrn3887

Buchman, V. L., Adu, J., Pinõn, L. G. P., Ninkina, N. N., ve Davies, A. M. (1998). Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. Nature Neuroscience, 1(2), 101–102. https://doi.org/10.1038/349

Burré, J. (2015). The synaptic function of α-synuclein. Journal of Parkinson's Disease, 5(4), 699–713. https://doi.org/10.3233/JPD-150642

Burré, J., Sharma, M., ve Südhof, T. C. (2018). Cell biology and pathophysiology of α-synuclein. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 8(3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091

Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., ve Südhof, T. C. (2010). α-Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science, 329(5999), 1663–1667. https://doi.org/10.1126/science.1195227

Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A. T., ve Südhof, T. C. (2013). Properties of native brain α-synuclein. Nature, 498(7453), 107–110. https://doi.org/10.1038/nature12125

Bussell, R. (2005). Helix periodicity, topology, and dynamics of membrane-associated -Synuclein. Protein Science, 14(4), 862–872. https://doi.org/10.1110/ps.041255905

Bussell, Robert, ve Eliezer, D. (2003). A structural and functional role for 11-mer repeats in α-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. Journal of Molecular Biology, 329(4), 763–778. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00520-5

Butler, B., Saha, K., Rana, T., Becker, J. P., Sambo, D., Davari, P., Goodwin, J. S., ve Khoshbouei, H. (2015). Dopamine transporter activity is modulated by α-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 290(49), 29542–29554. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691592

Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C. E., Paylor, R., Lu, B., ve Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α-synuclein. Journal of Neuroscience, 22(20), 8797–8807. https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-20-08797.2002

Chen, S., ve Brown, I. R. (2007). Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: Implications for neurodegenerative diseases. Cell Stress and Chaperones, 12(1), 51–58. https://doi.org/10.1379/CSC-236R.1

Choi, S. R., Lee, S. A., Kim, Y. J., Ok, C. Y., Lee, H. J., ve Hahm, K. B. (2009). Role of heat shock proteins in gastric inflammation and ulcer healing. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society, 60 Suppl 7, 5–17.

Chu, Y., ve Kordower, J. H. (2007). Age-associated increases of α-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? Neurobiology of Disease, 25(1), 134–149. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.021

Clayton, D. F., ve George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. Trends in Neurosciences, 21(6), 249–254. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01213-7

Cohen, S. I. A., Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. A., Rajah, L., Otzen, D. E., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., ve Knowles, T. P. J. (2013). Proliferation of amyloid-β42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(24), 9758–9763. https://doi.org/10.1073/pnas.1218402110

Cole, N. B., DiEuliis, D., Leo, P., Mitchell, D. C., ve Nussbaum, R. L. (2008). Mitochondrial translocation of α-synuclein is promoted by intracellular acidification. Experimental Cell Research, 314(10), 2076–2089. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.03.012

Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., LaBaer, J., Rochet, J. C., Bonini, N. M., ve Lindquist, S. (2006). α-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. Science, 313(5785), 324–328. https://doi.org/10.1126/science.1129462

Cox, D., Carver, J. A., ve Ecroyd, H. (2014). Preventing α-synuclein aggregation: The role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1842(9), 1830–1843. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.024

Cox, D., Whiten, D. R., Brown, J. W. P., Horrocks, M. H., Gil, R. S., Dobson, C. M., Klenerman, D., Van Oijen, A. M., ve Ecroyd, H. (2018). The small heat shock protein Hsp27 binds -synuclein fibrils, preventing elongation and cytotoxicity. Journal of Biological Chemistry, 293(12), 4486–4497. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813865

Cremades, N., Cohen, S. I. A., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertoncini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., ve Klenerman, D. (2012). Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α-synuclein. Cell, 149(5), 1048–1059. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.037

Cremades, N., ve Dobson, C. M. (2018). The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. Içinde Neurobiology of Disease (C. 109, Sayı Pt B, ss. 178–190). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.009

Damier, P., Hirsch, E. C., Agid, Y., ve Graybiel, A. M. (1999). The substantia nigra of the human brain: II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. Brain, 122(8), 1437–1448. https://doi.org/10.1093/brain/122.8.1437

Danzer, K. M., Ruf, W. P., Putcha, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B. T., ve McLean, P. J. (2011). Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α-

synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. The FASEB Journal, 25(1), 326–336. https://doi.org/10.1096/fj.10-164624

Daturpalli, S., Waudby, C. A., Meehan, S., ve Jackson, S. E. (2013). Hsp90 inhibits α-synuclein aggregation by interacting with soluble oligomers. Journal of Molecular Biology, 425(22), 4614–4628. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.08.006

Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., ve George, J. M. (1998). Stabilization of α-Synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. Journal of Biological Chemistry, 273(16), 9443–9449. https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9443

De Carvalho Aguiar, P., Sweadner, K. J., Penniston, J. T., Zaremba, J., Liu, L., Caton, M., Linazasoro, G., Borg, M., Tijssen, M. A. J., Bressman, S. B., Dobyns, W. B., Brashear, A., ve Ozelius, L. J. (2004). Mutations in the Na+/K+-ATPase α3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. Neuron, 43(2), 169–175. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.028

Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C. W., Merchant, K. M., Bezard, E., Petsko, G. A., ve Meissner, W. G. (2015). Targeting α-synuclein for treatment of Parkinson's disease: Mechanistic and therapeutic considerations. The Lancet Neurology, 14(8), 855–866. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00006-X

den HARTOG JAGER, W. A., ve BETHLEM, J. (1960). The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 23(4), 283–290. https://doi.org/10.1136/jnnp.23.4.283

Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., ve Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α-synuclein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(31), 13010–13015. https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106

Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., ve Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. Journal of Biological Chemistry, 283(14), 9089–9100. https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200

Diederich, N. J., Uchihara, T., Grillner, S., ve Goetz, C. G. (2020). The Evolution-Driven Signature of Parkinson's Disease. Trends in Neurosciences, 43(7), 475–492. https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.001

Dimant, H., Ebrahimi-Fakhari, D., ve McLean, P. J. (2012). Molecular chaperones and co-chaperones in parkinson disease. Neuroscientist, 18(6), 589–601. https://doi.org/10.1177/1073858412441372

Dissanayaka, N. N. W., Sellbach, A., Matheson, S., O'Sullivan, J. D., Silburn, P. A., Byrne, G. J., Marsh, R., ve Mellick, G. D. (2010). Anxiety disorders in Parkinson's disease: Prevalence and risk factors. Movement Disorders, 25(7), 838–845. https://doi.org/10.1002/mds.22833

Dyer, K. D., ve Rosenberg, H. F. (1994). Hsp70RY: Further characterization of a novel member of the hsp70 protein family. Içinde Biochemical and Biophysical Research Communications (C. 203, Sayı 1, ss. 577–581). https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2221

Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., ve Vekrellis, K. (2010). Cell-produced α-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. Journal of Neuroscience, 30(20), 6838–6851. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010

Engelhardt, E., ve Gomes, M. da M. (2017). Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection. Dementia ve Neuropsychologia, 11(2), 198–201. https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-020012

Falsone, S. F., Kungl, A. J., Rek, A., Cappai, R., ve Zangger, K. (2009). The molecular chaperone Hsp90 modulates intermediate steps of amyloid assembly of the Parkinson-related protein α-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 284(45), 31190–31199. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057240

Fasano, A., Visanji, N. P., Liu, L. W. C., Lang, A. E., ve Pfeiffer, R. F. (2015). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. Içinde The Lancet Neurology (C. 14, Sayı 6, ss. 625–639). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00007-1

Fearnley, J. M., ve Lees, A. J. (1991). Ageing and parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. Brain, 114(5), 2283–2301. https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283

Fernández, C. O., Hoyer, W., Zweckstetter, M., Jares-Erijman, E. A., Subramaniam, V., Griesinger, C., ve Jovin, T. M. (2004). NMR of α-synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation. EMBO Journal, 23(10), 2039–2046. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600211

Fontaine, S. N., Zheng, D., Sabbagh, J. J., Martin, M. D., Chaput, D., Darling, A., Trotter, J. H., Stothert, A. R., Nordhues, B. A., Lussier, A., Baker, J., Shelton, L., Kahn, M., Blair, L. J., Stevens, S. M., ve Dickey, C. A. (2016). DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. The EMBO Journal, 35(14), 1537–1549. https://doi.org/10.15252/embj.201593489

Fortin, D. L., Troyer, M. D., Nakamura, K., Kubo, S. I., Anthony, M. D., ve Edwards, R. H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of α-synuclein. Journal of Neuroscience, 24(30), 6715–6723. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004

Fountaine, T. M., Venda, L. L., Warrick, N., Christian, H. C., Brundin, P., Channon, K. M., ve Wade-Martins, R. (2008). The effect of α-synuclein knockdown on MPP+ toxicity in models of human neurons. European Journal of Neuroscience, 28(12), 2459–2473. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06527.x

Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D., ve Fahn, S. (2001). Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease. New England Journal of Medicine, 344(10), 710–719. https://doi.org/10.1056/NEJM200103083441002

Freundt, E. C., Maynard, N., Clancy, E. K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., ve Brahic, M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of α-synuclein fibrils through axonal transport. Annals of Neurology, 72(4), 517–524. https://doi.org/10.1002/ana.23747

Froula, J. M., Castellana-Cruz, M., Anabtawi, N. M., Camino, J. D., Chen, S. W., Thrasher, D. R., Freire, J., Yazdi, A. A., Fleming, S., Dobson, C. M., Kumita, J. R., Cremades, N., ve Volpicelli-Daley, L. A. (2019). Defining α-synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. Journal of Biological Chemistry, 294(27), 10392–10406. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007743

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., ve Iwatsubo, T. (2002). α-synuclein is phosphorylated in

synucleinopathy lesions. Nature Cell Biology, 4(2), 160–164. https://doi.org/10.1038/ncb748

Ganguly, A., Han, X., Das, U., Wang, L., Loi, J., Sun, J., Gitler, D., Caillol, G., Leterrier, C., Yates, J. R., ve Roy, S. (2017). Hsc70 chaperone activity is required for the cytosolic slow axonal transport of synapsin. Journal of Cell Biology, 216(7), 2059–2074. https://doi.org/10.1083/jcb.201604028

Gao, X., Carroni, M., Nussbaum-Krammer, C., Mogk, A., Nillegoda, N. B., Szlachcic, A., Guilbride, D. L., Saibil, H. R., Mayer, M. P., ve Bukau, B. (2015). Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked α-Synuclein Amyloid Fibrils. Molecular Cell, 59(5), 781–793. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.012

George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., ve Clayton, D. F. (1995). Characterization of a Novel Protein Regulated during the Critical Period for Song Learning in the Zebra Finch. Içinde Neuron (C. 15).

Gezen-Ak, D., Alaylioğlu, M., Genç, G., Şengül, B., Keskin, E., Sordu, P., Güleç, Z. E. K., Apaydin, H., Bayram-Gürel, Ç., Ulutin, T., Yilmazer, S., Ertan, S., ve Dursun, E. (2020). Altered transcriptional profile of mitochondrial DNA-Encoded OXPHOS subunits, mitochondria quality control genes, and intracellular ATP levels in blood samples of patients with Parkinson's disease. Journal of Alzheimer's Disease, 74(1), 287–307. https://doi.org/10.3233/JAD-191164

Gibb, W. R. G., ve Lees, A. J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. Içinde Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry (C. 51, Sayı 6, ss. 745–752). BMJ Publishing Group. https://doi.org/10.1136/jnnp.51.6.745

Goedert, M. (2015). Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Aβ, tau, and α-synuclein. Içinde Science (C. 349, Sayı 6248). American Association for the Advancement of Science. https://doi.org/10.1126/science.1255555

Goers, J., Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Millett, I. S., Doniach, S., Di Monte, D. A., Uversky, V. N., ve Fink, A. L. (2003). Nuclear localization of α-synuclein and its interaction with histones. Biochemistry, 42(28), 8465–8471. https://doi.org/10.1021/bi0341152

Goldman, J. E., Yen, S. H., Chiu, F. C., ve Peress, N. S. (1983). Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. Science, 221(4615), 1082–1084. https://doi.org/10.1126/science.6308771

Gorenberg, E. L., ve Chandra, S. S. (2017). The role of co-chaperones in synaptic proteostasis and neurodegenerative disease. Frontiers in Neuroscience, 11(MAY). https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00248

Gotoh, K., Nonoguchi, K., Higashitsuji, H., Kaneko, Y., Sakurai, T., Sumitomo, Y., Itoh, K., Subjeck, J. R., ve Fujita, J. (2004). Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp110 and is overexpressed in hepatocellular carcinomas. FEBS Letters, 560(1–3), 19–24. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00034-1

Grazia Spillantini, M., Anthony Crowther, R., Jakes, R., Cairns, N. J., Lantos, P. L., ve Goedert, M. (1998). Filamentous α-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Neuroscience Letters, 251(3), 205–208. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00504-7

Guo, J. L., ve Lee, V. M. Y. (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. Nature Medicine, 20(2), 130–138. https://doi.org/10.1038/nm.3457

Halliday, G., McCann, H., ve Shepherd, C. (2012). Evaluation of the Braak hypothesis: How far can it explain the pathogenesis of Parkinson's disease? Expert Review of Neurotherapeutics, 12(6), 673–686. https://doi.org/10.1586/ern.12.47

Hamilton, R. L. (2000). Lewy bodies in Alzheimer's Disease: A neuropathological review of 145 cases using α-synuclein immunohistochemistry. Brain Pathology, 10(3), 378–384. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00269.x

Hansen, C., Angot, E., Bergström, A. L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T. F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J. Y., ve Brundin, P. (2011). α-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. Journal of Clinical Investigation, 121(2), 715–725. https://doi.org/10.1172/JCI43366

Hansen, C., ve Li, J. Y. (2012). Beyond α-synuclein transfer: Pathology propagation in Parkinson's disease. Trends in Molecular Medicine, 18(5), 248–255. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.002

Hartl, F. U., Bracher, A., ve Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature, 475(7356), 324–332. https://doi.org/10.1038/nature10317

Hawkes, C. H. (2008). The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: Does it exist and if so how long is it? Movement Disorders, 23(13), 1799–1807. https://doi.org/10.1002/mds.22242

Hely, M. A., Reid, W. G. J., Adena, M. A., Halliday, G. M., ve Morris, J. G. L. (2008). The Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. Movement Disorders, 23(6), 837–844. https://doi.org/10.1002/mds.21956

Hijaz, B. A., ve Volpicelli-Daley, L. A. (2020). Initiation and propagation of α-synuclein aggregation in the nervous system. Molecular Neurodegeneration, 15(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6

Hirokawa, N., Niwa, S., ve Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Neuron, 68(4), 610–638. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.039

Hirokawa, N., Pfister, K. K., Yorifuji, H., Wagner, M. C., Brady, S. T., ve Bloom, G. S. (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. Cell, 56(5), 867–878. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90691-0

Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., ve Pringsheim, T. (2016). The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Neuroepidemiology, 46(4), 292–300. https://doi.org/10.1159/000445751

Holmes, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M. O., Brodsky, F. M., Marasa, J., Bagchi, D. P., Kotzbauer, P. T., Miller, T. M., Papy-Garcia, D., ve Diamond, M. I. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(33). https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110

Honrath, B., Metz, I., Bendridi, N., Rieusset, J., Culmsee, C., ve Dolga, A. M. (2017). Glucose-regulated protein 75 determines ER–mitochondrial coupling and sensitivity to oxidative stress in neuronal cells. Cell Death Discovery, 3(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.76

Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodavsky, I., ve Taraboulos, A. (2005). Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. Journal of Biological Chemistry, 280(17), 17062–17067. https://doi.org/10.1074/jbc.M500122200

Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., ve Jovin, T. M. (2004). Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on α-synuclein aggregation in vitro. Biochemistry, 43(51), 16233–16242. https://doi.org/10.1021/bi048453u

Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., ve Masliah, E. (2000). α-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. American Journal of Pathology, 157(2), 401–410. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64553-1

Ihse, E., Yamakado, H., Van Wijk, X. M., Lawrence, R., Esko, J. D., ve Masliah, E. (2017). Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. Scientific Reports, 7(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08720-5

Ironside, J. W., Ritchie, D. L., ve Head, M. W. (2018). Prion diseases. Içinde Handbook of Clinical Neurology (C. 145, ss. 393–403). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00028-6

Iwai, A. (2000). Properties of NACP/α-synuclein and its role in Alzheimer's disease. Içinde Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease (C. 1502, Sayı 1, ss. 95–109). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00036-3

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., Rohan de Silva, H. A., Kittel, A., ve Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-Aβ component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. Neuron, 14(2), 467–475. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90302-X

Jarrett, J. T., ve Lansbury, P. T. (1992). Amyloid Fibril Formation Requires a Chemically Discriminating Nucleation Event: Studies of an Amyloidogenic Sequence from the Bacterial Protein OsmB. Biochemistry, 31(49), 12345–12352. https://doi.org/10.1021/bi00164a008

Jensen, P. H., Hager, H., Nielsen, M. S., Højrup, P., Gliemann, J., ve Jakes, R. (1999). α-synuclein binds to tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. Journal of Biological Chemistry, 274(36), 25481–25489. https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25481

Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B. K., Rosen, C., ve Shi, Y. E. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. Cancer Research, 57(4), 759–764.

Jo, E., McLaurin, J., Yip, C. M., St George-Hyslop, P., ve Fraser, P. E. (2000). Synuclein Membrane Interactions and Lipid Specificity*. https://doi.org/10.1074/jbc.M004345200

Junn, E., ve Mouradian, M. M. (2002). Human α-Synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. Neuroscience Letters, 320(3), 146–150. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00016-2

Kakita, A., Takahashi, H., Homma, Y., ve Ikuta, F. (1994). Lewy bodies in the cerebellar dentate nucleus of a patient with Parkinson's disease. Içinde Pathology International (C. 44, Sayı 12, ss. 878–880). Pathol Int. https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1994.tb01688.x

Kalaitzakis, M. E., Graeber, M. B., Gentleman, S. M., ve Pearce, R. K. B. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: A critical analysis of α-synuclein staging. Neuropathology and Applied Neurobiology, 34(3), 284–295. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00923.x

Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., ve Goldstein, L. S. B. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. Neuron, 28(2), 449–459. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00124-0

Kanai, Y., Dohmae, N., ve Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule. Neuron, 43(4), 513–525. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.022

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., ve Hudspeth, A. J. (2013). PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE (5. baskı).

Kara, E., Marks, J. D., ve Aguzzi, A. (2018). Toxic Protein Spread in Neurodegeneration: Reality versus Fantasy. Trends in Molecular Medicine, 24(12), 1007–1020. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.09.004

Kim, S., Kwon, S. H., Kam, T. I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Lee, J. H., Kim, W. R., Kook, M., Foss, C. A., Shen, C., Lee, H., Kulkarni, S., Pasricha, P. J., Lee, G., Pomper, M. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ve Ko, H. S. (2019). Transneuronal Propagation of Pathologic α-Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. Neuron, 103(4), 627-641.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.035

Kaneko, Y., Kimura, T., Kishishita, M., Noda, Y., ve Fujita, J. (1997). Cloning of apg-2 encoding a novel member of heat shock protein 110 family. Gene, 189(1), 19–24. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00807-4

Konno, M., Hasegawa, T., Baba, T., Miura, E., Sugeno, N., Kikuchi, A., Fiesel, F. C., Sasaki, T., Aoki, M., Itoyama, Y., ve Takeda, A. (2012). Suppression of dynamin GTPase decreases -synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: A potent therapeutic target for synucleinopathy. Molecular Neurodegeneration, 7(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-38

Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., ve Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. Nature Medicine, 14(5), 504–506. https://doi.org/10.1038/nm1747

Kordower, J. H., Goetz, C. G., Freeman, T. B., ve Olanow, C. W. (1997). Dopaminergic transplants in patients with Parkinson's disease: Neuroanatomical correlates of clinical recovery. Experimental Neurology, 144(1), 41–46. https://doi.org/10.1006/exnr.1996.6386

Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., ve Riess, O. (1998). AlaSOPro mutation in the gene encoding α-synuclein in Parkinson's disease. Nature Genetics, 18(2), 106–108. https://doi.org/10.1038/ng0298-106

Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M., ve Ihara, Y. (1988). Lewy bodies are ubiquitinated. Acta Neuropathologica, 75(4), 345–353. https://doi.org/10.1007/bf00687787

Lackie, R. E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V. G., Marques-Lopes, J., Choy, W. Y., Duennwald, M. L., Prado, V. F., ve Prado, M. A. M. (2017). The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. Frontiers in Neuroscience, 11(MAY), 1–23. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00254

Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J., ve Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science, 219(4587), 979–980. https://doi.org/10.1126/science.6823561

Larsen, K. E., Schmitz, Y., Troyer, M. D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A. Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., Stefanis, L., ve Sulzer, D. (2006). α-Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. Journal of

Neuroscience, 26(46), 11915–11922. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3821-06.2006

Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S. B., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., Reddy, A. S. N., Saxton, W. M., Schliwa, M., Scholey, J. M., … Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. Journal of Cell Biology, 167(1), 19–22. https://doi.org/10.1083/jcb.200408113

Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., Verny, C., ve Brice, A. (2013). G51D α-synuclein mutation causes a novel Parkinsonian-pyramidal syndrome. Annals of Neurology, 73(4), 459–471. https://doi.org/10.1002/ana.23894

Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., ve Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nature Medicine, 14(5), 501–503. https://doi.org/10.1038/nm1746

Li, W. W., Yang, R., Guo, J. C., Ren, H. M., Zha, X. L., Cheng, J. S., ve Cai, D. F. (2007). Localization of α-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. NeuroReport, 18(15), 1543–1546. https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282f03db4

Li, X. Y., Yang, W., Li, X., Li, X. R., Li, W., Song, Q., Sun, L., Lin, F., Chen, Z., Wang, C., ve Yu, S. (2020). Phosphorylated Alpha-Synuclein in Red Blood Cells as a Potential Diagnostic Biomarker for Multiple System Atrophy: A Pilot Study. Parkinson's Disease, 2020. https://doi.org/10.1155/2020/8740419

Li, Y. H., Gao, N., Ye, Y. W., Li, X., Yu, S., Yang, H., Uéda, K., ve Chan, P. (2011). α-Synuclein functions as a negative regulator for expression of tyrosine hydroxylase. Acta Neurologica Belgica, 111(2), 130–135.

Lin, C. H., Lin, J. W., Liu, Y. C., Chang, C. H., ve Wu, R. M. (2015). Risk of Parkinson's disease following anxiety disorders: A nationwide population-based cohort study. European Journal of Neurology, 22(9), 1280–1287. https://doi.org/10.1111/ene.12740

Liu, G., Tian, C., Gao, L., Cao, Z., ve Feng, T. (2019). Alpha-synuclein in erythrocyte membrane of patients with multiple system atrophy: A pilot study. Parkinsonism and

Related Disorders, 60(May), 105–110. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.09.012

Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., ve Tycko, R. (2013). XMolecular structure of β-amyloid fibrils in alzheimer's disease brain tissue. Cell, 154(6), 1257. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.035

Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., ve Lee, V. M. Y. (2012). Pathological α-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. Science, 338(6109), 949–953. https://doi.org/10.1126/science.1227157

Maday, S., Twelvetrees, A. E., Moughamian, A. J., ve Holzbaur, E. L. F. (2014). Axonal Transport: Cargo-Specific Mechanisms of Motility and Regulation. Neuron, 84(2), 292–309. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.019

Mandemakers, W., Morais, V. A., ve De Strooper, B. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. Journal of Cell Science, 120(10), 1707–1716. https://doi.org/10.1242/jcs.03443

Mao, X., Ou, M. T., Karuppagounder, S. S., Kam, T. I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G. E., Brahmachari, S., Shin, J. H., Kang, H. C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S. A., Kang, S. U., Gonçalves, R. A., Liang, Y., … Dawson, T. M. (2016). Pathological α-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. Science, 353(6307). https://doi.org/10.1126/science.aah3374

Maroteaux, L., Campanelli, J. T., ve Scheller, R. H. (1988). Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. Journal of Neuroscience, 8(8), 2804–2815. https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988

Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D. M. A., ve Hasegawa, M. (2013). Prion-like spreading of pathological α-synuclein in brain. Brain, 136(4), 1128–1138. https://doi.org/10.1093/brain/awt037

McLean, P. J., Kawamata, H., Shariff, S., Hewett, J., Sharma, N., Ueda, K., Breakefield, X. O., ve Hyman, B. T. (2002). TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: Suppression of α-synuclein aggregation. Journal of Neurochemistry, 83(4), 846–854. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01190.x

McNaught, K. S. P., Shashidharan, P., Perl, D. P., Jenner, P., ve Olanow, C. W. (2002). Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. European Journal of Neuroscience, 16(11), 2136–2148. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02301.x

Meade, R. M., Fairlie, D. P., ve Mason, J. M. (2019). Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease - Lessons and emerging principles. Içinde Molecular Neurodegeneration (C. 14, Sayı 1, ss. 1–14). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13024-019-0329-1

Mendez, I., Sanchez-Pernaute, R., Cooper, O., Viñuela, A., Ferrari, D., Björklund, L., Dagher, A., ve Isacson, O. (2005). Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. Brain, 128(7), 1498–1510. https://doi.org/10.1093/brain/awh510

Meuvis, J., Gerard, M., Desender, L., Baekelandt, V., ve Engelborghs, Y. (2010). The conformation and the aggregation kinetics of α-synuclein depend on the proline residues in its C-terminal region. Biochemistry, 49(43), 9345–9352. https://doi.org/10.1021/bi1010927

Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., ve Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(13), 7004–7011. https://doi.org/10.1073/pnas.111145398

Mohamed, B. A., Barakat, A. Z., Zimmermann, W. H., Bittner, R. E., Mühlfeld, C., Hünlich, M., Engel, W., Maier, L. S., ve Adham, I. M. (2012). Targeted disruption of Hspa4 gene leads to cardiac hypertrophy and fibrosis. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 53(4), 459–468. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.07.014

Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., ve Lee, V. M. Y. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and α-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. Journal of Neuroscience, 20(9), 3214–3220. https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-09-03214.2000

Nakajo, S., Omata, K., Aiuchi, T., Shibayama, T., Okahashi, I., Ochiai, H., Nakai, Y., Nakaya, K., ve Nakamura, Y. (1990). Purification and Characterization of a Novel Brain-Specific 14-kDa Protein. Journal of Neurochemistry, 55(6), 2031–2038. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb05792.x

Nègre-Pagès, L., Regragui, W., Bouhassira, D., Grandjean, H., ve Rascol, O. (2008). Chronic pain in Parkinson's disease: The cross-sectional French DoPaMiP survey. Movement Disorders, 23(10), 1361–1369. https://doi.org/10.1002/mds.22142

Ninkina, N. N., Alimova-Kost, M. V., Paterson, J. W. E., Delaney, L., Cohen, B. B., Imreh, S., Gnuchev, N. V., Davies, A. M., ve Buchman, V. L. (1998). Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene. Human Molecular Genetics, 7(9), 1417–1424. https://doi.org/10.1093/hmg/7.9.1417

Ohama, E., ve Ikuta, F. (1976). Parkinson's disease: Distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. Acta Neuropathologica, 34(4), 311–319. https://doi.org/10.1007/BF00696560

Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., Meijer, L., Kahle, P. J., ve Haass, C. (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated α- synuclein. Journal of Biological Chemistry, 275(1), 390–397. https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.390

Olanow, C. W., ve Brundin, P. (2013). Parkinson's Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? Movement Disorders, 28(1), 31–40. https://doi.org/10.1002/mds.25373

Olanow, C. W., ve Prusiner, S. B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(31), 12571–12572. https://doi.org/10.1073/pnas.0906759106

Olanow, C. W., Schapira, A. H. V., ve Roth, T. (2000). Waking up to sleep episodes in Parkinson's Disease. Movement Disorders, 15(2), 212–215. https://doi.org/10.1002/1531-8257(200003)15:2<212::AID-MDS1002>3.0.CO;2-6

Outeiro, T. F., Klucken, J., Strathearn, K. E., Liu, F., Nguyen, P., Rochet, J. C., Hyman, B. T., ve McLean, P. J. (2006). Small heat shock proteins protect against α-synuclein-induced toxicity and aggregation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 351(3), 631–638. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.085

Pearce, R. K. B., Hawkes, C. H., ve Daniel, S. E. (1995). The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. Movement Disorders, 10(3), 283–287. https://doi.org/10.1002/mds.870100309

Peelaerts, W., Bousset, L., Van Der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van Den Haute, C., Melki, R., ve Baekelandt, V. (2015). α-Synuclein strains cause

distinct synucleinopathies after local and systemic administration. Nature, 522(7556), 340–344. https://doi.org/10.1038/nature14547

Pemberton, S., Madiona, K., Pieri, L., Kabani, M., Bousset, L., ve Melki, R. (2011). Hsc70 protein interaction with soluble and fibrillar α-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 286(40), 34690–34699. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261321

Pfeiffer, R. F. (2011). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. Içinde Parkinsonism and Related Disorders (C. 17, Sayı 1, ss. 10–15). https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.08.003

Piccini, P., Brooks, D. J., Björklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., ve Lindvall, O. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. Nature Neuroscience, 2(12), 1137–1140. https://doi.org/10.1038/16060

Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L., ve Melki, R. (2012). Fibrillar α-synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. Biophysical Journal, 102(12), 2894–2905. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.050

Pieri, L., Madiona, K., ve Melki, R. (2016). Structural and functional properties of prefibrillar α-synuclein oligomers. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/srep24526

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., ve Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. Nature Reviews Disease Primers, 3(1), 1–21. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., ve Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science, 276(5321), 2045–2047. https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045

Postuma, R., ve Gagnon, J. F. (2010). Cognition and olfaction in Parkinson's disease. Brain, 133(12), 1–2. https://doi.org/10.1093/brain/awq225

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science, 216(4542), 136–144. https://doi.org/10.1126/science.6801762

Putcha, P., Danzer, K. M., Kranich, L. R., Scott, A., Silinski, M., Mabbett, S., Hicks, C. D., Veal, J. M., Steed, P. M., Hyman, B. T., ve McLean, P. J. (2010). Brain-permeable

small-molecule inhibitors of Hsp90 prevent α-synuclein oligomer formation and rescue α-synuclein-induced toxicity. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 332(3), 849–857. https://doi.org/10.1124/jpet.109.158436

Puoti, G., Bizzi, A., Forloni, G., Safar, J. G., Tagliavini, F., ve Gambetti, P. (2012). Sporadic human prion diseases: Molecular insights and diagnosis. The Lancet Neurology, 11(7), 618–628. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70063-7

Rassow, J. (1995). Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. Trends in Cell Biology, 5(5), 207–212. https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)89001-7

Reijnders, J. S. A. M., Ehrt, U., Weber, W. E. J., Aarsland, D., ve Leentjens, A. F. G. (2008). A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. Içinde Movement Disorders (C. 23, Sayı 2, ss. 183–189). Mov Disord. https://doi.org/10.1002/mds.21803

Rekas, A., Adda, C. G., Andrew Aquilina, J., Barnham, K. J., Sunde, M., Galatis, D., Williamson, N. A., Masters, C. L., Anders, R. F., Robinson, C. V., Cappai, R., ve Carver, J. A. (2004). Interaction of the molecular chaperone αB-crystallin with α-Synuclein: Effects on amyloid fibril formation and chaperone activity. Journal of Molecular Biology, 340(5), 1167–1183. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.054

Rekas, A., Jankova, L., Thorn, D. C., Cappai, R., ve Carver, J. A. (2007). Monitoring the prevention of amyloid fibril formation by α-crystallin: Temperature dependence and the nature of the aggregating species. FEBS Journal, 274(24), 6290–6304. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06144.x

Rodriguez, L., Marano, M. M., ve Tandon, A. (2018). Import and export of misfolded α-synuclein. Frontiers in Neuroscience, 12(MAY), 1–9. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00344

Roy, S. (2014). Seeing the unseen: The hidden world of slow axonal transport. Neuroscientist, 20(1), 71–81. https://doi.org/10.1177/1073858413498306

Sacino, A. N., Thomas, M. A., Ceballos-Diaz, C., Cruz, P. E., Rosario, A. M., Lewis, J., Giasson, B. I., ve Golde, T. E. (2013). Conformational templating of α-synuclein aggregates in neuronal-glial cultures. Molecular Neurodegeneration, 8(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-17

Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14(10), 630–642. https://doi.org/10.1038/nrm3658

Sanders, D. W., Kaufman, S. K., Holmes, B. B., ve Diamond, M. I. (2016). Prions and Protein Assemblies that Convey Biological Information in Health and Disease. Neuron, 89(3), 433–448. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.026

Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., ve Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. Nature Reviews Neuroscience, 18(7), 435–450. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62

Schaser, A. J., Osterberg, V. R., Dent, S. E., Stackhouse, T. L., Wakeham, C. M., Boutros, S. W., Weston, L. J., Owen, N., Weissman, T. A., Luna, E., Raber, J., Luk, K. C., McCullough, A. K., Woltjer, R. L., ve Unni, V. K. (2019). Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. Scientific reports, 9(1), 10919. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47227-z

Scheckel, C., ve Aguzzi, A. (2018). Prions, prionoids and protein misfolding disorders. Nature Reviews Genetics, 19(7), 405–418. https://doi.org/10.1038/s41576-018-0011-4

Scherzer, C. R., Grass, J. A., Liao, Z., Pepivani, I., Zheng, B., Eklund, A. C., Ney, P. A., Ng, J., McGoldrick, M., Mollenhauer, B., Bresnick, E. H., ve Schlossmacher, M. G. (2008). GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene α-synuclein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(31), 10907–10912. https://doi.org/10.1073/pnas.0802437105

Schipper, H. M., Song, W., Tavitian, A., ve Cressatti, M. (2019). The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease. Progress in Neurobiology, 172(June), 40–70. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.008

Schmidt, M. L., Murray, J., Lee, V. M. Y., Hill, W. D., Wertkin, A., ve Trojanowski, J. Q. (1991). Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. American Journal of Pathology, 139(1), 53–65. /pmc/articles/PMC1886123/?report=abstract

Scott, D. A., Das, U., Tang, Y., ve Roy, S. (2011). Mechanistic Logic Underlying the Axonal Transport of Cytosolic Proteins. Neuron, 70(3), 441–454. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.022

Shahnawaz, M., Mukherjee, A., Pritzkow, S., Mendez, N., Rabadia, P., Liu, X., Hu, B., Schmeichel, A., Singer, W., Wu, G., Tsai, A. L., Shirani, H., Nilsson, K. P. R., Low, P. A., ve Soto, C. (2020). Discriminating α-synuclein strains in Parkinson's disease

and multiple system atrophy. Nature, 578(7794), 273–277. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1984-7

Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M. P., Walsh, D. M., Hamilton, J. A., ve Selkoe, D. J. (2003). The formation of highly soluble oligomers of α-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. Neuron, 37(4), 583–595. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00024-2

Sharp, F. R., Zhan, X., ve Liu, D. Z. (2013). Heat Shock Proteins in the Brain: Role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and Their Therapeutic Potential. Translational Stroke Research, 4(6), 685–692. https://doi.org/10.1007/s12975-013-0271-4

Sheftic, S. R., Croke, R. L., LaRochelle, J. R., ve Alexandrescu, A. T. (2009). Electrostatic contributions to the stabilities of native proteins and amyloid complexes. Methods in enzymology, 466, 233–258. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(09)66010-9

Shrivastava, A. N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L. G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Léna, C., Aperia, A., Melki, R., ve Triller, A. (2015). K + -ATPase and impair Na + gradient. The EMBO Journal, 34(19), 2408–2423.

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., ve Goedert, M. (1997). α-synuclein in Lewy bodies [8]. Içinde Nature (C. 388, Sayı 6645, ss. 839–840). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/42166

Sun, F., Zhu, C., Dixit, R., ve Cavalli, V. (2011). Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. EMBO Journal, 30(16), 3416–3429. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.229

Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., ve Blake, C. C. F. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. Journal of Molecular Biology, 273(3), 729–739. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1348

Surguchev, A. A., ve Surguchov, A. (2017). Synucleins and gene expression: Ramblers in a crowd or cops regulating traffic? Frontiers in Molecular Neuroscience, 10(July), 1–11. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00224

Surmeier, D. J., Obeso, J. A., ve Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. Nature Reviews Neuroscience, 18(2), 101–113. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178

Swant, J., Goodwin, J. S., North, A., Ali, A. A., Gamble-George, J., Chirwa, S., ve Khoshbouei, H. (2011). A-Synuclein Stimulates a Dopamine Transporter-Dependent Chloride Current and Modulates the Activity of the Transporter. Journal of Biological Chemistry, 286(51), 43933–43943. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241232

Takeda, A., Mallory, M., Sundsmo, M., Honer, W., Hansen, L., ve Masliah, E. (1998). Abnormal accumulation of NACP/α-synuclein in neurodegenerative disorders. American Journal of Pathology, 152(2), 367–372.

Tang, J., Ae, G., Qi, A., Ae, C., Kong, Q., Hua, A. E., Ae, Z., Mei, C., Ae, M., Qin, C., Guo, J. T., Chen, Á. A. Q., Kong, Á. Q., Zhu, Á. H., Ma, Á. C. M., Qin, Á. C., ve Chen, A. Q. (2008). Inhibition of Vesicular Monoamine Transporter-2 Activity in a-Synuclein Stably Transfected SH-SY5Y Cells. Cell Mol Neurobiol, 28, 35–47. https://doi.org/10.1007/s10571-007-9227-0

Tehranian, R., Montoya, S. E., Van Laar, A. D., Hastings, T. G., ve Perez, R. G. (2006). Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. Journal of Neurochemistry, 99(4), 1188–1196. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04146.x

Terada, S., Kinjo, M., Aihara, M., Takei, Y., ve Hirokawa, N. (2010). Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. EMBO Journal, 29(4), 843–854. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.389

Thayanidhi, N., Helm, J. R., Nycz, D. C., Bentley, M., Liang, Y., ve Hay, J. C. (2010). α-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. Molecular Biology of the Cell, 21(11), 1850–1863. https://doi.org/10.1091/mbc.E09-09-0801

Theillet, F. X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H. M., Stuiver, M., Verzini, S., Lorenz, D., Van Rossum, M., Goldfarb, D., ve Selenko, P. (2016). Structural disorder of monomeric α-synuclein persists in mammalian cells. Nature, 530(7588), 45–50. https://doi.org/10.1038/nature16531

Tobe, T., Nakajo, S., Tanaka, A., Mitoya, A., Omata, K., Nakaya, K., Tomita, M., ve Nakamura, Y. (1992). Cloning and Characterization of the cDNA Encoding a Novel Brain-Specific 14-kDa Protein. Journal of Neurochemistry, 59(5), 1624–1629. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10991.x

Trexler, A. J., ve Rhoades, E. (2009). α-Synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. Biochemistry, 48(11), 2304–2306. https://doi.org/10.1021/bi900114z

Tsujimura, A., Taguchi, K., Watanabe, Y., Tatebe, H., Tokuda, T., Mizuno, T., ve Tanaka, M. (2015). Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous α-synuclein fibrils. Neurobiology of Disease, 73, 244–253. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.011

Tu, P. H., Galvin, J. E., Baba, M., Giasson, B., Tomita, T., Leight, S., Nakajo, S., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., ve Lee, V. M. Y. (1998). Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble α-synuclein. Annals of Neurology, 44(3), 415–422. https://doi.org/10.1002/ana.410440324

Tycko, R. (2015). Amyloid Polymorphism: Structural Basis and Neurobiological Relevance. Neuron, 86(3), 632–645. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.017

Tysnes, O. B., ve Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. Içinde Journal of Neural Transmission (C. 124, Sayı 8, ss. 901–905). Springer-Verlag Wien. https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y

Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A. C., Kondo, J., Ihara, Y., ve Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(23), 11282–11286. https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11282

Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., ve Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 280(10), 9595–9603. https://doi.org/10.1074/jbc.M411805200

Ulusoy, A., Phillips, R. J., Helwig, M., Klinkenberg, M., Powley, T. L., ve Di Monte, D. A. (2017). Brain-to-stomach transfer of α-synuclein via vagal preganglionic projections. Acta Neuropathologica, 133(3), 381–393. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1661-y

Uryu, K., Richter-Landsberg, C., Welch, W., Sun, E., Goldbaum, O., Norris, E. H., Pham, C. T., Yazawa, I., Hilburger, K., Micsenyi, M., Giasson, B. I., Bonini, N. M., Lee, V. M. Y., ve Trojanowski, J. Q. (2006). Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous α-synuclein inclusions of α-synucleinopathies. American Journal of Pathology, 168(3), 947–961. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050770

Vale, R. D., Reese, T. S., ve Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell, 42(1), 39–50. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80099-4

Venda, L. L., Cragg, S. J., Buchman, V. L., ve Wade-Martins, R. (2010). α-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. Trends in Neurosciences, 33(12), 559–568. https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.09.004

Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q., ve Lee, V. M. Y. (2011). Exogenous α-Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. Neuron, 72(1), 57–71. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033

Wakabayashi, K., Hansen, L. A., ve Masliah, E. (1995). Cortical Lewy body-containing neurons are pyramidal cells: laser confocal imaging of double-immunolabeled sections with anti-ubiquitin and SMI32. Acta Neuropathologica, 89(5), 404–408. https://doi.org/10.1007/BF00307643

Wakabayashi, K., Hayashi, S., Kakita, A., Yamada, M., Toyoshima, Y., Yoshimoto, M., ve Takahashi, H. (1998). Accumulation of α-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. Acta Neuropathologica, 96(5), 445–452. https://doi.org/10.1007/s004010050918

Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., ve Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. Içinde Molecular neurobiology (C. 47, Sayı 2, ss. 495–508). https://doi.org/10.1007/s12035-012-8280-y

Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L. T. T., Liao, J., Auclair, J. R., Johnson, D., Landeru, A., Simorellis, A. K., Ju, S., Cookson, M. R., Asturias, F. J., Agar, J. N., Webb, B. N., Kang, C. H., Ringe, D., Petsko, G. A., Pochapsky, T. C., ve Hoang, Q. Q. (2011). A soluble α-synuclein construct forms a dynamic tetramer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(43), 17797–17802. https://doi.org/10.1073/pnas.1113260108

Waudby, C. A., Knowles, T. P. J., Devlin, G. L., Skepper, J. N., Ecroyd, H., Carver, J. A., Welland, M. E., Christodoulou, J., Dobson, C. M., ve Meehan, S. (2010). The interaction of αB-crystallin with mature α-synuclein amyloid fibrils inhibits their elongation. Biophysical Journal, 98(5), 843–851. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.10.056

Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., ve Lansbury, P. T. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry, 35(43), 13709–13715. https://doi.org/10.1021/bi961799n

Wells, C., Brennan, S. E., Keon, M., ve Saksena, N. K. (2019). Prionoid Proteins in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. Frontiers in Molecular Neuroscience, 12(November), 1–24. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00271

Whitley, D., Goldberg, S. P., ve Jordan, W. D. (1999). Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. Journal of Vascular Surgery, 29(4), 748–751. https://doi.org/10.1016/S0741-5214(99)70329-0

Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., ve Riek, R. (2011). In vivo demonstration that α-synuclein oligomers are toxic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(10), 4194–4199. https://doi.org/10.1073/pnas.1100976108

Wong, Y. C., ve Krainc, D. (2017). α-synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies. Içinde Nature Medicine (C. 23, Sayı 2, ss. 1–13). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nm.4269

Wu, C. W., Tessier, S. N., ve Storey, K. B. (2020). Dehydration stress alters the mitogen-activated-protein kinase signaling and chaperone stress response in Xenopus laevis. Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology, 246–247(April), 110461. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110461

Wu, K. P., Kim, S., Fela, D. A., ve Baum, J. (2008). Characterization of Conformational and Dynamic Properties of Natively Unfolded Human and Mouse α-Synuclein Ensembles by NMR: Implication for Aggregation. Journal of Molecular Biology, 378(5), 1104–1115. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.017

Yu, S., Uéda, K., ve Chan, P. (2005). A-Synuclein and Dopamine Metabolism. Molecular Neurobiology, 31(1–3), 243–254. https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:243

Zarbiv, Y., Simhi-Haham, D., Israeli, E., Elhadi, S. A., Grigoletto, J., ve Sharon, R. (2014). Lysine residues at the first and second KTKEGV repeats mediate α-Synuclein binding to membrane phospholipids. Neurobiology of Disease, 70, 90–98. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.031

Zarranz, J. J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Tortosa, E. G., del Ser, T., Muñoz, D. G., ve de Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of α-synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. Annals of Neurology, 55(2), 164–173. https://doi.org/10.1002/ana.10795

Zhang, J., Li, X., ve Li, J. Da. (2019). The Roles of Post-translational Modifications on α-Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. Frontiers in Neuroscience, 13(APR), 1–11. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00381

Zhang, X., Wesén, E., Kumar, R., Bernson, D., Gallud, A., Paul, A., Wittung-Stafshede, P., ve Esbjörner, E. K. (2020). Correlation between Cellular Uptake and Cytotoxicity of Fragmented α-Synuclein Amyloid Fibrils Suggests Intracellular Basis for Toxicity. ACS Chemical Neuroscience, 11(3), 233–241. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00562

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FİBRİLER ALFA-SİNÜKLEİNİN HÜCRE İÇİ TAŞINIM VE HÜCRE DIŞINA SALINIMINDA ŞAPERONLARIN ROLÜNÜN NÖRONA FARKLILAŞTIRILMIŞ HÜCRELERDE ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%3	%3	%1	%1
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
3	acikerisim.kirklareli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
6	www.fizyoterapirehabilitasyon.org İnternet Kaynağı	<%1
7	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1
8	cdn.istanbul.edu.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tugay	**Soyadı**	Çamoğlu
Doğ.Yeri	Çaybaşı	**Doğ.Tar.**	29/07/1991
Uyruğu	Türkiye	**TC Kim No**	45367757778
Email	tc.tugaycamoglu@gmail.com	**Tel**	05394198777

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2016
Lise	Esenyurt Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
	Proje Uzmanı	İstanbul Üniversitesi	1-2020

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**YDS Puanı**
İngilizce	Çok iyi	orta	iyi		77,5

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
ALES Puanı	76,32	72,54	59,89

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft office word, excel, powerpoint	Çok iyi
Graphpad prism 8	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyler Yerel Etik Kurulu (HADYEK), 2019

Sinirbilim Konferansı katılım sertifikası; İstanbul Üniversitesi Sinirbilim Kulübü, 2015