T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

# DOKTORA TEZİ

# İNSAN ASTROSİTİ KAYNAKLI A-SİNÜKLEİN ARTIŞININ, TROFİK FAKTÖR SALINIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN NÖRON-ASTROSİT SİNAPTİK BİLEŞENLERİ VE NÖRODEJENERASYON AÇISINDAN İNCELENMESİ

**Büşra ŞENGÜL YEDİEL**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. Duygu GEZEN-AK**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tıbbi Biyoloji Programı**

**Mart, 2023**

Annem Zehra Şengül ve Babam Hasan Şengül'e ithaf ediyorum…

# BÜTÇE DESTEKLERİ

## İNSAN ASTROSİTİ KAYNAKLI A-SİNÜKLEİN ARTIŞININ, TROFİK FAKTÖR SALINIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN NÖRON-ASTROSİT SİNAPTİK BİLEŞENLERİ VE NÖRODEJENERASYON AÇISINDAN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimlerim ile bu çalışma dahil yer aldığım tüm çalışmalar ve hayatım ile ilgili her türlü konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen, bugünlere gelmemi sağlayan bilgileri bana öğreten ve her zaman yol gösteren, kişiliği, iş sorumluluğu, disiplini ve başarılarıyla kendime örnek aldığım, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım danışmanım Prof. Dr. Duygu GEZEN-AK'a, gerek eğitimim gerekse tezimde bilgileriyle beni her zaman aydınlatan ve yol gösteren, bana her türlü konuda yardım eden Prof. Dr. Erdinç DURSUN'a ve çalışmamda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, beni her durumda motive eden, çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, dostluğu ve yardım severliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşı olan Dr. Öğr. Üyesi Merve ALAYLIOĞLU'na ve tez çalışmam boyunca benden yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım MSc. Ebru KESKİN, MSc. Pelin SORDU, M.Sc. Zuhal YURTTAŞ, M.Sc. Tugay ÇAMOĞLU, M.Sc. Bilgenur Bilge, B.Sc. Nazlıcan İLHAN, B.Sc. Sümeyra ILDIZ, B.Sc. Buse ÜNLÜ'ye teşekkür ederim.

Uzun yıllar boyunca beni destekleyen, her türlü konuda bana yardımcı olan ve yalnız bırakmayan sevgili eşim Oğuzhan YEDİEL'e, hayatımın her anında yanımda olan, manevi ve maddi olarak her konuda desteğini benden esirgemeyen, her türlü zorluğa karşı beni koruyup kollayan, sevgilerini tüm kalbimle hissettiğim sevgili annem Zehra ŞENGÜL ve sevgili babam Hasan ŞENGÜL'e, en sıkıntılı anlarımda yanımda olan ve beni güldürmeyi başaran sevgili kardeşim Enes Furkan ŞENGÜL'e, bütün zor zamanlarımda varlığıyla bana güç veren teyzem Hatice GÜNDOĞDU'ya ve benim bu yola baş koymama vesile olan rahmetli dedem Hasan GÜNDOĞDU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mart 2023 Büşra ŞENGÜL YEDİEL

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No**

**1. GİRİŞ ..... 1**
**2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE ..... 4**
1.1. Sinüklein Ailesi ..... 4
1.1.1. Alfa-Sinükleinopatiler ..... 7
1.1.2. Alfa-Sinüklein ..... 10
1.1.3. Alfa-Sinüklein Fonksiyonları ..... 14
1.1.4. Alfa-Sinüklein Birikimi ..... 18
1.1.5. Hücre Dışı Alfa-Sinüklein ..... 21
1.1.6. Astrositlerin Hücre Dışı Alfa-Sinüklein'in Alımındaki Rolü ..... 22
1.2. Astrositler ..... 25
1.2.1. Beyaz Maddede Astrosit Çeşitliliği ..... 29
1.2.2. Astrosit Fonksiyonları ..... 31
1.3. Sinaps Oluşumu ..... 34
1.4. Sinaps Oluşumunda Rol Oynayan Astrosit Faktörleri ..... 37
1.4.1. Astrositler Tarafından Üretilen Sinaps Oluşum Faktörlerinin Tipleri ve Özellikleri ..... 38
1.4.2. Trombospondinler ..... 40
1.4.3. Hevin ..... 42
1.4.4. Glipikan ..... 43
1.4.5. TGF-β ..... 44
1.4.6. BDNF ..... 45
1.5. LUHMES ..... 46
**3. YÖNTEM ..... 48**
1.6. Astrosit Kültürü Deneyleri ..... 48
1.6.1. Astrosit Kültür Medyumunun Hazırlanması ..... 49
1.6.2. Primer Astrosit Kültürü'nün Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması ..... 49
1.6.3. İnsan Astrosit Hücrelerinin Çift İmmünfloresan İşaretleme Yöntemiyle Karakterlerinin Gösterilmesi ..... 50

1.7. *SNCA* Geni Plazmidinin ve Boş Plazmidin (Mock Plazmid) Çoğaltılması ..... 51
1.7.1. Bakteriyel Transformasyon Protokolü ..... 51
1.7.2. Plazmid İzolasyon Protokolü ..... 52
1.8. İnsan Astrosit Kültüründe Gerçekleştirilen Uygulamalar ..... 53
1.8.1. Hücre Kültüründe Plazmid ile Transfeksiyon Aşamaları ..... 54
1.9. Lund İnsan Mezensefalik (LUHMES) Kültürü Deneyleri ..... 54
1.9.1. LUHMES Hücre Kültürü ..... 54
1.9.2. LUHMES Kültür Medyumunun Hazırlanması ..... 55
1.9.3. LUHMES Hücre Kültürü'nün Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması ..... 55
1.9.4. LUHMES Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılma Medyumunun Hazırlanması ..... 56
1.9.5. LUHMES Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması ..... 57
1.10. Luhmes Hücreleri ile İnsan Primer Astrositlerinin Ko-Kültürü ..... 57
1.10.1. Ko-Kültürdeki Hücrelerin Ayrımının Yapılması ..... 58
1.10.2. Astrosit- Luhmes Ko-Kültüründen Total Protein İzolasyonu ..... 59
1.10.3. Astrosit-Luhmes Ko-Kültüründen Sinaptik Protein İzolasyonu ..... 60
1.11. Western Blot Protokolü ..... 61
1.12. Sitotoksite Ölçümü ..... 63
1.13. İstatiksel Analiz ..... 64
**4. BULGULAR ..... 65**
1.14. Astrositlerin Morfolojik ve Mikroskopik Değerlendirmesi ..... 65
1.15. Farklılaştırılmış LUHMES Hücrelerinin Nöral Karakterlerinin Gösterimi ..... 67
1.16. LUHMES ve İnsan Astrositleri ile Gerçekleştirilen Ko-Kültürdeki Hücrelerin Morfolojilerinin Gösterimi ..... 69
1.17. *SNCA* Aşırı Ekspresyonu ..... 72
1.17.1. İnsan Astrositlerinin *SNCA* Genini İçeren Plazmid ile Transfeksiyonu ..... 72
1.17.2. Ko-Kültürde *SNCA* Genini İçeren Plazmid ile Transfeksiyonu ..... 73
1.18. Sitotoksite Ölçüm Sonuçları ..... 75
1.19. Western Blot Analizi İle Saptanan Protein Ekspresyon Sonuçları ..... 76
1.19.1. PSD-95'in Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler ..... 76
1.19.2. Sinaptofisin'in Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler ..... 79
1.19.3. Thrombospondin (TSP)'in Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler ..... 81
1.19.4. *SNCA*'nın Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler ..... 82
1.19.5. MSS'nin Trofik Faktörlerinden NGF'nin Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler 84
**5. TARTIŞMA ..... 86**
**6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 102**

# ŞEKİL LİSTESİ

**Sayfa No**

Şekil 2-1: Sinüklein proteinlerinin yerleşimi. ..... 5

Şekil 2-2: α-sinüklein ve ilgili proteinlerin amfipatik α-sarmal bölgelerinin karşılaştırılması. . 7

Şekil 2-3: α-sinüklein yapısı. ..... 12

Şekil 2-4: Sinapstaki α-sinükleinin fizyolojik ve patolojik konformasyonları. ..... 13

Şekil 2-5: α-sinükleinin presinaptik sinir terminalindeki fizyolojik rolü. ..... 15

Şekil 2-6: α-sinüklein monomerlerinin ve oligomerin üç boyutlu modelleri. ..... 20

Şekil 2-7: Astrositin şematik gösterimi ve farklı α-sinüklein konformerleri ile etkileşimleri. 24

Şekil 2-8: İnsan beynindeki astrositler. ..... 26

Şekil 2-9: Astrositlerin oligodendrosit hayatta kalması, farklılaşması ve miyelinasyonu üzerindeki destekleyici ve zararlı işlevleri. ..... 30

Şekil 2-10: Beyaz maddedeki temel astrositik fonksiyonlar. ..... 31

Şekil 2-11: Astrositlerden gelen sinyaller, sinaps oluşumunu ve ortadan kaldırılmasını teşvik eder. ..... 34

Şekil 2-12: Merkezi sinir sisteminde glutamaterjik sinapsların gelişimi. ..... 36

Şekil 2-13: Üçlü sinapsta astrosit işlevleri. ..... 38

Şekil 2-14: Astrosit tarafından salgılanan faktörler, uyarıcı sinaptik gelişimin farklı yönlerini kontrol eder. ..... 39

Şekil 2-15: Astrositler, sessiz, yapısal sinapsların oluşumunu indüklemek için nöronal α2δ-1'e bağlanan trombospondinleri (TSP) salgılar. ..... 41

Şekil 2-16: Astrosit salgılayan SPARC, bilinmeyen bir mekanizma yoluyla Hevin kaynaklı sinaps oluşumunu antagonize eder. ..... 43

Şekil 2-17: Astrosit tarafından salgılanan TGF-β1, NMDA reseptörü agonisti D-serin ile birlikte NMDA reseptörü aktivitesi gerektiren mekanizmalar yoluyla uyarıcı sinapsların oluşumunu teşvik eder. ..... 45

Şekil 2-18: LUHMES hücre farklılaşmasının proteomik karakterizasyonu. ..... 47

Şekil 3-1: Transfeksiyon ve transformasyonda kullanılan *SNCA* plazmidinin haritası.....53

Şekil 4-1: Işık mikroskobu altında primer insan astrositlerinin morfolojisinin gösterilmesi...65

Şekil 4-2: İki farklı astrosit belirtecinin immünfloresan işaretlenmesi ile insan astrositlerinin kültür koşullarındaki karakterlerinin gösterilmesi.....66

Şekil 4-3: İki farklı astrosit belirtecinin immünfloresan işaretlenmesi ile insan astrositlerinin kültür koşullarındaki karakterlerinin 20X büyütmede gösterilmesi.....67

Şekil 4-4: Farklılaştırılmış LUHMES hücrelerinin nöral karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.....68

Şekil 4-5: Işık mikroskobu altında ko-kültür koşullarındaki primer insan astrositlerinin ve LUHMES hücrelerinin morfolojisinin gösterilmesi.....69

Şekil 4-6: Ko-kültür koşullarında hücre karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.....70

Şekil 4-7: Ko-kültür koşullarında hücre karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.....71

Şekil 4-8 : İnsan astrositlerinde *SNCA* plazmid transfeksiyonun 72. saatte başarılı bir şekilde gerçekleştiği immün işaretleme yapılarak gösterilmiştir.....72

Şekil 4-9: İnsan astrosit kültüründe *SNCA* plazmid transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin İmmünfloresan işaretleme gösterilmesi.....73

Şekil 4-10: Ko-kültürde astrosit kaynaklı α-sinükleinin nöronlara taşındığı; plazmidin sahip olduğu GFP kuyruğu canlı hücre görüntüleme yöntemiyle takip edilerek gösterilmiştir. .....74

Şekil 4-11: Ko-kültürde *SNCA* plazmid transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin İmmünfloresan işaretleme gösterilmesi.....75

Şekil 4-12: *SNCA* genini içeren plazmid ile transfekte edilen insan astrosit hücreleri ile LUHMES hücrelerinin ko-kültüründe tüm grupların LDH miktarları.....76

Şekil 4-13: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında PSD-95 proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.....77

Şekil 4-14: Ko-Kültürden elde dilen total ve sinaptik protein izolasyonları sonucu tüm gruplarda PSD-95 proteinin ekspresyon seviyesi.....78

Şekil 4-15: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında PSD-95 proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.....78

Şekil 4-16: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında PSD-95 proteinin ekspresyon seviyesi.....79

Şekil 4-17: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Sinaptofisin proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.....80

Şekil 4-18: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Sinaptofisin proteinin ekspresyon seviyesi.....81

Şekil 4-19: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Thrombospondin (TSP) proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. .....81

Şekil 4-20: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Thrombospondin (TSP) proteinin ekspresyon seviyesi. .....82

Şekil 4-21: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında *SNCA* proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.....83

Şekil 4-22: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında *SNCA* proteinin ekspresyon seviyesi.....83

Şekil 4-23: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında NGF proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.....84

Şekil 4-24: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında NGF proteinin ekspresyon seviyesi. .....85

# TABLO LİSTESİ

**Sayfa No**

Tablo 2-1: Sinüklein genlerinin dokulardaki ekspresyonu. ..... 4

Tablo 3-1: DMEM+ medyumu içerisine eklenen maddeler. ..... 49

Tablo 3-2: Bazal LUHMES medyumu içerisine eklenen maddeler. ..... 55

Tablo 3-3: Nörona farklılaştırılma medyumunun içerisine eklenen maddeler. ..... 56

Tablo 3-4: Protein izolasyonunda kullanılan lizis tamponunun içerisine eklenen maddeler. .. 59

Tablo 3-5: Sinaptik protein izolasyonunda kullanılan sinaptik lizis tamponunun içerisine eklenen maddeler. ..... 60

Tablo 3-6: Western Blot'ta Kullanılan Primer Antikorlar ve Seyreltme Oranları ..... 61

Tablo 3-7: Western Blot'ta Kullanılan Sekonder Antikorlar ve Seyreltme Oranları ..... 62

# SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

**Simgeler** **Açıklama**

**Kısaltmalar** **Açıklama**

AH: Alzheimer hastalığı

Aldh1l1: Aldehid dehidrojenaz ailesin üyesi L1

AMPK-a: AMP ile aktive olan protein kinaz-a

α-syn: Alfa-sinüklein

ATP: Adenozin trifosfat

Aβ: Amiloid beta

AQP4: Akuaporin

APP: Amiloid öncül proteini

BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör

β- syn: Beta sinüklein

CaM: Kalmodulin

CaMKKβ: $Ca^{2+}$/kalmodulin-bağımlı protein kinaz β

CDNF: Serebral dopamin nörotrofik faktör

CNTF: Siliyer nörotrofik faktör

CSPα: Sistein dizisi protein-alfa

DAT: Dopamin taşıyıcısı

DLB: Lewy cisimcikli demans

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ER: Endoplazmik retikulum

ERK: Ekstraselüler sinyal düzenleyen kinazlar

FGF-2: Fibroblast büyüme faktörü-2

GABA: Gama aminobütürik asit

GAT-1: GABA taşıyıcısı 1

GAT-2: GABA taşıyıcısı 2

GAT-3: GABA taşıyıcısı 3

GlyTl: Glisin taşıyıcısı 1

GlyT2: Glisin taşıyıcısı 2

GFAP: Glial fibriler asidik protein

GLAST: Glutamat taşıyıcıları

GLT-1: Glutamat taşıyıcı tip 1

GLUT1: Glikoz taşıyıcı tip 1

GLUT2: Glikoz taşıyıcı tip 2

GLUT3: Glikoz taşıyıcı tip 3

ID: Özünde düzensiz

KBB: Kan beyin bariyeri

LAG3: Lenfosit aktivasyon geni-3

LB: Lewy cisimcikleri

LDH: Laktat dehidrogenaz

LIF: Lösemi inhibitör faktörü

LTP: Uzun süreli güçlenme

MAP-2: Mikrotübül bağlantılı protein 2

MSS: Merkezi sinir sistemi

MSA: Multisistem atrofisi

NAC: Amiloid olmayan bileşen

NGF: Sinir büyüme faktörü

NOS: Nitrik oksit sentaz

NT-3: Nörotrofin 3

NT-4: Nörotrofin 4

NMDA: N-metil-D-aspartat

NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü

NFE-2: nükleer faktör eritroid-2

NRF-2: Nükleer faktör eritroid-2 (NFE2) ile ilişkili faktör-2

Olig2: Oligodendrosit transkripsiyon faktörü-2

PFA: Paraformaldehit

PGC-1α: Peroksizom-proliferatör-aktive-reseptör γ koaktivatör 1α

PH: Parkinson Hastalığı

PTM: Posttranslasyonel modifikasyonlar

ROS: Reaktif oksijen türleri

P-D-ALS: Guam'lı parkinsonizm-demans-amiyotrofik lateral skleroz kompleksi

PDGF: Platelet kökenli büyüme faktörü

Shh: Sonic hedgehog

SNARE: Çözülür N-etilmaleimid duyarlı protein bağlayıcı protein reseptörler

SUMO: Küçük ubiquitin benzeri değiştirici

TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü beta

TIMP-1: Doku inhibitörü metaloproteinaz-1

TH: Tirozin hidroksilaz

TNF: Tümör nekroz faktörü

TLR2: Toll benzeri reseptör-2

VAMP-2: Vezikül ilişkili membran proteini-2

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

VGCC: Voltaj kapılı $Ca^{2+}$ kanalları

VMAT2: Veziküler monoamin taşıyıcı-2

WB: Western blot

# ÖZET

## DOKTORA TEZİ

### İNSAN ASTROSİTİ KAYNAKLI A-SİNÜKLEİN ARTIŞININ, TROFİK FAKTÖR SALINIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN NÖRON-ASTROSİT SİNAPTİK BİLEŞENLERİ VE NÖRODEJENERASYON AÇISINDAN İNCELENMESİ

**Büşra ŞENGÜL YEDİEL**

**İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tıbbi Biyoloji Programı**

**Danışman: Prof. Dr. Duygu GEZEN-AK**

Astrositler düzgün bir sinaps yapısının oluşturulması için gereklidir ve astrositlerde ortaya çıkan fonksiyon bozuklukları, sinaptik bağlantıların kaybına ve nörodejenerasyona neden olur. Astrositler trofik faktörlerin en önemli kaynağıdır. Trofik faktörler nöron sağkalımı ve sinaptik bağlantıların oluşumunda oldukça önemli rollere sahiptir. Yüksek lisans tezi kapsamında elde ettiğimiz bulgular ile insan astrositlerinde α-sinüklein aşırı ekspresyonunun trofik faktörlerin üretimi ve salınmasını değiştirdiği tarafımızdan rapor edilmiştir. Her ne kadar astrositlerin nöronlara α-sinüklein aktarımı yapabildiği gösterilmiş olsa da astrositlerin α-sinükleini ilk olarak nöronlardan aldığı ve bu şekilde yaydığı ileriye sürülmüştür. Astrosit kökenli α-sinükleinin nöronlara olan olası etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sunulan doktora tezinde astrosit kökenli α-sinüklein artışının herhangi bir patolojiye sahip olmayan nöronları ne oranda etkilediği, nöron sağkalımı ve sinaps oluşumu için gerekli olan büyüme faktörü salınımını etkileyerek, sinaptik bağlantıların dejenerasyonunu tetikleme ve nörodejenerasyonu ilerletme potansiyeli araştırılmıştır. İnsan prekürsör nöral hücreler olan LUHMES hücreleri ile insan primer astrosit hücrelerini içeren bir ko-kültür sistemi

oluşturulmuştur. Bu sistemde insan *SNCA* genini taşıyan plazmid, sadece astrositlere aktarıldı, daha sonra *SNCA*'yı aşırı eksprese eden bu astrositler nöronlar ile biraraya getirildi ve astrositlerde artan α-sinükleinin nöronlara doğru hareket ettiği saptandı. Elde ettiğimiz veriler, astrosit kaynaklı α-sinükleinin LUHMES hücrelerine göç ettiği, α-sinüklein patolojisinin nöronal sitotoksisiteyi arttırdığını ve NGF ekspresyon seviyesini azalttığını gösterdi. Diğer taraftan sinaps oluşumunda rol alan thrombospondin, sinaptofisin ve PSD-95 protein seviyelerini arttırdığı belirlendi. α-sinüklein patolojisinin astrositlerde muhtemelen nörotrofik faktör salınımını gerçekleştirebilmek için sinaptik vezikül oluşumunu arttırdığı; sinaptik vezikül oluşumunda rol olan α-sinükleinin bu faktölerin salınımına eşlik ettiği ve bu yüzden de sinaps oluşumunda rol oynayan faktörlerin salınımını veya üretimini de arttırdığını düşünmemize neden olmaktadır.

Mart 2023 , 153 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Astrosit, α-sinüklein, Nörotrofik faktörler, Sinaptik iletişim, Nöron

# ABSTRACT

## Ph.D. THESIS

### THE EFFECT OF THE HUMAN ASTROCYTE-DERIVED A-SYNUCLEIN INCREASE ON TROPHIC FACTOR RELEASE IN NEURON-ASTROCYTE SYNAPTIC COMPONENTS AND NEURODEGENERATION

**Büşra ŞENGÜL YEDİEL**

**Istanbul University-Cerrahpaşa**

**Institute of Graduate Studies**

**Department of Medical Biology**

**Medical Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Duygu GEZEN-AK**

Astrocytes are necessary for the formation of a proper synapse structure, and dysfunctions that occur in astrocytes cause loss of synaptic connections and neurodegeneration. Astrocytes are the most important source of trophic factors. Trophic factors have very important roles in neuron survival and the formation of synaptic connections. As a result of the findings we obtained within the scope of the master's thesis, we reported that α-synuclein overexpression in human astrocytes alters the production and release of trophic factors. In the presented doctoral thesis, to what extent the increase in astrocyte-derived α-synuclein affects neurons that do not have any pathology, by affecting the release of growth factors required for neuron survival and synapse formation, the potential to trigger the degeneration of synaptic connections and promote neurodegeneration has been investigated. A co-culture system consisting of human precursor neural cells, LUHMES cells, and human primary astrocyte cells was established. In this system, the plasmid carrying the human SNCA gene was only spliced into astrocytes, and then these SNCA overexpressing astrocytes were brought together with neurons, and it was

determined that the increased α-synuclein in astrocytes moved towards neurons. Our data showed that astrocyte-derived α-synuclein migrated to LUHMES cells, α-synuclein pathology increased neuronal cytotoxicity and decreased NGF expression level. On the other hand, it was determined that it increased the levels of thrombospondin, synaptophysin, and PSD-95 protein, which are involved in synapse formation. α-synuclein pathology increases synaptic vesicle formation in the astrocyte, possibly to release neurotrophic factor; α-synuclein, which plays a role in synaptic vesicle formation, accompanies the release of these factors and therefore, it causes us to think that the factors that play a role in synapse formation also increase the release.

March 2023 153 pages.

**Keywords:** Astrocyte, α-synuclein, Neurotrophic factors, Synaptic communication, Neuron

# 1. GİRİŞ

α-sinüklein, merkezi sinir sisteminde (MSS) yaygın olarak eksprese edilen SNCA geni tarafından kodlanan 140 amino asitlik bir proteindir (Recchia, Debetto ve ark. 2004, Maraganore, de Andrade ve ark. 2006, Wang ve Hay 2015). Nöronlarda α-sinüklein, apoptozun baskılanmasına, N-ethilmaleimid duyarlı füzyon bağlama proteini reseptörü (SNARE) stabilizasyonuna, presinaptik terminallerde veziküler trafiğin sürdürülmesi gibi fonksiyonlara katkıda bulunur. α-sinüklein için tanımlanan ilk işlev, şaperon fonksiyonu ve özellikle sinaptik vezikül havuzunun ve trafiğinin yönetimi yoluyla ekzositozu kontrol etme yeteneğidir. Kültüre edilmiş memeli hücre hatlarında ve nöronlarda α-sinüklein aşırı ekspresyonu Golgi fragmantasyonuna yol açabilir; α-sinükleinin prefibriler agregatlarının oluşumu, Golgi ve mikrotübül bozulması ile ilişkilidir. Bununla birlikte, kümelenmiş veya aşırı eksprese edilmiş α-sinüklein, daha fazla birikime ve α-sinüklein patolojisinin hücreden hücreye yayılmasına neden olur (Vieira, Radford ve ark 2015). Örneğin; nöronlar aşırı ekperese olan α-sinükleini ekzositoz ile ekstraselüler alana, α-sinüklein oligomerleri olarak salarlar ve astrositler nöronal kökenli α-sinükleinin endositozunu ve birikimini yapabilirler. Çalışmalar, astrositlerin akson terminallerinden kaçmış, bozulmuş α-sinükleini alabileceğini ve direkt olarak α-sinükleinin nörondan astrositlere aktarımının mümkün olduğunu göstermektedir (Lee, Suk ve ark. 2014; Venda, Cragg ve ark. 2010). Gliokrin sistemi oluşturan astrositler; nöromodülatörler, nörohormonlar, trofik faktörler ve sinaptogenez modülatörlerini salgılarlar. Astrositler, özellikle beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), glia kökenli nörotrofik faktör (GDNF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF-B) dahil olmak üzere bir dizi büyüme faktörü sentezlemekte ve salgılamaktadır (Sullivan ve Toulouse 2011; Cabezas, Avila-Rodriguez ve ark. 2016). Bu büyüme faktörleri, çoklu sinyal yolaklarını, hücre büyümesi ve farklılaşmasını, sinaptik iletimi, anjiyogenez ve yara iyileşmesini düzenler. Bu hücreler sinaptik gelişimi ve plastisiteyi kontrol etmede kritik rollere sahiptir. Astrositlerin varlığı sinaps oluşumunda rol alırken; yokluğu ise sinaptik bağlantıların kaybına ve nörodejenerasyona neden olur. Astrositler, sinapsların sayısını ve oluşumunu düzenleyen sinaptojenik faktörler salgılar. Aynı zamanda, nöronların astrositlerle doğrudan teması, sinaps oluşumu için gereklidir (Chaboub ve

Deneen 2013). Astrositler, pre-sinaptik vezikül salınımını ve salgılanan moleküller aracılığıyla post-sinaptik reseptör bileşimini düzenleyerek sinaptik sinyallerin etkisini düzenler. Astrositler, pre-sinaptik ve post-sinaptik bölgeleri hedefleyen çözünür faktörleri salgılayarak hem uyarıcı hem de inhibe edici sinapsların yapısını ve işlevini doğrudan düzenler. Ek olarak, iki nöron ve bir astrositten oluşan bir sinaps olan "üçlü sinaps" oluşumuna yol açar (Garcia-Segura ve Melcangi 2006). Üçlü sinapsta, nöronlardan salınan nörotransmitterler, komşu astrosit uzantılarındaki reseptörleri de bağlayarak, astrositlerdeki sinaptik davranışı modüle eden sinyal yolaklarını aktive eder. Nöron-astrosit etkileşimlerinde yer alan astrosit proteinlerini bilmek, sinapsta astrositler tarafından gerçekleştirilen biyolojik süreçleri anlamamızı sağlayacaktır. Daha önce, Percoll gradienti kullanılarak izole edilen bir hücre altı fraksiyonu olan gliozomların, sinaptozom ile karşılaştırıldığında, GFAP ve S100-β dahil olmak üzere astrosite özgü proteinler bakımından daha zengin olduğu gösterilmiştir. Buna göre, fizyolojik ve patolojik koşullar altında astrositler tarafından çeşitli nörotransmiterlerin salınımını ve alımını değerlendirmek için gliozom preparatları kullanılmıştır. Buradan yola çıkarak α-sinüklein patolojisinin trofik faktör sentezini de etkilemesi olası gözüktüğü düşünülmüş ve Büşra Şengül'ün yüksek lisans tezinin temelini oluşturan bu hipotezi konu alan makalemizde (Sengul ve ark. 2020) α-sinükleinin astrositlerde üretilen birçok trofik faktörün salınımını etkilendiği tarafımızdan gösterilmiştir. Ancak astrositler α-sinüklein proteinini oldukça düşük oranda üretmektedir. Diğer taraftan α-sinüklein patolojisinin astrositlerde de değişiklikler oluşturduğu ve hastalıkla birlikte α-sinüklein birikimlerinin astrositlerde de gözlendiği bildirilmiştir. Ancak her ne kadar astrositlerin nöronlara α-sinüklein aktarımı yapabildiği gösterilmiş olsa da, astrositlerin α-sinükleini ilk olarak nöronlardan aldığı ve bu şekilde yaydığı ileriye sürülmüştür. Astrositlerin α-sinükleini çok düşük miktarlarda ürettiği göz önüne alındığında, bu hücrelerin α-sinüklein artışına karşı toleransının nöronlardan çok daha düşük olması ve bu hücrelerde α-sinüklein açısından ufak bir değişikliğin hücre içi birçok mekanizmanın bozulmasına ve bu hücrelerin fonksiyon kaybına sebep olması kuvvetle muhtemeldir. Astrosit kökenli α-sinükleinin nöronlara olan olası etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sunulan bu doktora tezinde ise Büşra Şengül'ün yüksek lisans tezinin temelini oluşturan hipotez bir adım ileriye götürülerek, astrositte α-sinüklein artışının nörotrofik faktör sistemi üzerine etkilerinin sadece astrositler ile sınırlı kalmayacağı, astrosit kökenli α-sinükleinlerin nöronlara göç ederek sinaps oluşumu için gerekli olan büyüme faktörü salınımını etkileyeceği, sinaptik bağlantıların dejenerasyonunu tetikleyebileceği ve dolayısıyla nöron sağkalımını azaltarak ve nörodejenerasyonu ilerletebileceği hipotezi üzerinde çalışmalar devam ettirilmiştir. Bu hipotez

doğrultusunda sunulan doktora tezi kapsamında, insan prekürsör nöral hücreler olan Lund human mesencephalic (LUHMES) hücreleri ile insan primer astrosit hücrelerini içeren bir ko-kültür sistemi oluşturulmuştur. Bu sistemde insan SNCA genini taşıyan plazmid, lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı kullanılarak sadece astrositlere akrarılmış ve daha sonra SNCA'yı aşırı eksprese eden bu astrositler nöronlar ile biraraya getirilmiştir. Çalışmamızda, α-sinükleini aşırı eksprese eden astrositler kullanılarak oluşturulan nöron-glia ko-kültürlerinde astrosit kaynaklı α-sinükleinin 1) nöronlara taşınıp taşınmadığını ve nöronal sitotoksisiteyi tetikleyip tetiklemediğini, 2) üçlü sinaps oluşumunu ve sinaptik fonksiyonu etkileyip etkilemediğini ve 3) üçlü sinapsta NGF ekspresyon seviyesini değiştirip değiştirmediğini saptamak amaçlanmıştır.

# 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

## 1.1. Sinüklein Ailesi

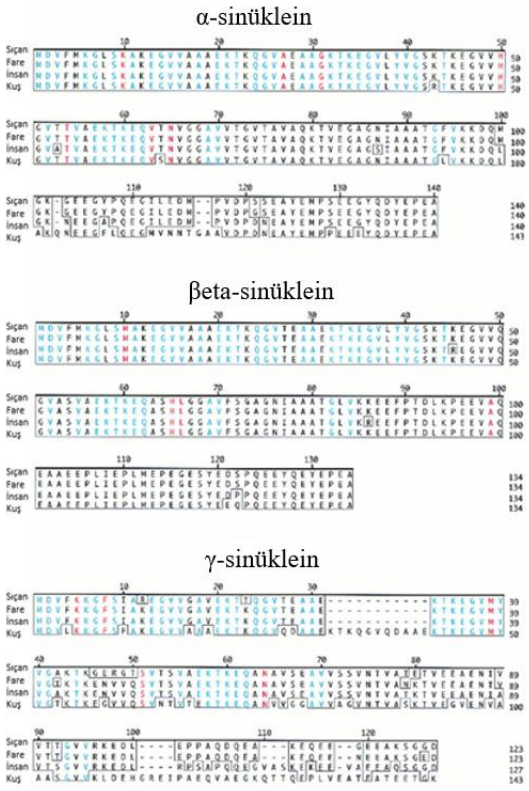
Sinükleinler, nörodejeneratif hastalıklarda ve kanserde yer alan alfa (α), beta (β) ve gama (γ) sinükleinden oluşan, doğal olarak katlanmamış (veya doğası gereği yapılandırılmamış) proteinlerin bir ailesidir. Sinükleinler; kümelenmeye yatkın bir protein ailesidir ve yapılarını kolayca değiştirir ve toksik kümelere dönüştürülebilirler (George 2002). Sinükleinler; iskelet kası, kalp kası, periferik sinir sisteminde değişken seviyelerde eksprese edilebilirken; merkezi sinir sisteminde (MSS) güçlü bir şekilde eksprese edilir (George 2002; Lavedan 1998) (Tablo 2-1). Bu ailenin evrimsel olarak korunmuş üç üyesi, omurgalı sinir sisteminde yüksek oranda eksprese edilir ve tüm omurgalılarda bulunmuştur. Daha da önemlisi, omurgasızlarda hiçbir sinüklein muadili tanımlanmamıştır ve bu da sinüklein ailesinin omurgalıya özgü proteinler olduğunu gösterir (Carnazza ve ark. 2022). Memelilerde ve kuşlarda α-, β- ve γ-sinükleini kodlayan üç gen bulunurken, türe bağlı olarak balıklarda değişken sayıda sinüklein geni ve karşılık gelen proteinler eksprese edilir (Toni ve ark. 2015).

| | **Pankreas** | **Böbrek** | **İskelet Kası** | **Kalp** | **Akciğer** | **Plasenta** | **Beyin** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **α-syn** | + | + | ++ | ++ | + | + | ++++ |
| **β-syn** | - | - | + | - | - | _ | ++++ |
| **γ-syn** | + | + | ++ | ++ | + | + | ++++ |

**Tablo 2-1: Sinüklein genlerinin dokulardaki ekspresyonu.**

İlk sinüklein (α-syn), pasifik elektrik ışını olarak da bilinen Torpedo californica'nın elektroplağından 143 amino asitlik bir presinaptik protein olarak saflaştırılmış, kolinerjik sinaptik veziküllere karşı bir anti-serum kullanılarak tanımlanan α-sinüklein'dir (Maroteaux ve ark. 1988). Daha sonra, sinüklein ailesine ait iki ek izoform tanımlanmıştır (Jakes ve ark. 1994). İnsan α-sinükleinin konformasyonel analizi, bu proteinin doğal olarak katlanmamış olduğu ve bu nedenle protein-protein etkileşimlerine dahil olabileceği yönünde spekülasyonlara yol açmıştır (Weinreb ve ark. 1996).

β-sinüklein (β-syn) proteini, 134 amino asit uzunluğundadırlar ve sinüklein protein ailesinin en korunmuş üyesidir (Şekil 2-1). Özellikle, Alzheimer hastalarının amiloid plaklarında bulunan ve α-syn'in 61 ila 95. kalıntılarından uzanan pozitif yüklü N-terminal bölgesindeki, merkezi hidrofobik bölgede (aynı zamanda NAC olarak da bilinir) NAC-35 peptidine karşılık gelen bölgedeki 11 amino asitten yoksundurlar (Nakajo ve ark. 1993). Nakajo ve arkadaşları, β-syn'in sıçan beyninde $Ca^{2+}$ kalmodulin protein kinaz II tarafından fosforile edildiğini göstermiştir. Muhtemelen bir fosforilasyon bölgesi, β-syn dizisindeki türler boyunca korunan ancak α-sinüklein veya γ-sinükleinde korunmayan 118 konumundaki serin kalıntısıdır (Nakajo ve ark. 1993; Lavedan 1998).



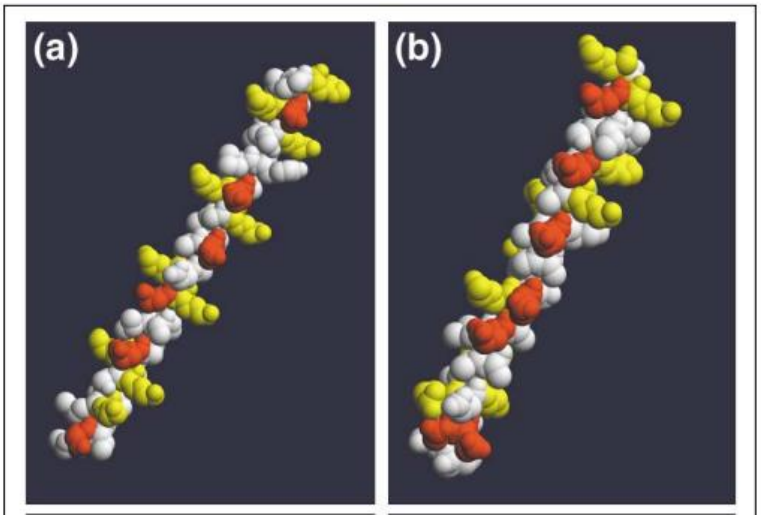

**Şekil 2-1: Sinüklein proteinlerinin yerleşimi.**

Her bir protein sınıfı için, konsensüs dizisine özdeş kalıntılar kutu içine alınır ve cetvel, insan proteini için tanımlanır. Tür boyunca üç sinüklein proteini sınıfının hepsinde korunan kalıntılar mavi renkle gösterilmiştir. Kırmızı renkli kalıntılar, belirli bir sinüklein protein sınıfına özgüdür (Lavedan 1998)'den uyarlanmıştır.

γ-sinüklein (γ-syn) proteini, sinüklein proteinleri arasında en az korunmuş olanıdır. İnsan γ-syn'i 127 amino asit uzunluğundadır ve 4 amino asit daha kısa olan fare ve sıçan proteinleriyle

sırasıyla %87.7 ve %83.8 aynıdır (Lavedan 1998). γ-syn, periferik ve motor sinir sistemlerinde bulunan nöronal bir proteindir. Metastatik hücrelerde yüksek oranda eksprese olur, ancak primer tümörde veya normal dokularda olmaz. γ-syn ekspresyonu ile kanserin yayılması arasındaki yakın ilişki, çok çeşitli malignitelerde gösterilmiştir. Alzheimer hastalarında retina ve optik sinirde γ-syn ekspresyonunda spesifik değişiklikler bildirilmiştir (Surguchov ve ark. 2001). γ-syn'in mikrotübül özelliklerini etkileyebileceği ve fonksiyonel bir mikrotübülle ilişkili protein gibi davrandığı bulunmuştur. In vitro deneyler, γ-syn'in tübülin polimerizasyonunu bağlayabildiğini ve destekleyebildiğini, mikrotübül demetlenmesini indükleyebildiğini ve mikrotübül bağlantılı protein 2 (MAP-2) varlığında geliştirilen mikrotübül morfolojisini değiştirebildiğini ortaya çıkarmıştır (Zhang, Kouadio, ve ark. 2011).

α-syn geni insan kromozomu üzerinde 4q21.3-q22, β-syn 5q35 ve γ-syn ise 10q23.2-q23.3'da haritalanmıştır (Chen ve ark. 1995; Spillantini ve ark. 1995; Ninkina ve ark. 1998). α-syn geni 7 ekzon (5 protein kodlayan) olarak düzenlenirken, β-syn geninin 6 ekzonu (5 protein kodlayan) ve γ-syn geninin ise 5 ekzonu (tümü protein kodlayan) vardır (Lavedan 1998). Tüm sinüklein protein dizileri, değişken sayıda 11-kalıntı tekrarı içeren yüksek düzeyde korunmuş bir amino-terminal alanından ve asidik kalıntıların baskınlığını içeren daha az korunmuş bir karboksi-terminal alanından oluşur. Tekrar alanındaki tek önemli farklılıklar, tüm β-sinükleinlerde 11 amino asidin (53-63 kalıntıları) silinmesi ve Torpedo californica'nın γ-sinükleininde 32. kalıntıdan sonra bir tekrarın eklenmesidir. 11-mer tekrarları, fosfolipid veziküllere bağlanmaya aracılık eden, korunmuş bir apolipoprotein benzeri A2 sınıfı sarmalı oluşturur ve lipit bağlanmasına eşlik eder (Şekil 2-2) (Perrin ve ark. 2000).



**Şekil 2-2: α-sinüklein ve ilgili proteinlerin amfipatik α-sarmal bölgelerinin karşılaştırılması.**

a) İnsan α-sinüklein kalıntıları 1-50, bir α-sarmal olarak modellenmiştir. Burada gösterilen ilk çerçeve sarmalın sadece hidrofilik yüzünü gösterir,merkezde (kırmızı) sınırlı asidik kalıntılar ve her arayüzde temel kalıntılar (sarı); karşıt hidrofobik yüz yalnızca yüklenmemiş artıkları (beyaz) içerir.

b) (b) İnsan apolipoprotein AI kalıntıları 190-231 (George 2002)' den uyarlanmıştır.

### 1.1.1. Alfa-Sinükleinopatiler

α-sinükleinopati, nöronal veya glial hücrelerde çözünmeyen α-sinüklein kümelerinin anormal birikimi ile karakterize edilen bir dizi nörodejeneratif hastalığı tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Toplu olarak α-sinükleiopatiler olarak adlandırılan bozukluklar arasında; Parkinson hastalığı (PH), Lewy cisimcikli demans (LBD) ve Multi sistem atrofisi (MSA) ve ayrıca çeşitli nöroaksonal distrofiler gibi nadir görülen bozukluklar yer alır (Gibb ve ark. 1988).

#### *1.1.1.1. Parkinson Hastalığı (PH)*

Parkinson hastalığı (PH), sinir sistemini ve vücudun sinirler tarafından kontrol edilen kısımlarını etkileyen ilerleyici bir bozukluktur. PH hem merkezi hem de periferik sinir sistemlerini etkilemektedir. İlk olarak 1817'de James Parkinson tarafından tanımlanan tremor, rijidite, akinezi/bradikinezi ve postüral instabilite gibi kardinal motor semptomlar tanı için hala gereklidir ve terapötik müdahale için birincil hedeftir. PH motor semptomlarına, substantia nigra pars compacta'daki (SNpc) dopamin nöronlarının ilerleyici kaybı ve bunların kaudat ve putamenlere olan uzantıları nedeniyle striatumdaki dopaminerjik iletim kaybına neden olur (Marsili ve ark. 2018).

PH, sinükleinopatiler olarak adlandırılan ve patolojik olarak α-syn proteininin Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan nöronal inklüzyonlara bırakılmasıyla karakterize edilen bir hastalık ailesine aittir (Lunati ve ark. 2018). Bununla birlikte, anormal α-syn proteostazı, PH'nin hem sporadik hem de ailesel formları arasında ortak bir faktördür. Nigrostriatal dopamin nöronlarının kaybıyla birlikte, α-syn'in LB'lerde birikmesi, PH'nin patolojik özelliğidir. LB'lerin kendilerinin doğrudan toksisiteye neden olup olmadığı veya yalnızca patojenik süreçlerle ilişkili bir hücresel belirteç olup olmadığı henüz belirlenmemiştir (Benskey ve ark. 2016).

### *1.1.1.2. Parkinson Artı Sendromları*

*Multi sistem atrofisi (MSA)*

Multi sistem atrofisi (MSA), glial sitoplazmik inklüzyonların (GCI) oluşturduğu oligodendrositlerde α-syn proteinin yanlış katlanmasından ve birikiminden kaynaklanan hızla ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Woerman ve ark. 2018). Hastalık tipik olarak 50 ila 75 yaş arasındaki hastaları etkiler ve otonomik disfonksiyon ve motor anormalliklerin bir kombinasyonu ile karakterize edilir (Wenning ve ark. 2013). Bununla birlikte, hastalığın kendisi ilk olarak; Dejerin ve Thomas tarafından iki ataksi hastasından gelen beyinlerin postmortem değerlendirmesinden sonra olivopontoserebellar atrofi (OPCA) olarak tanımlanmıştır (Graham ve ark. 1969). Shy and Drager (1960), otonom yetmezlik ve belirgin ortostatik hipotansiyon ile ilişkili Parkinsonizm ile başvuran hastalarda omurilik, bazal gangliyon, substantia nigra (SN), serebellum ve beyin sapında intermediolateral kolonun dejenerasyonunu tanımlamıştır ve bu klinik sendrom da daha sonra Shy-Drager Sendromu (SDS) olarak adlandırılmıştır (Shy ve ark. 1960). Aynı yıl Van der Eecken ve ark. (1960), SN ve striatumda nöronal kaybın patolojik bulguları ile başvuran parkinsonizmli hastaları, strionigral dejenerasyon (SND) olarak tanımlamışlardır. Graham ve Oppenheimer (1969), OPCA, SDS ve SND hastalarının beyin dokularını inceledikten sonra, her birinin aynı nörodejeneratif hastalığın biraz farklı bir türü olduğunu varsayarak, üç bozukluğun MSA olarak adlandırılan tek bir hastalık altında gruplandırılmasını önermiştir (Papp ve ark. 1989).

Daha sonraki çalışmalarda; MSA'nın yeni, basitleştirilmiş bir tanımı oluşturulmuş olup, hastalığı MSA-P ve MSA-C olmak üzere iki kategoriye ayırmışlardır (Gilman ve ark. 2008). MSA-P; bradikinezi ve titreme dahil olmak üzere ağırlıklı olarak parkinson semptomlarını sergileyen hastaları belirtir. Bu tanım geleneksel olarak SND tanısı konan hastaları içerir. MSA-C ise okülomotor disfonksiyonu ile ilişkili serebellar dizartri ile yürüyüş ve uzuv ataksisi dahil olmak üzere daha belirgin serebellar semptomları olan hastaları kapsar. MSA hastalarının bu alt grubu tipik olarak daha önce OPCA hastaları olarak sınıflandırılmış bireyleri içerir. Daha da önemlisi, bu tanımlar tanıdaki baskın özelliklere dayanarak yapılır ve bir hastanın hayatı boyunca değişebilir. Parkinson ve serebellar belirtilere ek olarak, MSA'lı hastalar ayrıca piramidal bulgular ve sersemlik gibi diğer nörolojik anormalliklerle de gösterebilirler (Woerman ve ark. 2018).

Lewy Cisimcikli Demans (LBD)

Lewy cisimcikli demans (LBD), yaygın olarak Lewy cisimcikleri (LBS) olarak adlandırılan anormal intranöronal birikintilerin varlığı ve hücre dışı lewy nöritlerin (LNS) birikimi ile karakterize edilen ilerleyici nörodejeneratif bozukluktur (Tousi 2017). LBD'lerin şu anda "Lewy cisimcikleri (dementia with Lewy bodies)" (DLB), PH ve "Parkinson hastalığı demansı (Parkinson disease dementia)" (PDD)'yi kapsadığı kabul edilmektedir (Outeiro ve ark. 2019). AH'den sonra, yaşlı insanlarda tüm demansın ∼% 22'sini oluşturan en yaygın ikinci nörodejeneratif demans türüdür. LBD'lerin klinik ve patolojik profilleri, alt tipler arasında önemli bir örtüşme göstermektedir. DLB teşhisi konan hastalar genellikle beyin sapı ve orta beyin patolojisi ile ilişkili parkinsonizm ve PDD'ye ilerleyen limbik ve kortikal yapıların patolojik tutulumu nedeniyle demansla birlikte bulunan birçok PH vakasıdır (Jellinger ve ark. 2018). PDD ve DLB arasındaki ayırıcı tanı, Parkinson özelliklerinin sunulmasından sonra bilişsel semptomların ortaya çıkması gibi hastalığın başlangıcı sırasında temporal profil kullanılarak elde edilir. Dolayısıyla, demans başlangıcı ilk PH ile ilişkili semptomların başlangıcından en az 1 yıl sonra gerçekleşirse, tanı PDD ile tutarlıdır. Buna karşılık, demans başlangıcı Parkinsonizm'in gelişiminden itibaren 1 yıl içinde başlarsa, profil DLB ile tutarlıdır (McKeith ve ark. 2017). LBS, özellikle beyin sapındaki ve orta beyindeki monoaminerjik nöronlara bu tür birikime eğilimli görünen büyük veya uzun projeksiyon nöronlarının alt kümelerinde oluşur. Bununla birlikte, limbik sistemde ve neokortikal alanlarda, LB'ler en sık glutamaterjik piramidal nöronlarda bulunur. LBS ve LN'ler, her biri farklı bölgesel ve hücresel dağılımlar tarafından tanımlanan ve toplu olarak sinükleinopatiler olarak adlandırılan diğer nörodejeneratif hastalıklarda da ortaya çıktıkları için LBD'lere özel değildir (Aarsland ve ark. 2003; Manzanza ve ark. 2021).

#### *1.1.1.3. Alzheimer Hastalığı (AH)*

Alzheimer, Parkinson, Huntington ve frontotemporal demans gibi nörodejeneratif hastalıklar, normalde fizyolojik koşullar altında çözünür olan proteinlerin yanlış katlanması ve toplanması ortak özelliğini paylaşır. AH prototipik nöropatolojik lezyonlar, amiloid-β (Aβ) peptit fibrillerinden oluşan hücre dışı amiloid plaklarının varlığını ve nörofibriler yumaklar olarak adlandırılan hiperfosforile tau kümelerinin intranöral oluşumunu içerir (Trojanowski 2002). Lewy cisimleri PH ve DLB'nin patolojik ayırt edici özelliği

olmasına rağmen, son çalışmalar AH beyinlerinin önemli bir kısmının α-sinüklein patolojisi gösterdiğini saptamıştır (Toledo ve ark. 2013). Klinik olarak teşhis edilen 22 AH vakası üzerinde yapılan bir çalışmada, patolojik inceleme sonucunda α-sinüklein immünoreaktif Lewy cisimciklerine sahip olduğu bulunmuştur. Diğer çalışmalar, hem sporadik hem de ailesel vakalar da dahil olmak üzere AH'li hastaların yarısının α-sinüklein agregatlarına sahip olduğunu göstermiştir (Mikolaenko ve ark. 2005). Bu çalışmalarda, α-sinüklein agregatlarının çoğunlukla amigdala ile sınırlı olduğu ve α-sinüklein inklüzyonlarının yayılmasının PH'den farklı olduğu gösterilmiştir. AH'deki Lewy patolojisinin, PH'de olduğu gibi aksonal terminallerde ve dendritlerde değil, esas olarak nöronların hücre gövdesinde oluştuğu bildirilmiştir (Marui ve ark. 2000). Bu nedenle Lewy patolojisi muhtemelen AH'nin spesifik olmayan bir son aşamasını yansıtmaktadır. Birkaç çalışma, PH ve DLB hastalarında yüksek düzeyde AH patolojisinin gözlendiğini ve bilişsel fonksiyondaki düşüş ile α-sinüklein agregatlarının sayısından daha fazla olduğunu göstermektedir (Compta ve ark. 2011). İlginç bir şekilde, AH patolojisi olan PH/DLB vakaları, kortikal ve limbik alanlarda AH patolojisi olmayan vakalardan daha yüksek α-sinüklein seviyelerine sahiptir, bu da bu bozukluklarda α-sinüklein ve AH patolojisi arasında olası bir etkileşim anlamına gelir. α-sinüklein, β-amiloid ve tau patolojilerinin PH ve AH'de birbirleriyle nasıl ilişkili olduğu konusunda tam olarak anlaşılamamıştır (Clinton ve ark. 2010; Kim ve ark. 2014).

### 1.1.2. Alfa-Sinüklein

α-sinüklein (α-syn), presinaptik sinir terminallerinde bol miktarda bulunan nöronal bir proteindir.

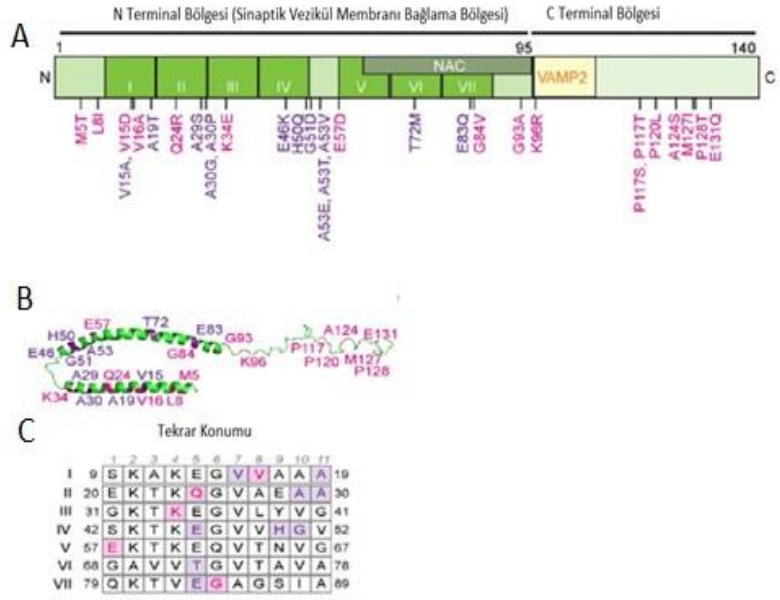
α-sinüklein, Parkinson hastalığı (PH), Lewy cisimcikli demans (LBD), Multi sistem atrofisi (MSA), Alzheimer hastalığı (AH), Pantotenat kinazla ilişkili nörodejenerasyon (PKAN; a.k.a. beyinde demir birikimi tip I olan nörodejenerasyon; eski adı Hallervorden-Spatz sendromu) dahil olmak üzere çeşitli yıkıcı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Lewis ve ark. 2010), Pick hastalığı, yaygın Lewy cisimciği hastalığı, Alzheimer hastalığının Lewy cisimciği varyantı, Amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Guam'ın ALS Parkinsonizm-demans kompleksi, saf otonomik yetmezlik, frontotemporal demans, progresif supranükleer felç kortikobazal dejenerasyon ve Krabbe hastalığı toplu olarak "sinükleinopatiler" olarak adlandırılır (Burre 2015; Smith ve ark. 2014; Spillantini ve ark. 1998).

α-sinüklein; beyinde, özellikle sıçan beyninde neokorteks, hipokampus, striatum, talamus ve serebellum boyunca ağırlıklı olarak eksprese edilen 140 kalıntılı bir proteindir (Iwai ve ark.

1995). Başlangıçta nükleer bir protein olarak tanımlansa da, α-sinükleinin presinaptik lokalizasyonu yapılan araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (Mori ve ark. 2002). Yine de, α-sinüklein, farklı nörokimyasal fenotiplerin aksonlarından filizlenen sinaptik bölgelerde oldukça zengin olmasına rağmen, tüm sinaptik terminallerde mevcut değildir (Yu ve ark. 2007); (Totterdell ve ark. 2004). Ayrıca, ekspresyonu sinir sistemiyle sınırlı değildir; kırmızı kan hücrelerinde önemli miktarda α-sinüklein tespit edilmiş ve diğer dokularda da üretildiği bulunmuştur, bu da beyindeki aktivitesine ek olarak daha genel hücresel fonksiyonlara da işaret etmektedir (Nakai ve ark. 2007); (Askanas ve ark. 2000). Sinir sistemi içinde, α-sinükleinin ekspresyonu gelişimsel olarak düzenlenir. α-sinüklein mRNA ekspresyonu, kemirgenlerde geç embriyonik aşamalarda başlar, doğumdan sonraki ilk birkaç haftada zirveye ulaşır ve sonra azalır (Petersen ve ark. 1999); (Chu ve ark. 2007). α-sinükleinin protein seviyeleri gelişim sırasında artar ve yetişkinlik döneminde yüksek kalır, bu da seviyelerinin transkripsiyon sonrası düzenlendiğini düşündürür. α-sinüklein, kemirgenlerde ve insanlarda gelişimin ilk haftalarında somadan presinaptik terminallere dağılır ve burada sinaptik veziküllerle birleşir (Withers ve ark. 1997; Hsu ve ark. 1998; Burre 2015).

α-sinüklein; dikkat çekici ve benzersiz bir yapıya sahiptir (Şekil 2-3). N-terminal dizisi, apolipoproteinlere benzer şekilde 3 dönüşlü amfipatik bir α-sarmalı oluşturur ve α-sinükleinin lipid membranlarla birleşmesine aracılık eden bir KKTKGEV konsensüs dizisi (kalıntılar 1-95) ile yedi adet 11-mer tekrarına bölünmüştür (Bussell ve ark. 2003); (Bussell ve ark. 2005). Bu bölge ayrıca, α-sinüklein birikiminden ve lipid özelliklerinin algılanmasından sorumlu olduğuna inanılan bir alan olan NAC alanını (kalıntılar 60-95) içerir (Fusco ve ark. 2014; Appel-Cresswell ve ark. 2013). Sinükleinopatilerle ilişkili tanımlanmış tüm mutasyonlar bu bölgede bulunur ve A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E ve A53T, bunlardan beşi sekiz kalıntı içinde kümelenir, bu da lipid bağlanmasının veya bunun eksikliğinin α-sinüklein patolojisine bağlı olabileceğini düşündürür (Zarranz ve ark. 2004; Pasanen ve ark. 2014). α-sinükleinin C-terminali (kalıntılar 96-140) oldukça asidiktir ve büyük ölçüde yapılandırılmamıştır, çeşitli post-translasyonel modifikasyonların hedefidir ve (i) proteinlerle etkileşimler, (ii) iyon, polikatyon ve poliamin bağlanması, (iii) α-sinükleinin zara bağlanmasının modülasyonu ve (iv) α-sinükleinin kümeleşmeden korunması için sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Fernandez ve ark. 2004; Nielsen ve ark. 2001). N-terminal bölgesi ayrıca, Alzheimer hastalığı patolojisinde tanımlanmış olan ve fibril yapısının merkezini oluşturan plakların amiloid olmayan bileşeni

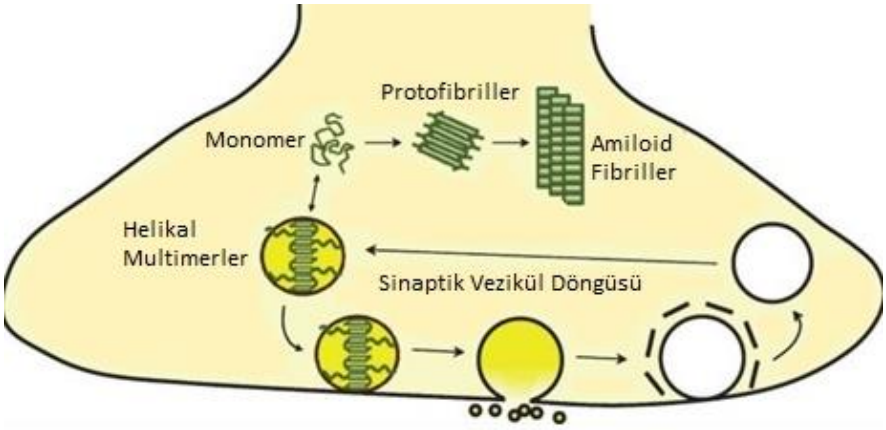
olarak adlandırılan agregasyon eğilimli bölgeyi de içerir. C-terminal alanı negatif yüklüdür ve vezikül ilişkili membran proteini-2 (VAMP-2) ve kalsiyum dahil olmak üzere proteinlerle etkileşime aracılık eder (Ueda ve ark. 1993; Gao ve ark. 2023).




**Şekil 2-3: α-sinüklein yapısı.**

(A, B) α-sinüklein, amfipatik bir α-heliksin oluşumu yoluyla sinaptik veziküllerle ilişkisine aracılık eden bir N-terminal membran bağlama bölgesinden ve VAMP2'ye bağlanan bir C-terminal bölgesinden oluşur. A) N-terminal bölgesi ayrıca 11 kusurlu KTKEGV tekrarına bölünebilir ve toplanmaya eğilimli NAC alanını içerir. B) ve toplama eğilimli NAC alanını içerir. α-sinükleinde hastalığa yol açan (mor) veya önemi henüz bilinmeyen (pembe) birkaç mutasyon tanımlanmıştır. C) 10 ve 11 konumlarındaki kümeler zara bakarken, küme 5 sitozole bakar (Sharma ve ark. 2023)'den uyarlanmıştır.

α-sinüklein, sekonder yapısı çevresine bağlı olarak, çözünür bir durum ile zara bağlı bir durum arasında dinamik bir denge içinde bulunur. α-sinüklein ve lipid yüzeyleri arasındaki etkileşimin, hücresel fonksiyonlarına aracılık etmek için anahtar özellik olduğuna inanılmaktadır (Şekil 2-4). Çözünür sitosolik α-sinüklein doğası gereği yapılandırılmamıştır ve doğal olarak katlanmamış bir protein gibi davranır (Chandra ve ark. 2003; Burre ve ark. 2013). Yapılan çalışmalarda, α-sinükleinin önerilen yarı kararlı tetramerik formu nedeniyle, çözünebilir durumu etrafında tartışmalar gelişmiştir (Wang ve ark. 2011). Diğer çalışmalar, MSS'de, eritrositlerde, memeli hücrelerinde ve E. coli'de böyle bir sitozolik tetramerin bulunmadığını göstermiş olsa da lipitler veya zarlar gibi hücresel faktörlere bağlanma, protein saflığa yaklaştıkça kararsız hale geldiğinden, endojen multimerler gibi bu tür multimerleri indükleyebilir ve stabilize edebilir (Bartels ve ark. 2011; Burre ve ark. 2014; Luth ve ark. 2015).




**Şekil 2-4: Sinapstaki α-sinükleinin fizyolojik ve patolojik konformasyonları.**

Sitozolik α-sinüklein monomeriktir ve doğal olarak katlanmıştır. Sinaptik veziküllere bağlandıktan sonra, a sinükleinin N-terminal kalıntıları sarmal bir yapı benimser. α-sinükleinin zara bağlanması, sinapstaki fizyolojik işlevi için gerekli olan multimerizasyonu ile ilişkilidir. Patolojik olarak, sitozoldeki katlanmamış α-sinüklein, sonunda amiloid fibrilleri oluşturan oligomerler (protofibriller) içeren β tabakaya dönüşebilir (Luth et al., 2015)'den uyarlanmıştır.

N-terminal alanının kesilmesi lipid bağlanmasını büyük ölçüde azalttığından ve fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin veya fosfatidilinositol gibi asidik baş grupları gerektirdiğinden, membran bağlanması muhtemelen 11-mer dizilerinin ortak bir etkisidir (Perrin ve ark. 2000; Bisaglia ve ark. 2006). Bu, α-sinüklein sarmalının zıt taraflarında bulunan lizinler ile membran baş gruplarının bir etkileşimini akla getirir. Membran eğriliğine bağlı olarak hem tek bir uzun α-sarmalı hem de kırık bir α-sarmalı rapor edilmiştir ve α-sinüklein bu iki durum arasında geçiş yapabilir (Georgieva ve ark. 2010): Daha büyük çaplı (~100 nm) zarlara bağlandıktan sonra, α-sinüklein uzunlamasına bir sarmalı benimser (Georgieva ve ark. 2008). Buna karşılık, küçük ve oldukça kavisli veziküllerin varlığında, α-sinüklein, daha küçük lipozom alanına uyum sağlaması muhtemel olan kırık bir sarmal yapısını benimser (Drescher ve ark. 2008). α-sinüklein tercihen daha küçük çaplı veziküllere bağlanır ve bu nedenle beyindeki sinaptik veziküllerle birleşir (Nuscher ve ark. 2004; Davidson ve ark. 1998). α-sinüklein, α-sinükleinin birinci amino asidinin α-amino grubuna bir asetil grubunun bağlanması aracılığıyla N-terminal olarak asetillenir (Kang ve ark. 2012). α-sinükleinin N-terminal asetilasyonu hem sağlıklı hem de Parkinson hastalığı olan bireylerde görülür ve sarmal katlanma eğilimini, zarlara olan afinitesini ve agregasyona karşı direncini arttırır, bu da α-sinükleinin N-terminal asetilasyonunun; α-sinükleinin hem doğal hem de patolojik yapıları ve

işlevleri için önemli olabileceğini düşündürür (Bartels ve ark. 2014; Dikiy ve ark. 2014). Ek olarak, α-sinükleinin fosforilasyonu; yapısını, zara bağlanmasını, protein etkileşimlerini, oligomerizasyonunu, fibril oluşumunu ve nörotoksisitesini düzenler, ancak α-sinükleinin (de)fosforilasyonunu düzenleyen kesin kinazlar ve fosfatazlar bilinmemektedir (Paleologou ve ark. 2010; Chen ve ark. 2005). Ubikitinasyon, sumoylasyon, glikasyon, glikosilasyon, nitrasyon ve proteoliz gibi diğer post-translasyonel modifikasyonlar, protein yükü ve yapısında değişikliklere neden olabilir. Bu, diğer proteinler ve lipitlerle değişen bağlanma afinitelerine yol açabilir, ancak bunların fonksiyonel önemi bilinmemektedir (Nonaka ve ark. 2005; Krumova ve ark. 2011; Marotta ve ark. 2012).

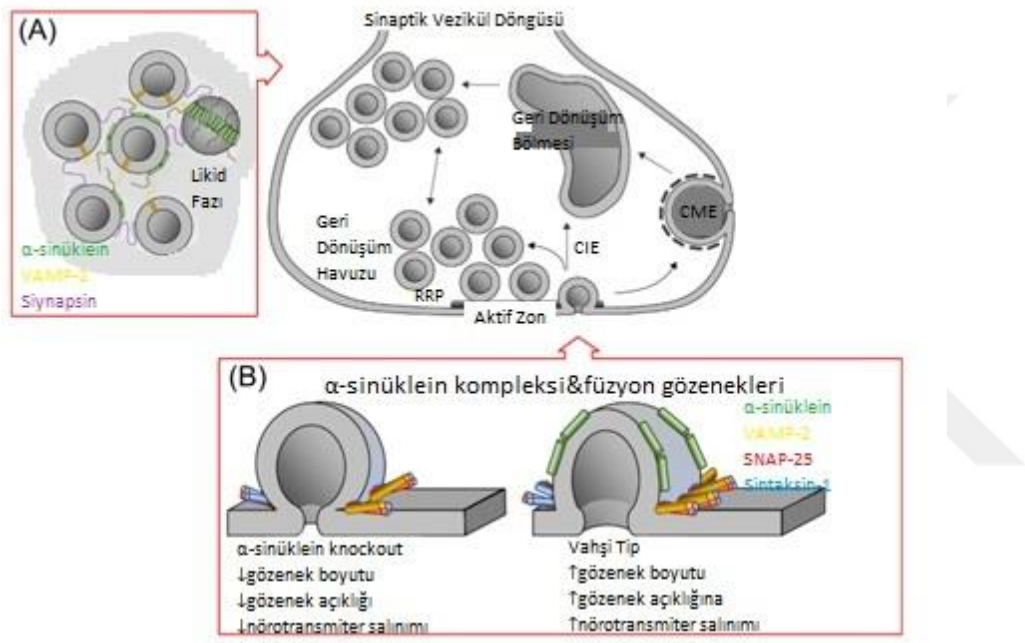
### 1.1.3. Alfa-Sinüklein Fonksiyonları

α-sinükleinin kesin işlevleri tartışılmaya devam etse de farklı çalışmalar onun nörotransmitter salınımının düzenlenmesi, sinaptik işlev ve plastisite ile mitokondriyal işlev, gen düzenlemesi ve SNARE (çözülür N-etilmaleimid duyarlı protein bağlayıcı protein reseptörleri) kompleksi düzenlenmesine katılımı gibi çeşitli hücresel işlemlerde yer aldığını öne sürmüştür.

α-sinükleinin, çoğunlukla presinaptik terminalde olmak üzere çeşitli proteinlerle etkileşime girdiği ve bunları etkilediği bildirilmiştir (Gorbatyuk ve ark. 2010; Payton ve ark. 2004). Bu, bir fosfolipaz-D bağlanmasını, G-protein rab3'ün zar etkileşiminin düzenlenmesini, SNARE-kompleks düzenlenmesine eşlik etmeyi, sinapsin III'ün bağlanmasını ve modülasyonunu, veziküler monoamin taşıyıcı-2'nin (VMAT2) bağlanmasını, dopamin ve serotonin taşıyıcıları ve tirozin hidroksilazın (TH) düzenlenmesini içerir (Wersinger ve ark. 2006; Bartels ve ark. 2011). Bu etkileşimler, presinaptik terminaldeki bir işlevle uyumlu olsa da α-sinükleinin mitokondri, endoplazmik retikulum (ER), golgi ve çekirdekte bildirilen lokalizasyonu, aşırı ekspresyon nedeniyle veya hücre bozulması sırasında değişen bir hücre altı dağılımından veya diğer zarlara yayılmasından kaynaklanabilir (Li ve ark. 2007; Thayanidhi ve ark. 2010; Burre 2015).

α-sinükleinin; vezikül kümelenmesi, SNARE kompleksi oluşumu ve vezikül havuzu homeostazı dahil olmak üzere sinaptik vezikül döngüsündeki birkaç adımı etkilediği öne

sürülmüştür (Wang ve ark. 2014). Bu roller, sinaptik vezikül havuzlarının organizasyonu ve SNARE kompleks düzeneğinin gözetimi ve füzyon gözenek dinamiğinin modülasyonu olmak üzere bağlantılı olabilen veya olmayabilen iki farklı aktiviteye ayrılmıştır (Fouke ve ark. 2021; Sun ve ark. 2019) (Şekil 2-5). Sinaptik vezikül havuzları, işlevsellik açısından kolayca salınabilen veziküller, geri dönüşüm vezikülleri ve yedek havuz vezikülleri olarak ayrılır. Bu havuzların dinamiklerindeki değişiklikler, sinaptik güç ve plastisitenin düzenlenmesinde önemli roller oynar (Rizzoli ve ark. 2005; Sharma ve ark. 2023).




**Şekil 2-5: α-sinükleinin presinaptik sinir terminalindeki fizyolojik rolü.**

A) α-sinüklein, sinaptik vezikül hareketliliğini kısıtlayan vezikül SNARE proteini VAMP2/sinaptobrevin-2 ve sinapsinler ile etkileşim yoluyla sinaptik veziküllerin kümelenmesi yoluyla havuz homeostazını korur. B) Ayrı olarak, α-sinüklein, sinaptik vezikül zarı ile presinaptik plazma zarı arasında oluşan füzyon gözenekleri üzerinde etki eder ve SNARE-kompleks düzeneğini stabilize eder, bu da gözenek boyutunun artmasına ve daha uzun gözenek açıklığına ve artan miktarda nörotransmiter salımına neden olabilir (Sharma ve ark. 2023)'den uyarlanmıştır.

α-sinükleinin sinaptik vezikül proteini VAMP2/sinaptobrevin-2'ye ve sinaptik vezikül fosfolipitlerine eşzamanlı bağlanması vezikül kümelenmesini tetikler (Sun ve ark. 2019). Bu kümelenme aynı zamanda sinapsinlerle olan etkileşimleri de içerir. Son zamanlarda, in vitro ve kültüre edilmiş nöronlarda, sinaptik vezikül kümelenmesine aracılık edebilen ve vezikül kümelenmesi üzerinde konsantrasyona bağlı bir etki ile α-sinükleini toplayan ve belirli bir α-sinüklein ve sinapsin-1 oranı gerektiren bir sinapsin sıvı fazı rapor edilmiştir (Brodin ve ark.

2022). Bu nedenle, sinapsinler, sinapsta α-sinükleini toplayarak veya stabilize ederek vezikül kümelenmesini artırabilir (Hoffmann ve ark. 2021).

α-sinüklein şaşırtıcı bir şekilde sitoplazma içinde hareketlidir (Chi ve ark. 2001). Nöronal stimülasyon üzerine, hem sinapsinler hem de α-sinüklein sinaptik veziküllerden ayrılır, presinaptik terminallerden dağılır ve sinyal kesildikten sonra hızla yeniden kümelenir (Tao-Cheng 2006). Sinapsinler, stimülasyon sırasında sinaptik veziküllerden ayrılırken, bir sinüklein dispersiyonu yalnızca ekzositozdan sonra, muhtemelen yüksek derecede kavisli sinaptik vezikül zarı füzyon sırasında plazma zarına çöktüğünde meydana gelir. Bu, α-sinükleinin yüksek eğriliğe sahip vezikülleri tercih etmesiyle desteklenir (Carnazza ve ark. 2022). Sinapsinlerin ve α-sinükleinin sinaptik vezikül bağlanması kaybının, vezikül kümelenmesi tarafından başlatılan serbest bırakmadaki engelleri kaldırması beklenir. Bu bulgular, α-sinükleinin nörotransmitter salınımı üzerindeki inhibitör etkisi ile tutarlıdır (Middleton ve ark. 2010).

α-sinükleinin sınıf A2 apolipoproteinler ile benzerliği ve α-sinüklein yokluğunda azalmış beyin palmitat, fosfatidilgliserol ve kardiyolipin metabolizması, lipid metabolizmasında bir rolü düşündürür, ancak sinüklein transgenik ve nakavt farelerden alınan beyinlerin lipidomik profili, sinükleinin lipid metabolizması üzerinde minimal etkilerini ortaya koymuştur (Golovko ve ark. 2005; Rappley, Myers, ve ark. 2009). α-sinükleinin yağ asitlerine bağlandığı ve bu nedenle sitozol ve zar bölümleri arasında bir yağ asidi taşıyıcısı olarak görev yapabileceği bildirilirken, diğer çalışmalar aksini öne sürmektedir (Lucke ve ark. 2006). Ayrıca, α-sinükleinin membran eğriliğini indüklediği ve büyük vezikülleri bağlanma afinitesi, bölünme derinliği ve yapraklar arası düzen asimetrisi tarafından yönlendirilen yüksek oranda kavisli membran tübüllerine, silindirik misellere ve veziküllere dönüştürdüğü gösterilmiştir (Varkey ve ark. 2010). Ek olarak, α-sinükleinin membran bileşenlerini organize ettiği, fosfolipid kompozisyonunu modüle ettiği ve in vitro ve in vivo olarak spesifik bir fosfolipaz D1 ve D2 inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Adamczyk ve ark. 2007). Bu, α-sinükleinin, membran lipitlerinin bölünmesine ve membran biyogenezine dahil olabileceğini düşündürür (Rappley, Gitler, ve ark. 2009). Yine de α-sinüklein ve fosfolipaz-D inhibisyonuna ilişkin veriler tartışmalıdır. Son olarak, α-sinükleinin lipid paketleme kusurlarını algıladığı ve lipid paketlemesini etkilediği ve α-sinükleinin sinaptik veziküllere bağlanmasının, özünde sıkı eğriliklerini stabilize ederek onları stabilize edebileceği bildirilmiştir (Braun ve ark. 2012).

Parkinson hastalığında pek çok nöron tipi etkilenirken, önemli bir işaret, substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybı ve bunun sonucunda dopamin sinyalinin eksikliğidir (Bernheimer ve ark. 1973). α-sinüklein fonksiyonu ve disfonksiyonunun anlaşılmasındaki ilerlemelere rağmen, dopaminerjik nöronların α-sinüklein patolojisine karşı artan savunmasızlığı, mekanik düzeyde belirsizliğini korumaktadır (Wersinger ve ark. 2006). α-sinükleinin, serotonin taşıyıcısı ile etkileşim yolağıyla sinapslardaki monoaminlerin homeostazını düzenlediği öne sürülmüştür ve α-sinüklein dopamin taşıyıcısına (DAT) bağlanır ve onun hedeflemesini ve aktivitesini düzenler (Butler ve ark. 2015; Oaks ve ark. 2013). α-sinüklein, muhtemelen tirozin hidroksilazın fosforilasyon durumunu azaltarak ve defosforile edilmiş inaktif tirozin hidroksilazı stabilize ederek, TH'ın ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ederek dopamin sentezini inhibe eder (Li ve ark. 2011). Uyumlu olarak, substantia nigra'daki α-sinüklein ekspresyonundaki yaşlanmayla ilişkili artışlar, TH'ın ekspresyonu ile negatif olarak ilişkilidir (Lou ve ark. 2010). Ek olarak, α-sinüklein VMAT-2'yi etkiler (Guo ve ark. 2008): α-sinükleinin yıkılması, vezikül başına VMAT-2 moleküllerinin yoğunluğunu arttırırken, aşırı ekspresyon, artan sitozolik dopamin seviyelerine neden olarak dopamin homeostazını kesintiye uğratarak VMAT-2 aktivitesini inhibe eder (Chadchankar ve ark. 2011). Dopamin metabolizmasındaki bir işlevle uyumlu olarak, α-sinükleinin yokluğu, dorsal striatumda dopamin geri alımının azalmasına, striatal dopaminde %36'lık bir azalmaya, striatal TH ve DAT düzeylerinde azalma ve substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların sayısında bir azalmaya neden olur (Garcia-Reitboeck ve ark. 2013).

α-sinükleinin biyokimyasal yapısı, diğer hücre içi proteinlere bağlanabilen moleküler bir şaperon işlevi öngörür (Ostrerova ve ark. 1999). Bu hipotez üç gözlemle güçlendirilmiştir: İlk olarak, α-sinüklein, moleküler şaperon proteinlerinin 14-3-3 ailesi ile yapısal ve işlevsel homolojiyi paylaşır. İkincisi, C-terminal alanı aracılığıyla, α-sinüklein, termal olarak denatüre proteinlerin toplanmasını baskılar ve α-sinükleinin aşırı ekspresyonu, dopaminerjik nöronları oksidatif stres ve apoptozdan korur (Kim ve ark. 2000). Üçüncüsü, α-sinüklein, sinaptik SNARE-komplekslerinin eşlik eden düzeneği tarafından farelerde ko-şaperon sistein dizisi protein-alfanın (CSPα) devre dışı bırakılmasının neden olduğu ölümcül nörodejenerasyonu kurtarır (Chandra ve ark. 2005). α-, β-, γ-sinüklein üçlü nakavt fareler, azalmış SNARE kompleksi düzeneğine sahip olduğundan, nöropatolojik belirtiler gösterdiğinden ve daha kısa

hayatta kalma süresi ortaya koyduğundan, α-sinükleinin bu işlevi nöronların uzun süreli işleyişi için gereklidir (Greten-Harrison ve ark. 2010). Bu şaperon işlevi, α-sinükleinin hücre sağkalımı ve nörotransmitter salımı üzerindeki akut etkisinin olmaması ile tutarlıdır ve stresli koşullar altında ve bir nöronun uzun ömrü boyunca özellikle önemli hale gelebilir (Anwar ve ark. 2011; Burre 2015).

### 1.1.4. Alfa-Sinüklein Birikimi

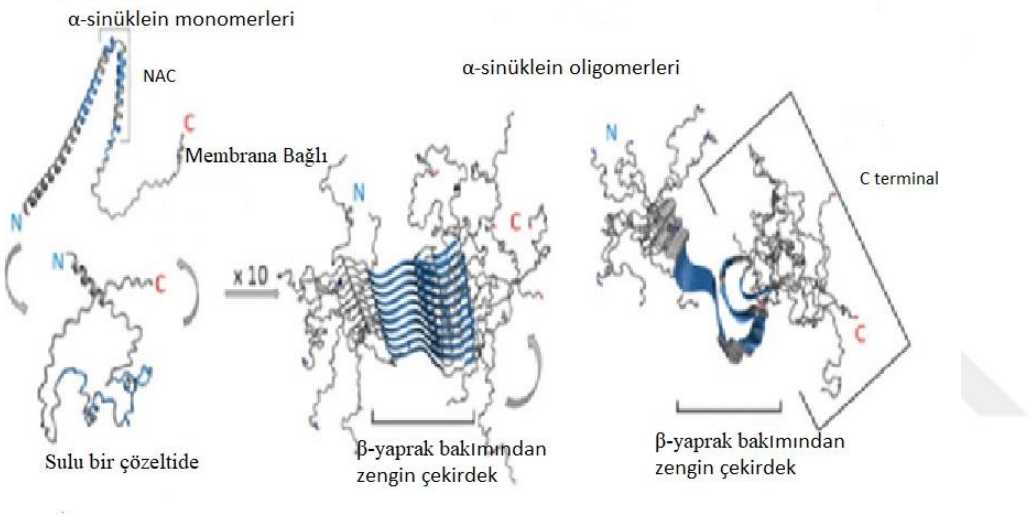
α-sinüklein proteini normalde düzensiz monomer ve istatistiksel olarak uygun olmayan sarmal oligomerlerin, yani tetramerlerin dinamik bir dengesinde bulunur (Georgieva ve ark. 2008). Membrana bağlı α-sinüklein, sarmal olmayan bir bağlayıcı ile ayrılmış iki uzatılmış yüzeye bağlı α-sarmalı benimser (Bartels ve ark. 2011). Uzatılmış bir α-sinüklein sarmal formu, kümelenmeye karşı daha dirençli olabilecek homotetramerler oluşturabilir. Ayrıca, bu tetramerler vezikül transportunda α-sinükleinin normal bir işlevine katılabilir (Wang ve ark. 2014). Bununla birlikte, α-sarmal formu patojenik olarak kabul edilmez (Nuber ve ark. 2018).

α-sinüklein, farklı nörotoksik özellikler sergileyen monomerler (modifikasyonlarında ve nihai nokta mutasyonlarında farklılık gösteren), oligomerler (büyük çeşitlilik ve heterojenlik sergileyen) ve fibriller (birkaç polimorf) dahil olmak üzere çeşitli türlerden oluşan bir spektrum sunar (Alam ve ark. 2019). α-sinükleinin kümelenme eğilimi, spesifik hücresel mikro ortam koşullarına (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet), makromolekülerin birikimine (amiloidojenik proteinler, metal iyonları, aracı toksik türler, zarlar ve spesifik lipid molekülleri) ve diğer ligandların varlığına bağlıdır (Uversky ve ark. 2002). Ek olarak, posttranslasyonel modifikasyonlar (PTM) α-sinüklein boyutunda, yükünde, yapısında ve konformasyonunda değişikliklere neden olarak membran bağlanmasını, agregasyonunu ve toksisitesini modüle eder (Grosso Jasutkar ve ark. 2022). Proteoliz, fosforilasyon, nitrasyon, glikosilasyon, O-GlcNAsilasyon (O-bağlı N-asetilglukosaminilasyon), lipidasyon, oksidasyon, asilasyon, ubikuitinasyon, SUMOylasyon (küçük ubiquitin benzeri değiştirici) ve N-terminal asetilasyonu dahil olmak üzere 300'den fazla farklı α-sinüklein PTM'si tarif edilmiştir (Beyer 2006). α-sinükleinin C-terminal bölgesi, toksisitesini değiştirerek fosforile edilebilen bir serin ve üç tirozin kalıntısı içerir (Soldner ve ark. 2016). Şaşırtıcı bir şekilde, Lewy cisimciklerinde (LB) bulunan α-sinükleinin %90'ı fosforile serin 129 içerir, bu da LB oluşumunda bu modifikasyonun gerekliliğini düşündürür (Beyer ve ark. 2013). Öte yandan, tirozin 125'teki fosforilasyon α-sinüklein fibrilizasyonunu etkilemezken, tirozin 133 ve tirozin 135'teki

fosforilasyonun α-sinüklein üzerindeki etkisi bilinmemektedir (Zhang ve ark. 2019). α-sinükleinin N ucundaki tirozin 39'un fosforilasyonu, agregasyonunu tetikler ve α-sinükleinin şaperonlarla etkileşimlerini doğrudan bozarak nörotoksisitesini artırır (Burmann ve ark. 2020). Fosforilasyonun yanı sıra, LB'lerdeki α-sinükleinin %10-30'u N veya C-terminallerinde kesilir (Twohig ve ark. 2019). Ek olarak, LB'lerde belirgin şekilde yüksek SUMOillenmiş α-sinüklein (SUMO ve lizin kalıntılarının konjugatları) bulunmuştur. Birkaç kapsamlı in vitro çalışmalar, SUMOylasyonun α-sinüklein agregasyon eğilimi üzerindeki bölgeye özgü etkilerini bildirmiştir. SUMOylasyon, α-sinüklein agregasyonunu doğrudan ve bozunmasını bloke ederek teşvik ederken, diğer lizin kalıntılarının SUMOylasyonu α-sinüklein agregasyon yolağını inhibe eder (Rott ve ark. 2017). Alternatif olarak, farelerde ve insanlarda in vivo bulunan birkaç treonin kalıntısının O-GlcNAsilasyonu, α-sinüklein toksisitesini artırmaz. Ayrıca, spesifik olarak sentezlenmiş ve enzimatik olarak O-GlcNAsile edilmiş birkaç treonin kalıntısı, tam uzunluktaki α-sinüklein fibrilleşmesini inhibe ederken, bazıları PH'ın yayılmasında yer alan hücre dışı α-sinüklein fibrillerinin toksisitesini azaltır. Bahsedilen PTM'lerin yanı sıra, enzimatik olmayan oksidatif modifikasyon (örneğin, metiyonin oksidasyonu, nitrasyon ve oksidatif tirozin dimerizasyonu) ve oksidatif dopamin eklentileri ile modifikasyon, α-sinükleinin kümelenme eğilimini etkiler (Krumova ve ark. 2011; Marotta ve ark. 2015). α-sinükleinin hem nitrasyonu hem de oksidasyonu, ditirozin çapraz bağlanması yoluyla dimerizasyon ve oligomerizasyondan sorumlu olası mekanizmalar olarak önerilmiştir. İnsan LB'lerinden izole edilen α-sinükleinde nitratlanmış dört tirozin kalıntısı bulunmuştur (Beyer 2006; Schmidt ve ark. 2022). α-sinükleinin in vitro kümelenmesi, bir çekirdeklenme-polimerizasyon mekanizmasına işaret eden sigmoidal bir profil gösterir. Bu, çözünür α-sinüklein monomerlerinin geçici oligomerik yapılar oluşturduğu ve daha sonra yapısal olarak daha düzenli çözünmez fibriler kümeler halinde birleştiği anlamına gelir.

α-sinüklein proteini, önceden yapılandırılmamış polipeptitin tamamını veya bir kısmını iyi tanımlanmış, β-tabaka açısından zengin ikincil yapılara dönüştürerek fibriller oluşturur (Paciotti ve ark. 2018). Buna uygun olarak, α-sinüklein oligomerleri yüksek yapısal çeşitlilik sergilemiştir, yani bazıları β-yaprak bakımından zenginken diğerleri düzensizdir (Celej ve ark. 2012) (Şekil 2-6). PH hastalarında bulunan yedi nokta mutasyonları (A30P, E46K, H50Q, G51D ve A53E/T/V) α-sinüklein kümelenmesini ve daha fazla birikimi tetikleyerek α-sinüklein yanlış katlanmasında bu bölgelerin önemini düşündürür. PH ile ilişkili nokta mutasyonlarının α-sinüklein 3D yapısını etkilemediğini ortaya çıkarsa da, A30P, α-sarmal eğilimini azaltırken, E46K mutasyonu, N ve C-terminalleri arasındaki temasları arttırdığı saptanmıştır (Breydo ve

ark. 2012). Son olarak, A30P mutasyonu α-sinüklein oligomerizasyonunu desteklerken, A53T ve E46K mutasyonları fibrilasyonu destekler (Meade ve ark. 2019). α-sinükleinin PH etiyolojisindeki tam işlevi ve ayrıca dopaminerjik nöron dejenerasyonunun altında yatan moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (Bavinton ve ark. 2022). Bu süreçlerin hücresel patolojik sonuçları, oksidatif stres, mitokondriyal işlev bozukluğu, ER-Golgi ve sinaptik vezikül transportunun bozulması, zar bütünlüğü kaybı, ubikuitin-proteazom sisteminin değişmesi, inflamasyon ile ilişkili bağışıklık sisteminin bozulması, hücre yaşlanması ile ilgilidir (Conway ve ark. 2001).




**Şekil 2-6: α-sinüklein monomerlerinin ve oligomerin üç boyutlu modelleri.**

α-sinüklein monomerlerinin (sulu bir çözeltide membrana bağlı ve yapılandırılmamış) ve oligomerin üç boyutlu modelleri. Oligomerlerdeki moleküller arası etkileşimlerde yer alan ve β-yaprak bakımından zengin çekirdek oluşturan amino asit kalıntıları mavi renkle gösterilmiştir. Monomerlerin N-terminal bölgeleri mavi ile gösterilirken, C-terminalleri kırmızı ile gösterilir (Vidovic ve ark. 2022)'den uyarlanmıştır.

Nükleer α-sinükleinin anormal birikimi, DNA hasarı ve nörotoksisite ile ilişkilendirilmiştir (Ma ve ark. 2014). α-sinüklein oligomerleri ve kümelerinin neden olduğu varsayılan nörotoksisite, bozulmuş zar geçirgenliği ve bunların hücreden hücreye transferiyle ilişkilendirilmiştir (Santos ve ark. 2022). α-sinüklein oligomerleri, yüzeydeki oldukça hidrofobik bir bölge aracılığıyla ve lipit çift tabakasına yerleştirilebilen ve in vitro zar bütünlüğünü bozabilen β-yaprakları bakımından zengin sert bir çekirdek aracılığıyla zarlarla güçlü bir şekilde etkileşime girebilir. Artan membran geçirgenliği, artan reaktif oksijen türleri (ROS) birikimine ve bazal hücre içi $Ca^{2+}$ düzeylerinin artmasına neden olarak hücre ölümüne neden olur (Deas ve ark. 2016). Öte yandan, ailesel PH vakalarında bulunan A30P ve G51D

yanlış anlamlı mutasyonlar, daha düşük membran afinitesi sergiler ve çözünebilir oligomerler şeklinde toksik olabilir (Ysselstein ve ark. 2015). Bununla ilgili olarak, katlanmamış α-sinüklein monomerleri vezikül zarlarını in vitro olarak bükebilir ve stabilize edebilir, bu da ekzositoz sırasında zar füzyon olaylarını engelleyebilir (Wang ve ark. 2014). Tetramer oluşumlarını ortadan kaldıran mutasyonlar, çözünmez, yüksek oranda fosforile edilmiş, C-terminalleri kesik proteinler haline gelir ve ayrıca lipit vezikülleri içinde birikir. α-sinüklein fibrillerinin C-terminal kuyruklarının daha yüksek erişilebilirliği, proteazoma bağlanmaktan ve proteolitik aktiviteyi bloke etmekten sorumludur (Suzuki ve ark. 2020). Reseptörlerin aracılık ettiği hücreden hücreye transfer veya sözde "prion benzeri" hipotez, α-sinüklein oligomerlerinin nöronlar arasında göç edebildiğini öne sürmektedir (Beyer 2006). Ayrıca, asidik α-sinüklein C-terminali, lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG3) ve amiloid öncü benzeri protein-1 (APP-1) gibi hücre yüzeyi reseptörleri üzerindeki alkali yamalar ile etkileşime girer (Zhang ve ark. 2021). Amiloid fibril oluşumu, monomerde korunan daha erişilebilir C-terminali nedeniyle reseptörlere bağlanmayı önemli ölçüde artırır (>200 kat). Ayrıca serin 129 fosforilasyonu, farelerde PH benzeri patolojiyi hızlandırarak α-sinüklein ve reseptörler arasındaki elektrostatik etkileşimleri ayrıca güçlendirir (Zhang ve ark. 2021). Hücre yüzeyleri üzerindeki heparan sülfat proteoglikanlarının endositoz yoluyla α-sinüklein amiloid fibrillerinin alımına katıldığı da gösterilmiştir (Holmes ve ark. 2013). Ek olarak, mikroglial α-sinüklein alımı türe özgüdür. Örneğin, nöronlarda ve glial hücrelerde bulunan Toll benzeri reseptör-2 (TLR2) yolağıyla yalnızca β-yaprak bakımından zenginleştirilmiş oligomerler içselleştirilebilir (Kim ve ark. 2013). Bu şekilde, oligomerler substantia nigra boyunca ve ekstranigral bölgelere LB oluşumunu yayar ve çoğaltır. Toksik α-sinüklein formlarının beyne enjeksiyonunu takiben farelerde α-sinüklein yayılımı doğrulanmıştır. İnsanlarda, toksik α-sinüklein türlerinin hücreden hücreye transferine dair kanıtlar hala azdır (Grosso Jasutkar ve ark. 2022).

### 1.1.5. Hücre Dışı Alfa-Sinüklein

Hücre dışı α-sinüklein oligomerleri, nörotoksik ve nöroinflamatuar aktivite sergileyebilir. PH'deki bağışıklık sistemi bozukluğu, mikrogliada aşırı α-sinüklein birikimine bağlıdır, bu da adaptif bağışıklığın daha güçlü aktivasyonuna yol açar (Su ve ark. 2021). Araştırmacılar, "çift vuruş" olarak bilinen α-sinüklein kümelenmesini, nörotropik bir viral patojen veya bir toksin gibi çevresel faktörlere yanıt olarak koku alma epiteli ve/veya bağırsak mukozası gibi ekstra bir MSS bölgesinde başlatıldığına dair alternatif bir hipotez öne sürmüşlerdir (Jan ve ark. 2021).

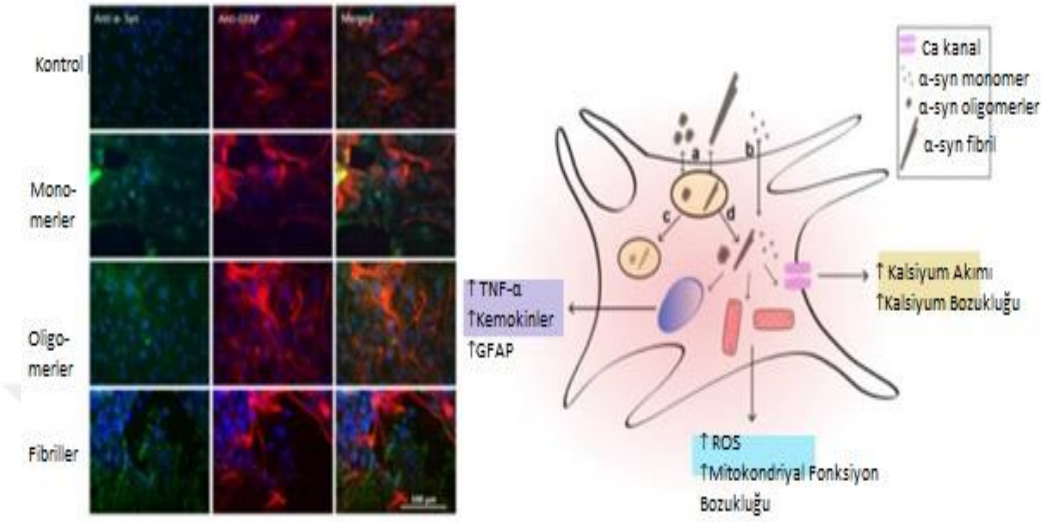
PH'de MSS'nin kısıtlı bölgelerinde ve periferik sinir sisteminde bir miktar hücre kaybı olduğudur. Parkinson hastalığında nöronal seçici kırılganlık üzerine bazı hipotezler son zamanlarda dikkat çekmektedir. Bunlar esas olarak dopamin toksisitesi, hücre demir içeriği ve aksonal arborizasyon boyutu ile ilgilidir (Engelender ve ark. 2017). Çözünür monomerik α-sinüklein, sinir sisteminin farklı hücreleri tarafından çok sayıda spesifik olmayan mekanizma ile hücre içine alınabilir. Bazı araştırmacılar, monomerik α-sinükleinin plazma zarı boyunca doğrudan translokasyonu olduğunu ve endositoz için herhangi bir reseptörün görevini önlediğini öne sürmüşlerdir (Lee 2008). Outeiro'nun grubu tarafından yapılan bir çalışma, insan nöroglioma H4 hücrelerinde, α-sinükleinin hücre içine alınmasına, plazma zarı ile etkileşiminin aracılık ettiğini göstermiştir (Masaracchia ve ark. 2018). Ahn ve ark. α-sinüklein primer sekansında bulunan 11-amino asit tekrarlarının, proteinin membran translokasyonunda kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Ahn ve ark. 2006). Bununla birlikte, α-sinükleinin klatrin aracılı endositoz tarafından alımı, nöronlarda, oligodendrositlerde ve mikrogliada in vitro olarak gösterilmiştir (Stefanova ve ark. 2011). α-sinüklein alımı, bu yolağın bloke edilmesiyle tam olarak inhibe edilememiştir, bu da kaveolar endositoz gibi alternatif giriş yolakları önermektedir. α-sinükleinin hücre içine alınması, her tür için (monomerik, oligomerik veya fibriler α-sinüklein) oldukça farklı görünmektedir. Proteinin oligomerik ve fibriler formları, α-sinüklein konformasyonlarının farklı membran reseptörleri ile etkileşimi tarafından tetiklenen endositoz yoluyla hücreler tarafından hücre içine alınabilir. Hücre dışı α-sinüklein çözünür oligomerlerinin ve fibrillerin alımında farklı reseptörler yer alır (Ihse ve ark. 2017). Ancak birçok soru ortaya çıkıyor: α-sinüklein bu hücrelerin içine nasıl giriyor? α-sinüklein için spesifik bir reseptör var mı? α-sinükleinin farklı konformerleri (monomer, oligomer ve fibriller) aynı reseptörleri mi paylaşıyor? Hücre dışı α-sinüklein için hücre içine alma mekanizmaları hala tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (Chavarria ve ark. 2022).

### 1.1.6. Astrositlerin Hücre Dışı Alfa-Sinüklein'in Alımındaki Rolü

Astrositler, MSS'deki nöronlardan sayıca fazladır ve kan akışının düzenlenmesi, kan-beyin bariyerinin (KBB) sürdürülmesi ve iyonların hücre dışı ortamının bileşiminin sürdürülmesi dahil olmak üzere çok çeşitli önemli işlevlerden sorumludur (Sofroniew ve ark. 2010). Son çalışmalar, astrositlerin nörotransmisyon, hücre sinyali, inflamasyon, sinaps modülasyonu ve metabolit ve elektrolit homeostazını modüle etmede önemli roller oynadığını göstermektedir (Mavroeidi ve ark. 2021). Yaralanma veya hastalık nedeniyle MSS'de meydana

gelen hasar, astrositlerde moleküler, hücresel ve fonksiyonel değişikliklere neden olarak "reaktif astroglioza" yol açabilir. Astrosit aktivasyonu süreci morfolojik değişiklikler ve sitokin üretimi, hücre çoğalması ve hücre göçü olmak üzere üç ana aşamaya veya özelliğe ayrılabilir. Reaktif astrogliozu tanımlayan bazı özellikler; astrosit hipertrofisi, uzantıların gelişimi ve hücre proliferasyonu, hücre iskeleti glial fibril asidik proteinin (GFAP) artan ekspresyonu ve gen ekspresyonundaki değişikliklerdir (Sofroniew 2009). Diğer glial hücrelerin yanı sıra, astrositler α-sinükleini çok düşük seviyelerde eksprese eder. Bununla birlikte, vahşi tip veya mutant α-sinükleinin astrositler tarafından alınması astrosit reaktivitesini indükler, nörotoksisite sergiler veya inflamasyonu indükler. Sinükleinopatilerin gelişiminde, astrositler ya α-sinüklein tarafından ya da aktive edilmiş mikroglia tarafından aktive edilebilir. Farklı α-sinükleinin kümelenmiş formları, bir inflamatuar yanıtı indüklemek için glial hücreleri aktive eder (Chavarria ve ark. 2018). Nöron kökenli α-sinüklein kümelerine maruz kalan astrositler, farklı proinflamatuar sitokinler ve kemokinlerin indüklenmesiyle gen ekspresyon profillerinde değişikliklere uğramaktadır. Reaktif astrositler, proinflamatuar sitokinlerin salınmasını teşvik edebilir ve reaktif oksijen türlerinin üretimini indükleyebilir, bu da nöronal sağkalımı ve nöronal fonksiyonları etkiler. Oksidatif stres, PH'nin ve diğer birçok nörodejeneratif hastalığın patojenik mekanizmalarında rol oynamaktadır (Schipper ve ark. 1998). Patolojik α-sinüklein birikimi, sinir sistemindeki redoks homeostazını bozar; ölüm sonrası PH orta beyinde nükleer faktör eritroid 2 (NFE2) ile ilişkili faktör-2'nin (Nrf2) nükleer lokalizasyonunda bir artış saptanır (Delaidelli ve ark. 2021). Bu mekanizma da astrositlerin önemi, aynı zamanda nöronal α-sinükleinin klirensine katılımlarıdır, bu da astrositlerin nöronal α-sinükleinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Tsunemi ve ark. 2020). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, astrositlerin α-sinüklein kümelerini hücre içine aldıkları ve bunları proteazomal ve otofajik yolaklarla etkili bir şekilde bozduğu öne sürülmüştür (di Domenico ve ark. 2019). Mitokondriyal disfonksiyon ve α-sinüklein arasındaki bir ilişki daha önce PH'de bildirilmiştir. Bununla birlikte, PH'deki çoğu mitokondriyal çalışma nöronal hücrelerde yapılmıştır. PH hastalarının mitokondrisinde α-sinüklein birikimi ve azalmış kompleks I aktivitesi bulunurken, mutasyona uğramış A53T α-sinükleini aşırı eksprese eden farelerde kompleks IV aktivitesi azalmıştır (Devi ve ark. 2008). Önceki çalışmalar, astrosit aracılı toksisitenin astrositlerde mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Cassina ve ark. 2008). Kültüre edilmiş astrositlerin; farklı α-sinüklein formlarına (monomer, oligomer ve fibril) maruz bırakılmasının mitokondriyal disfonksiyon, proinflamatuar sitokin üretimi ve ROS oluşumu ile karakterize olan aktif bir fenotipe yol açtığı gösterilmiştir. Şekil 2-

7’de, primer kortikal sıçan astrositlerinin monomerik, oligomerik veya fibriler α-sinüklein ile inkübasyonundan sonra GFAP immünoreaktivitesindeki artışı göstermektedir (Chavarria ve ark. 2018).



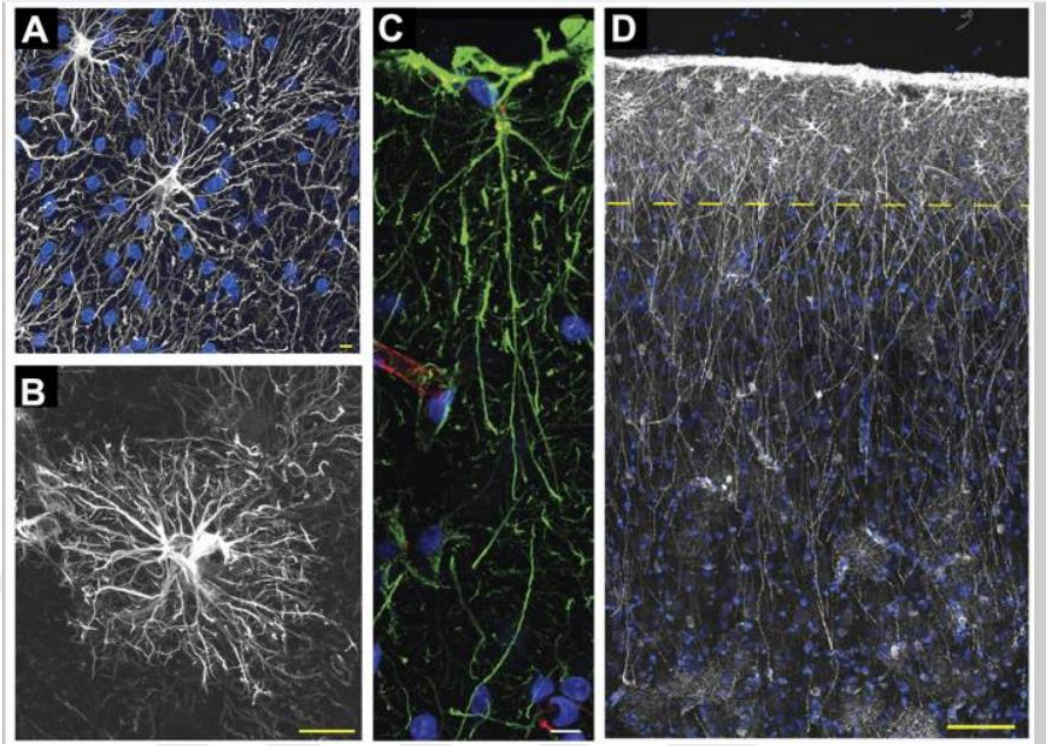

**Şekil 2-7: Astrositin şematik gösterimi ve farklı α-sinüklein konformerleri ile etkileşimleri.**

Sol. GFAP (kırmızı) ve α-sinüklein (yeşil) immünofloresan işaretleme. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyandı. Yenidoğan sıçanlardan elde edilen primer kortikal astrosit kültürü, 24 saat boyunca farklı α-sinüklein türlerine maruz bırakıldı. Sağ. (a) yüksek moleküler ağırlıklı türlerin endositoz yolu, (b) α-sinüklein monomerinin hücre zarı translokasyonu, (c) lizozomal bozunma süreci ve (d) farklı hücre organelleri ve proteinleri ile sitoplazmik serbestleşme ve etkileşim. (Chavarria ve ark. 2018)’den uyarlanmıştır.

Astrositlerin hücre yapısı, düz ve çokyüzlü hücrelerin oluşumu, soma ve çekirdeklerin geri çekilmesi ve uzun ince uzantılarının oluşumu ile oligomerik ve fibriler α-sinükleine maruz kaldığında önemli ölçüde değişir. Morfolojik değişikliklerle birlikte oligomer ve fibriler α-sinüklein maruziyeti üzerine astrositlerde GFAP proteininin immün boyamasında bir artış vardır. α-sinüklein çözünür oligomerleri ve fibrilleri, astrositlerde TNF-alfa ve IL-1β mRNA’sını indükler. Tüm α-sinüklein konformerlerinin, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumunu indüklediği, ancak yalnızca çözünür oligomerik formların, kortikal astrositlerde mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açtığı saptanmıştır. Bu aktive edilmiş astrositler, ko-kültürlerde nöronal sağkalımı etkiler (Chavarria ve ark. 2018). Ko-kültürlere farklı α-sinüklein formlarının uygulanmasının, kontrole göre nöron sağkalımını önemli ölçüde azalttığı ve monomerik, oligomerik ve fibriler α-sinüklein için sırasıyla %58, %55 ve %15 sağ kalım oranına neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, α-sinüklein konformerleri tarafından aktive edilen astrositlerin nöronal ölümünü indükleyebileceğini veya trofik destek sağlamada daha az etkili olabileceğini göstermektedir (Chavarria ve ark. 2022).

## 1.2. Astrositler

Astrositler, MSS'de en bol bulunan glial hücre tipidir. Uzun zamandır nöronlara yapısal destek sağlayan pasif hücreler olarak kabul edilmişlerdir, ancak artık MSS'yi desteklemek ve sürdürmek için gerekli olan çok sayıda işlevi yerine getirdikleri kabul edilmektedir (Sofroniew ve ark. 2010). Başlangıçta, iki ana alt tip karakterize edilmiştir: sırasıyla gri maddede (GM) bulunan protoplazmik astrositler ve beyaz maddede (WM) bulunan fibröz astrositlerdir (Miller ve ark. 1984). Protoplazmik astrositler, çok sayıda sinapsla temas eden ve uç ayakları ile kan damarlarını saran, globoid bir dağılıma yönelik yoğun çalımsı uzantı dalları gösterir. Aksine, fibröz astrositler daha küçük, uzun hücre somalarına ve miyelinli aksonlarla hizalanan ve Ranvier düğümlerinde kan damarları ve aksonlarla temas eden uzun, lif benzeri uzantılara sahiptir (Sofroniew ve ark. 2010). Buna ek olarak, glutamat taşıyıcılarının, iyon kanallarının, boşluk bağlantı proteinlerinin ve reseptörlerin ekspresyonu ile ilgili olarak moleküler düzeyde çeşitlilik gösterebilir. Bu farklılıklar, astrositlerin MSS'deki konumlarına göre özelleşebileceğini göstermektedir (Oberheim ve ark. 2012). Son zamanlarda, insan ve insan olmayan primatların beyinlerindeki astrositlere, yalnızca astrositlerin insan patolojisi araştırmalarındaki önemi nedeniyle değil, aynı zamanda olağanüstü karmaşıklıkları ve heterojenlikleri ve ayrıca ileri bilişsel işlevlerin evrimdeki potansiyel rolleri nedeniyle gösterilen ilginin arttığı saptanmıştır. Protoplazmik ve fibröz astrositler tüm memeli türlerinde bulunabilirken, primat serebral kortekste yüksek derecede gelişim gösteren interlaminar astrositler (ILA'lar) ve variköz projeksiyon astrositler (VP-As) olarak adlandırılan iki tür astrositin varlığı saptanmıştır (King 1966; Falcone 2022) (Şekil 2-8).




**Şekil 2-8: İnsan beynindeki astrositler.**

(A) Tipik insan protoplazmik astrosit. Beyaz: GFAP; mavi: DAPI. Ölçek büyüklüğü: 20 µm. (B) Beyaz maddede insan Fibröz astrositler. Gri: GFAP. Ölçek büyüklüğü: 10 µm. (C) Rhesus makak dorsofrontal kortekste ILA örneği. Yeşil: GFAP; Kırmızı: Lektin; Mavi: DAPI. Ölçek büyüklüğü: 20 µm. (D) Pial yüzeyi ve insan korteksinin bir ila iki katmanı. Kesikli sarı çizgi, katman 1 ve 2 arasındaki sınırı gösterir. Beyaz: GFAP; Mavi: DAPI. Ölçek büyüklüğü, 100 µm. (Falcone 2022)'den uyarlanmıştır.

İnterlaminar astrositlerin (ILA) hücre gövdeleri kortikal katman I'de, piaya çok yakındır ve piaya dik olarak daha derin kortikal katmanlara doğru ilerleyen ve insanlarda IV. katmana ulaşan uzun, GFAP+ katmanlar arası uzantılara sahiptir. Pial ILA'lar kesinlikle pial yüzeyi ile ilişkilidir, oysa subpial ILA'ların somataları üst katman I'dedir ancak pia'ya bağlı değildir. ILA'lar uzun süre primata özgü bir hücre tipi olarak kabul edilmiştir (Colombo ve ark. 2006). İlk olarak 1893'te onlara kaudat nöroglial lif hücreleri adını veren Andriezen tarafından tanımlanmışlardır (Andriezen 1893; Falcone 2022).

Variköz projeksiyon astrositler (VP-A), serebral korteksin daha derin katmanlarında ve beyaz cevherde bulunan başka bir büyüleyici GFAP+ astrosit türüdür; belirgin, eşit aralıklı varislerle birlikte gür kısa uzantılarla karakterize edilirler. İlk olarak Dr. Needergard'ın birkaç insan korteks örneğinde ve bir şempanze korteks örneğinde morfolojilerini ve varlıklarını gösteren grubu tarafından tanımlandılar (Oberheim ve ark. 2006). VP-A'lar o zamandan beri

"insana özgü" astrositler olarak anılmaktadır (Verkhratsky ve ark. 2018); bununla birlikte, daha yakın tarihli bir çalışma, soma şekli ve boyutu, uzantı uzunluğu ve varislerin yoğunluğu açısından benzer morfolojiye sahip beş farklı büyük maymun türünde de varlıklarını tanımlamıştır (Falcone et al., 2021;(Falcone 2022).

Olgun astrositler, genellikle radyal olarak yönlendirilmiş süreçlerle yıldız benzeri görünümleri ve majör ara filament GFAP proteinin ekspresyonu ile tanınabilir (Sofroniew ve ark. 2010). Bununla birlikte, GFAP'ın ekspresyonu tüm sağlıklı astrositlerde tespit edilemez ve MSS bölgesi ve aktivasyon durumuna göre büyük ölçüde değişir (Khakh ve ark. 2015). Son birkaç yılda yeni astrosit belirteçlerinin tanımlanması, farklı astroglial alt tiplerin karakterizasyonunu sağlayarak işlevlerine dair ipuçları sağlamıştır. Bunlar, kalsiyum bağlayıcı protein β (S100-β), glutamat taşıyıcı 1 (GLT-1), glutamat aspartat taşıyıcı (GLAST), aldehit dehidrojenaz 1 aile üyesi L1 (ALDH1A1), aldolaz C, aquaporin-4 (AQP4) ve Sox9'u içerir (Regan ve ark. 2007).

**Hücre içi faktörler**

Ortaya çıkan kanıtlar, MSS bölgeleri boyunca morfolojik ve moleküler astroglia heterojenliğini göstermektedir, ancak bu çeşitliliği yönlendiren mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır (Regan ve ark. 2007). Nöronlar için, erken gelişim sırasında nöroepitelyumun morfojenler tarafından ayrı progenitör alanlara modellenmesiyle farklı alt tiplerin üretildiği iyi bilinmektedir (Molofsky ve ark. 2012). Sonuç olarak, bu progenitörler, transkripsiyon faktörlerinin benzersiz bir kombinasyonunu eksprese ederek, bölgeye bağlı bir şekilde çeşitli hücre tiplerine yol açar. Geç embriyonik gelişim sırasında ana astrosit kaynağı, nöroepitelyumdan türetilen GFAP+ hücreler olan ventriküler bölgedeki radyal gliadır. Radyal glia, multipotent nöral kök hücre (NSC) benzeri özelliklere sahiptir ve nöronlara ve gliojenik bir geçişten sonra oligodendrositler ve astrositlere yol açar (Bayraktar ve ark. 2014). Ek olarak, subventriküler bölgedeki (SVZ) yetişkinliğe kadar devam eden progenitörler, internöronlara farklılaşabilir, ancak aynı zamanda GM veya WM'de oligodendrositlere ve astrositlere yol açar (Khakh ve ark. 2015). Radyal glia ve SVZ progenitörleri, farklı uzamsal alanlarda düzenlenir, bu da uzamsal modellemenin gerçekten de astrositlerin heterojenliğine katkıda bulunabileceğini düşündürür (Yang ve ark. 2019). Bunu desteklemek için yetişkin korteksinin klonal analizi, protoplazmik ve fibröz astrositlerin ayrı hücre soylarından kökenlendiğini ortaya çıkarmaktadır. Ek olarak, nöral/glial-antijen-2 (NG2) veya oligodendrosit öncü hücreler

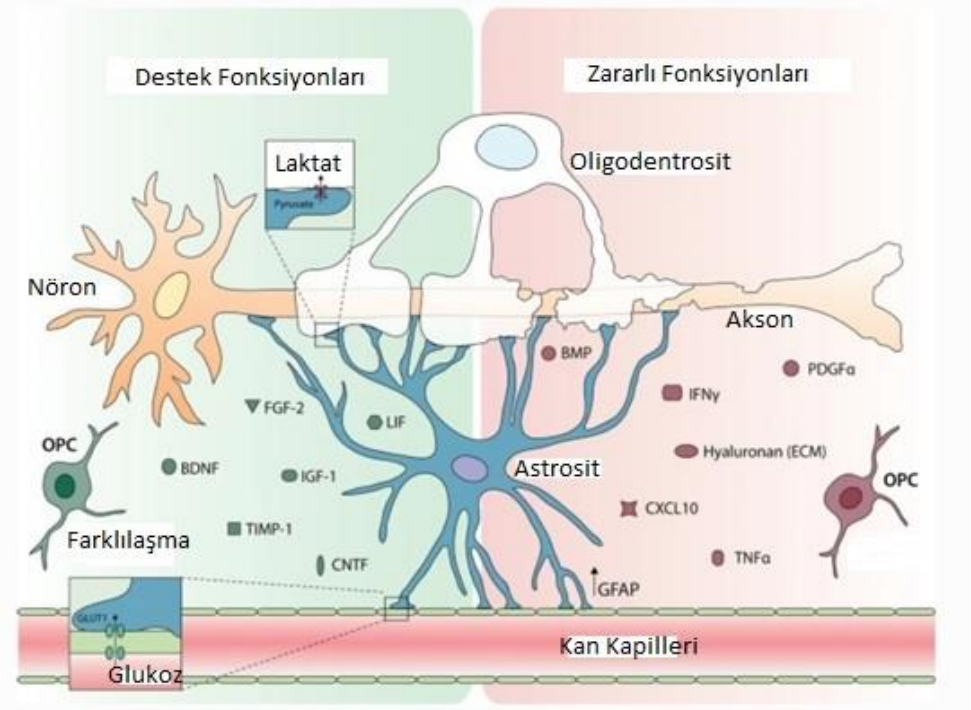
(OPC'ler) olarak adlandırılan proteoglikan NG2'yi eksprese eden progenitörler, yaşam boyunca GM ve WM'de miyelinleştirici oligodendrositlere yol açar (Zhu ve ark. 2008). Buna karşılık, yenidoğan ve yetişkin ön beyindeki progenitörlerin bir alt kümesinde eksprese edilen oligodendrosit transkripsiyon faktörü-2 (Olig2), oligodendrositlerin ve WM'nin farklılaşmasında rol oynar, ancak GM astrositlerinde yer almaz (Ono ve ark. 2008).

**Hücre dışı faktörler**

Astroglia, aynı MSS bölgesinde bir arada bulunan farklı alt tiplerle yerel düzeyde çeşitlilik gösterir (Oberheim ve ark. 2012). Serebral kortekste astrositler, katmanları boyunca morfolojik, moleküler ve transkripsiyonel özellikler bakımından çeşitlilik gösterir (Oberheim ve ark. 2009). Belirgin astrosit alt türleri de hipokampal alt bölgelerde bulunur (Emsley ve ark. 2006). Ek olarak, serebellar korteks, sırasıyla granüler ve Purkinje hücre tabakasında variköz astrositlerin ve Bergmann glia'nın bulunduğu bölge içi heterojenliği ortaya çıkarır. Aynı progenitör havuzundan türemesine rağmen, astrositlerin bu alt tipleri, farelerde farklı morfolojik özellikler ve gen ekspresyon profilleri barındırır (Kita ve ark. 2013). Bu, mikro çevresel ipuçlarının, hücresel ortamlarının gereksinimlerine göre uyarlanmış astrositlerde fonksiyonel adaptasyonları indükleyebileceğini düşündürmektedir. Bunu desteklemek için, bitişik nöronlardan gelen sinyaller yetişkin fare beynindeki olgun astrosit fenotipinin belirlenmesinde çok önemlidir (Lanjakornsiripan ve ark. 2018). Nöron kökenli morfojen sonic hedgehog (Shh), fare serebellar korteksinde variköz astrositlerin ve Bergmann glia'nın farklı moleküler ve fizyolojik profilini yönlendirir (Farmer ve ark. 2016). Benzer şekilde, Shh, olgun fare ön beyni içindeki uzamsal olarak farklı astrosit alt popülasyonlarının moleküler çeşitliliğini düzenler. Bu konudaki insan verileri seyrek olsa da, aynı beyin bölgesi içinde bile insan beynindeki şekil ve işlevdeki astrosit çeşitliliğinin kapsamı, heterojenliklerinin altında hem gelişimsel köken hem de mikro-çevresel ipuçları olduğunu öne sürmektedir (Sosunov ve ark. 2014). Gri madde astrositlerinin moleküler özelliklerini hücre dışı faktörlere yanıt olarak adapte ettiği kavramı, beyaz madde astrositlerinin aynı potansiyele sahip olup olmadığı sorusunu gündeme getirmektedir (Raff ve ark. 1983). Sonuç olarak, astroglial hücre-kader spesifikasyonu, transkripsiyon faktörü ekspresyonu, nöronal geri bildirim ve ayrıca epigenetik mekanizmalar dahil olmak üzere karmaşık hücre-içi ve hücre-dışı mekanizmaların bir kombinasyonuna bağlıdır. Bu mekanizmalar, uygun nöral ağ oluşumunu sağlamak ve memeli beyninde astroglial çeşitliliği yönlendirmek için zaman ve mekanda yüksek oranda düzenlenir (Takouda ve ark. 2017).

### 1.2.1. Beyaz Maddede Astrosit Çeşitliliği

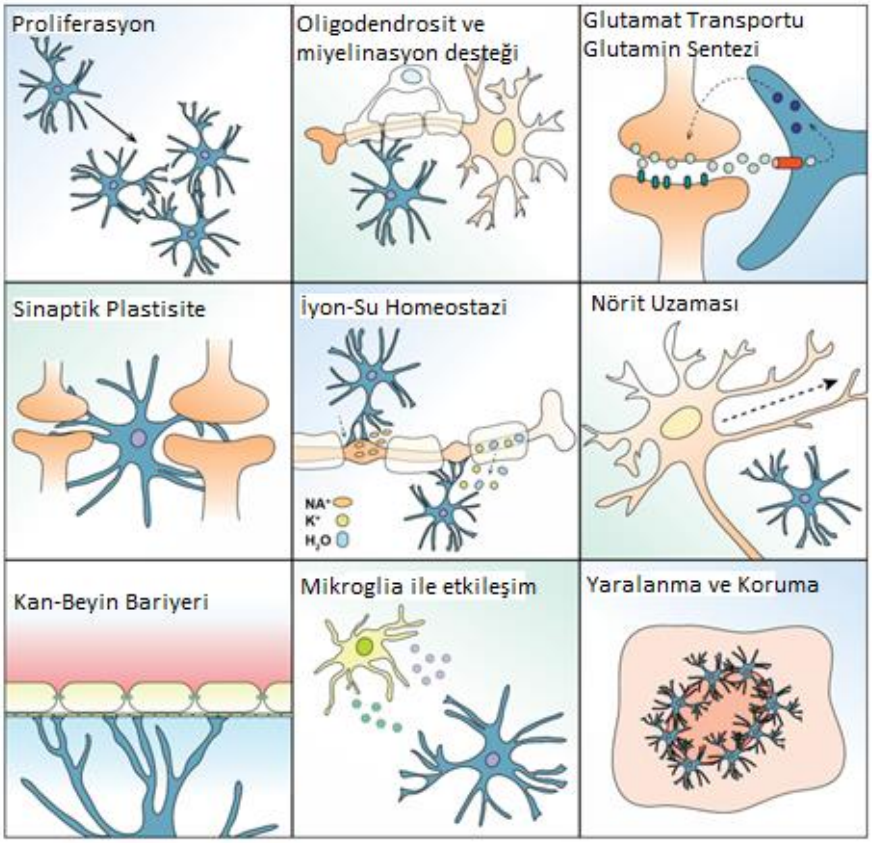
Farklı astrosit alt tipleri arasındaki morfolojik ve moleküler özelliklerdeki çeşitlilik, fonksiyonlarında da görülmektedir. Protoplazmik astrositler, gri maddede kan akışını düzenleyerek ve sinaptik iletimi şekillendirerek bilgi işlemeyi kolaylaştırırlar (Perea ve ark. 2009). Gri madde astrositlerinin işlevlerinin, çevreleyen nöronal alt tipini ve nöral çevreyi desteklemek için bölgesel olarak özelleştiği düşünülmektedir. Beyaz maddede astrositler, komşu astrositlerle kapsamlı iç içe geçmiş uzantılar gösterirler ve miyelinasyon da dahil olmak üzere sağlıklı beyaz madde gelişimini ve işlevini desteklerler (Oberheim ve ark. 2009). Beyaz madde büyük ölçüde miyelinli aksonlardan oluşur. Miyelin kılıflar, aksiyon potansiyellerinin aksonlar boyunca hızlı iletimi için çok önemlidir ve aksonal bütünlüğü ve çevre dokuların beslenmesini destekler (Nave 2010). Beyaz madde astrositleri, yaralanmayı takiben hem gelişimsel miyelinasyonda hem de remiyelinasyonda önemli roller oynar (Şekil 2-9) (Lundgaard ve ark. 2014). Miyelinleşme sürecinin her adımına katkıda bulunurlar. Kısaca astrositler, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), lösemi inhibitör faktörü (LIF) ve metaloproteinaz-1 doku inhibitörü (TIMP-1) dahil büyüme ve trofik faktörleri salgılar. Oligodendrositlerin hayatta kalmasını veya farklılaşmasını teşvik ederek miyelinasyonu arttırır (Moore ve ark. 2011).



**Şekil 2-9: Astrositlerin oligodendrosit hayatta kalması, farklılaşması ve miyelinasyonu üzerindeki destekleyici ve zararlı işlevleri.**

(Solda) Astrositler, BDNF, CNTF, IGF-1, FGF-2, LIF ve TIMP-1 dahil olmak üzere birçok salgılanan faktör aracılığıyla OPC'nin hayatta kalmasını ve miyelinleştirici oligodendrositlere farklılaşmasını destekler. Ayrıca glikoz taşıyıcıları (GLUT1) yoluyla kan dolaşımından glikoz alarak ve glikojen formunda depolayarak oligodendrositleri metabolik olarak desteklerler. (Sağda) Astrositler aynı zamanda oligodendrositler ve/veya miyelin üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir ve miyelin ve sonuç olarak aksonların bütünlüğünü tehlikeye atabilir. Bu tür astrosit türevli faktörler arasında PDGFa, TNFa, IFNy, CXCL10, BMP ve hiyalüronan gibi hücre dışı matris (ECM) bileşenleri bulunur. Ayrıca, hasar ve hastalığa yanıt olarak GFAP'yi düzenlerler. (Bugiani ve ark. 2022)'den uyarlanmıştır.

Tersine, astrositler de miyelinasyonu inhibe edebilir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-α (PDGFα) salgılanması, OPC'lerin erken farklılaşmasını önleyerek, gelişmekte olan MSS'de miyelinasyonun zamanlamasını düzenler (McKinnon ve ark. 2005). Astrositler, oligodendrositlerin hayatta kalmasını ve farklılaşmasını ve ayrıca miyelinasyonu düzenlemede ikili rol oynar. Bunu desteklemek için astrositik fenotipin miyelinasyonu destekleme yeteneklerini belirlediği gösterilmiştir. Sıçan astrositlerinin ECM glikoprotein tenasin-C üzerine ekilmesi, in vitro olarak omurilik kültürlerinin miyelinasyonunu inhibe eden hareketsiz bir fenotipi indüklerken, astrositlere sitokin CNTF uygulamak, miyelinasyonu destekleyen aktif bir fenotipi indükler. CNTF uygulanan astrositlerin pro-rejeneratif fenotipini bildiren diğer çalışmalarla uyumludur (Anwar ve ark. 2011). Bu bulgular, astrositlerin çevresel faktörlere yanıt olarak fenotiplerini değiştirebileceğini ve aktivasyon durumlarına bağlı olarak miyelinasyonu engelleyebileceğini veya destekleyebileceğini düşündürmektedir. Miyelinasyonun düzenlenmesi, astrositlerin WM homeostazını korumadaki temel rollerinin yalnızca bir kısmını temsil eder (Şekil 2-10). Astrositler, nöronlar, perisitler, endotel hücreleri ve diğer nöral olmayan hücreler dahil olmak üzere diğer hücre türleri ile çift yönlü çapraz iletişim yoluyla, sağlıklı beyaz maddenin işleyişinin neredeyse tüm yönlerini etkiler. Astrositler, salgılanan faktörler ve ECM bileşenleri aracılığıyla nörit büyümesini düzenler ve gelişim sırasında mikroglia ile etkileşime girer (örneğin, sinaptogenez). Ek olarak, KBB'nin başlatılması ve sürdürülmesine ve kan akışının düzenlenmesine katkıda bulunurlar (Bugiani ve ark. 2022).




**Şekil 2-10: Beyaz maddedeki temel astrositik fonksiyonlar.**

Astrositler, çoğalma, oligodendrositlerin desteklenmesi ve salgılanan faktörler veya doğrudan astrosit-oligodendrosit ve astrosit-aksonal etkileşimler yoluyla aksonların miyelinasyonu, glutamat taşınması ve glutamin sentezi, sinaptik nörotransmisyon ve plastisitenin düzenlenmesi, su homeostazı, nörit büyümesinin düzenlenmesi, KBB'nin sürdürülmesi, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini ve yaralanmaya karşı tepkileri indüklemek için mikroglia ile etkileşim ve hasarlı bölgeyi çevreleyen glial skar dokusunun oluşumu dahil olmak üzere sağlıklı dokunun korunması gibi MSS'de önemli roller oynar (Bugiani ve ark. 2022)'den uyarlanmıştır.

### 1.2.2. Astrosit Fonksiyonları

Astrositler GLAST ve GLT-1 taşıyıcıları yoluyla glutamat dahil olmak üzere birçok nörotransmiterin üretimi ve geri dönüşümünde rol oynar. Ayrıca, nöronlara sinyal göndermek ve nörotransmisyon ve plastisiteyi şekillendirmek için gliotransmitterleri serbest bırakırlar (Harada ve ark. 2015). Astrositler ayrıca kan dolaşımından glikoz alımı ve MSS'deki astrositlere özgü bir işlev olan glikojenin depolanması yoluyla bir enerji sağlayacı olarak hizmet eder. Astrosit kaynaklı glikojen laktat formunda salınır ve yüksek metabolik taleplerini desteklemek için aksonlara ve miyelin üretimi için substrat olarak kullanmak üzere oligodendrositlere iletilir (Weber ve ark. 2015). Ayrıca, çevresindeki hücreleri desteklemek için demir de dahil olmak üzere birçok büyüme ve trofik faktör sağlarlar.

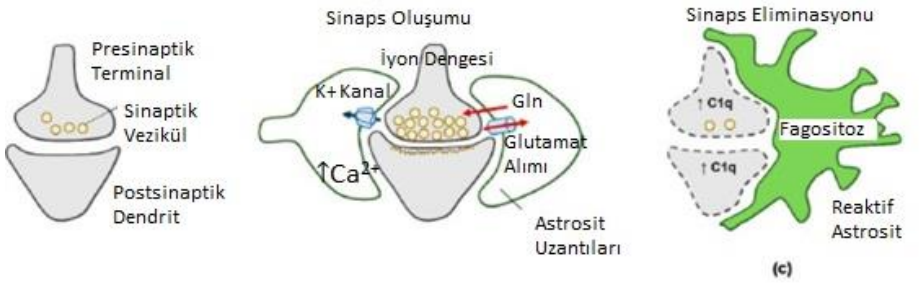
Hücre içi $Ca^{2+}$ akışı, hücre zarında bulunan voltaj kapılı $Ca^{2+}$ kanalları (VGCC) tarafından astrositlerde düzenlenebilir. VGCC, modülatör yardımcı alt birimlerle (farklı β- ve α2δ-alt birim izoformları) hetero-oligomerik kompleksler oluşturan a1 alt birimlerinden oluşur (Carmignoto ve ark. 1998). On a1 alt birim izoformu, farklı biyolojik özelliklere sahip ayrı genler tarafından kodlanır ve doku boyunca farklı ekspresyon sergiler. VGCC'ler iki gruba ayrılır: yüksek gerilimle çalışan $Ca^{2+}$ kanalları (L-, P/Q-, N- ve R-tipleri) ve düşük voltajla etkinleştirilen kanallar (T-tipi)'dır (Puro ve ark. 1996). VGCC'lerin α1 alt birimleri şu şekildedir: L tipi (Cav1.1–Cav1.4), P/Q tipi (Cav2.1), N tipi (Cav2.2), R tipi (Cav2.3) ve T tipi (Cav3.1–Cav3.3) $Ca^{2+}$ kanallarıdır (Striessnig ve ark. 2015). Astrositler, beyin boyunca küçük arteriyolleri ve kılcal damarları kaplayarak, astrosit uzantılarının uçları ile endotel hücrelerini çevreleyen bazal lamina arasında temaslar oluşturur. Yetişkin insan astrositlerinde CO aracılı $Ca^{2+}$ sinyali, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu ve salgılanmasını tetikler (Choi ve ark. 2017). $Ca^{2+}$ kaynağı L-tipi VGCC'ler; bu nedenle hücre dışı $Ca^{2+}$ astrositlere akabilir ve fosforilasyonu artırarak $Ca^{2+}$/kalmodulin-bağımlı protein kinaz β (CaMKKβ) aracılı AMP ile aktive olan protein kinaz-a'yı (AMPK-a) aktive edebilir. L tipi VGCC aracılı peroksizom-proliferatör-aktive-reseptör γ koaktivatör 1α (PGC-1α)/östrojenle ilişkili reseptör alfa (ERRa), insan astrositik mitokondri biyogenezini güçlü bir şekilde indükler. Birlikte ele alındığında, insan astrositlerindeki L tipi VGCC, anjiyogenez ve mitokondri biyogenezinde yer alabilir (Choi ve ark. 2016).

Astrositler sadece kan akışını düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda mitokondriyi nöronlara aktarır ve nöronal metabolizmayı besleyen nörotransmiterlerin yapı taşlarını sağlar (Hayakawa ve ark. 2016). Ek olarak, astrositler sinapsları fagosite edebilir, nörotrofin sekresyonunu değiştirebilir ve kalıntıları temizleyebilir (Tasdemir-Yilmaz ve ark. 2014). Astrositler ve nöronlar arasındaki karışma, gelişim sırasında başlıyor gibi görünüyor; gliogenez ve sinaptogenez beyinde aynı anda meydana gelir ve glial hücre olgunlaşması, sinaptojenik ve nöroplastik dönemlerin sonunu işaret eder (Muller ve ark. 1989). Astrosit-nöron metabolik işbirliğinin yanı sıra, astrositik uzantılar komşu astrositlerle çok az örtüşme gösterir (Heller ve ark. 2015).

Astrositler, MSS hasarına yanıt olarak reaktif hale gelir. Reaktif astrositler, heterojenite göstererek iki tipe (A1 ve A2 reaktif astrosit) ayrılmalarını sağlar ve gen ekspresyonunda, hücre hipertrofisinde ve glial skar oluşumunda geri dönüşümlü değişiklikler gösterir (Anderson ve

ark. 2014). Nükleer faktör kappa-β (NF-κB) yolağı, A1 astrositlerinin nörovasküler ünite üzerindeki zararlı etkileriyle yakından ilgilidir. Tersine, yara oluşturan A2 reaktif astrositler, hasarlı KBB'yi glial bir yara oluşturarak kapattıkları için faydalıdır. Nöroinflamatuar koşullar altında, A1 tipi astrositler, sinapslara zarar veren genlerin ekspresyonunda artış gösterirken, iskemik koşullarda A2 tipi astrositler, nöronal hayatta kalma ve büyüme için faydalı genlerin ekspresyonunu destekler (Liddelow ve ark. 2017). Aktive edilmiş mikroglia, IL-la, TNF-a ve C1q'yi indükleyerek A1 tipi astrositleri indükler ve AH ve diğer nörodejeneratif bozukluklarda A1 astrosit sayıları yükselir. Nöroinflamatuar hastalıklarda, A1 astrositleri, astrosit-nöron bağlantılarını geliştirme ve nörotoksisite kazanma yeteneklerini kaybeder. Astrositler, astrositler ve nöronlar, endotel hücreleri, perisitler ve mikroglial hücreler arasındaki parakrin sinyalini etkileyen glutamat, ATP ve D-serin gibi birçok nörotransmitteri yukarı doğru düzenler ve serbest bırakır. Hücresel karışma, fizyolojik koşullar altında nörovasküler ünitede önemli bir rol oynar ve nöronlar, astrositler, oligodendrositler, mikroglia, perisitler ve endotelyal hücreler arasındaki hücresel karışma, nörodejenerasyonu şiddetlendirir (Takano ve ark. 2009).

Nöron-glia etkileşimleri, uygun sinaptik plastisite ve nörotransmisyon salınımları yoluyla beyin homeostazını aktif olarak kontrol eder. "Üçlü sinaps" kavramı, presinaptik nöronları, postsinaptik nöronları ve astrositleri içeren bu hücresel ağı ifade eder (Eroglu ve ark. 2010). Astrositler, üçlü sinapsların oluşumuna katılarak sinaps oluşumunda önemli bir rol oynarlar. A2 tipi astrositler, trombospondinleri (TSP) yukarı doğru düzenler. TSP'ler, MSS dahil olmak üzere vücutta bulunan, salgılanan çok alanlı glikoproteinlerdir. TSP ile indüklenen sinaps oluşumu, üçlü sinapsta sinaptik öncesi ve sonrası özelleşmelerin doğru hizalanmasını gösterir. TSP'ler, sinaptik veziküllerin döngüsü gibi fonksiyonel presinaptik aktiviteyi ortaya çıkarır. TSP'lerin astrosit koşullu ortamdan çıkarılması, retinal ganglion hücre kültürlerinde sinaptojenik aktiviteyi azaltır. TSP1 ve TSP2, doğum sonrası erken evrelerde gelişen astrositler tarafından eksprese edilir ve yetişkinlerde ekspresyonları azalır. Ek olarak, hem TSP1 hem de TSP2'den yoksun fareler, kortekste daha az uyarıcı sinapsa sahiptir; bu, astrositlerden türetilen TSP'lerin uyarıcı (glutamaterjik) sinaps aktivitesini artırabileceğini gösterir (Christopherson ve ark. 2005; Kim ve ark. 2019). Astrositlerden türetilen TSP'ler, nöronlardaki VGCC'lerin α2δ-1 alt birimine bağlanarak sinaps oluşumuna yol açan hücresel olayları tetikler (Eroglu ve ark. 2009). Astrositler, sinaptik aktiviteyi artırabilir, bu da sinaptik güçte değişikliklere neden olur ve öğrenme ve hafızayı etkiler (Şekil 2-11).




**Şekil 2-11: Astrositlerden gelen sinyaller, sinaps oluşumunu ve ortadan kaldırılmasını teşvik eder.**

a) astrositsiz nöronlar daha az sinaptik nörotransmiter vezikül oluşturur; (b) astrositler, sinapsın hem pre- hem de postsinaptik elemanlarının olgunlaşmasını destekler; (c) reaktif astrositler, nöronlarda tamamlayıcı bileşen C1q'nun ekspresyonunu yukarı doğru düzenler ve astrosit aracılı fagositoz ile eliminasyona yol açar. (Kim ve ark. 2019)'den uyarlanmıştır.

Astrositlerin fagositik aktivitesi, kesin sinirsel bağlantı sağlamak için sinaps eliminasyonuna yol açar (Chung ve ark. 2013). Bir çalışmada astrositler, çoklu EGF benzeri alanlar 10 (MEGF10) ve mer proto-onkogen tirozin kinaz (MERTK) yolakları aracılığıyla canlı sinaps fagositozunu indüklediği saptanmıştır (Chung ve ark. 2013). Astrositlerin apoptotik hücreleri, hedefin plazma zarının dış yaprağındaki "beni ye" sinyallerini algılayarak tanıdığı belirlenmiştir (Jung ve ark. 2018). MEGF10 aracılı astrositik fagositoz, hücre içi protein yutma adaptörü fosfotirozin bağlama alanını içermiştir. MERTK, fagositoza yol açan fosfatidilserin ile etkileşime girer. Farelerde astrositik MEGF10 ve MERTK eksikliği, gelişmekte olan farelerde retinojenikulat bağlantıların normal olarak iyileştirilmesinde eksikliklere yol açar. Bu nedenle astrositler, MEGF10 ve MERTK fagositik yolaklarla nöronal kalıntıları ortadan kaldırmak için MSS sinapslarını yutar (Chung ve ark. 2013; Kim ve ark. 2019).

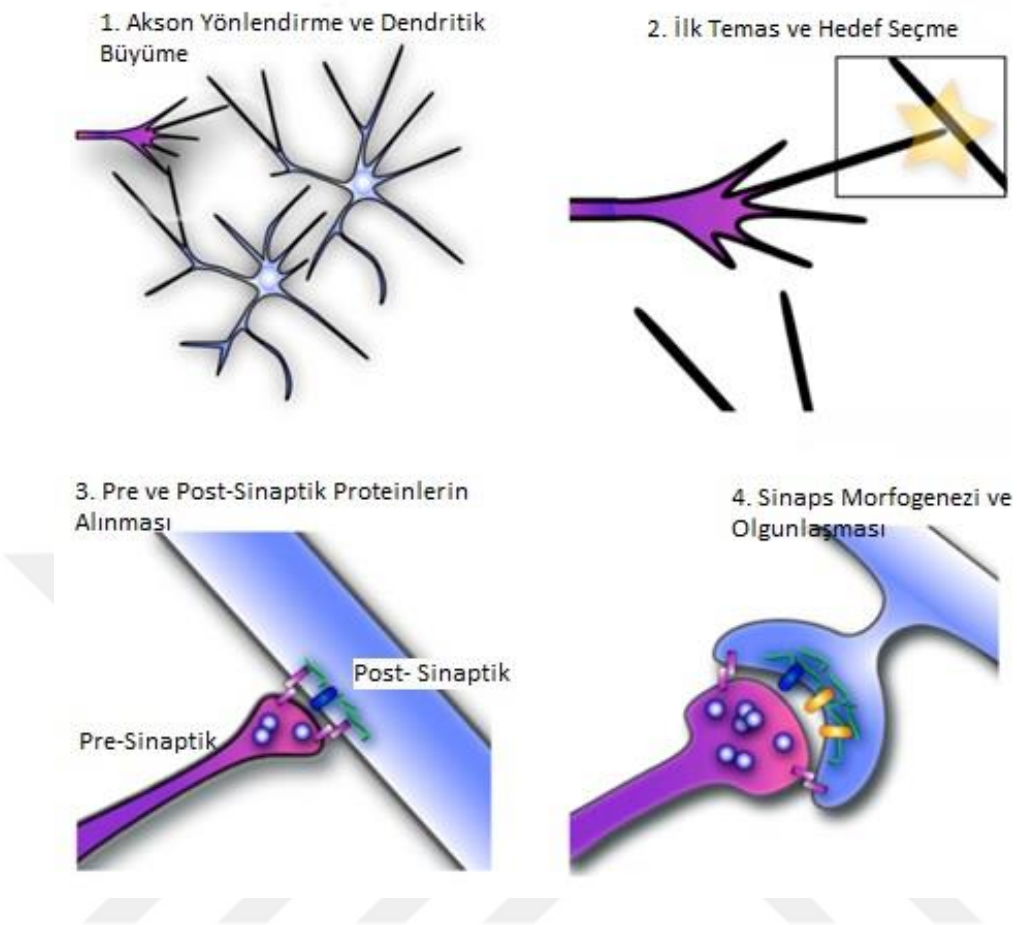
### 1.3. Sinaps Oluşumu

Gelişmede; sinapsların, genişleyen aksonların uçlarındaki hareketli büyüme konileri hedef hücrelerine ulaştığında ve kararlı sinaptik temaslara dönüştüğünde oluştuğu düşünülmektedir. Bu süreç, hücre şekli ve yapısında uzamsal ve zamansal olarak kontrol edilen değişiklikleri ve proteinlerin oluşturucu sinapsa alınmasını gerektirir (Brose 1999; Sanes ve ark. 1999). Akson terminali veya presinaptik taraf, nörondan nörona iletişimin kimyasal temeli olan nörotransmitterleri içeren sinaptik veziküllerle doludur. Bu veziküller, presinaptik zara kenetlenir, karmaşık bir protein sitomatriksi ile bağlanır ve salınacak uygun sinyal için

hazırlanır. Dendritte veya postsinaptik bölgede, nörotransmitter reseptörleri ve çok çeşitli transmembran, hücre iskeleti ve sinyal proteinleri kümelenir ve böylece presinaptik terminalden salınan nörotransmitere yanıt vermeye hazır hale gelir (Kornau ve ark. 1997). Proteinlerin sinapstaki bu asimetrik morfolojisi ve düzenlenmesi, onları diğer hücre-hücre bağlantılarından farklı kılar. Bununla birlikte, sinaptik bölgelerdeki adezyona ek olarak, presinaptik ve postsinaptik terminaller, sinapsın lateral bölgelerinde, morfolojik olarak epitel hücreleri arasında oluşan sıkı bağlantılara benzeyen bir bağlantı noktası ile bağlanır (Spacek 1985). Bu nedenle, bağlantı düzeneğinin bazı temel yönleri, sinapslar ve diğer bağlantı noktaları arasında paylaşılabilir, ancak sinapslara özgü fonksiyonel ve morfolojik özellikler, nörona özgü süreçler ve proteinler gerektirebilir.

**Sinaps Gelişimi**

Nöromüsküler kavşağın aksine, merkezi sinir sistemindeki (MSS) sinaptogenez mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır (Craig ve ark. 2001; Rao ve ark. 1998). Beyinde, her biri saldıkları nörotransmitter ile tanımlanan birçok sinaps türü vardır. İlk olarak, bir akson ile hedef postsinaptik hücre arasında bir ilk temas kurulur. Bu, aksonal büyüme konisi olarak tanımlanmıştır. Bu süreç, nöronal tiplerin muazzam heterojenliği ve gelişim zamanlarındaki farklılıklar nedeniyle karmaşıktır. Beyinde, her biri saldıkları nörotransmitter ile tanımlanan birçok sinaps türü vardır. Örnekler arasında glutamat, asetilkolin, γ-aminobutirik asit (GABA), glisin, dopamin ve serotonin bulunur. Nörotransmitterin postsinaptik nöron üzerindeki etkisi, nöronun gelişim evresi, postsinaptik membranda bulunan reseptörlerin tipi ve sayısı ve nöronal aktivite gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak duruma özgüdür (Wilson ve ark. 2004). Memeli beynindeki uyarıcı sinaptik iletime birincil olarak nörotransmitter glutamat aracılık eder. Sinaps oluşumunun temas başlatma, presinaptik ve postsinaptik proteinlerin toplanması ve stabilizasyon (Şekil 2-12) gibi birkaç karakteristik adımı içerdiği düşünülmektedir (Gerrow ve ark. 2006).




**Şekil 2-12: Merkezi sinir sisteminde glutamaterjik sinapsların gelişimi.**

(1) Aksonlar genellikle hedef alanlarına ulaşmadan önce uzun yolaklardan geçerler. Bu aşamada yer alan hücre adezyon moleküllerinden bazıları arasında ephrinler, L1, fasiklin ve integrinler bulunur. (2) Hem aksonlar hem de dendritler, filopodia adı verilen uzun çıkıntılar oluşturur. Kadherinler, protokadherinler, integrinler ve yardımcı gibi birkaç homofilik hücre adezyon molekülünün, hedef tanımanın düzenlenmesinde önemli roller oynadığı düşünülmektedir. (3) Uygun presinaptik ve postsinaptik hedefler arasındaki temas oluşumundan sonra, fonksiyonel sinapsların gelişimi için önemli olan proteinler alınır. Direkt olarak postsinaptik tarafta, nörotransmiter reseptörleri ve yapı iskelesi proteinleri kümelenmiştir. (4) Sinapslar olgunlaştıkça, presinaptik ve postsinaptik proteinlerin ek alımı, temasın daha fazla dengelenmesine yol açar. Diğer toplanan moleküller, sinaps morfolojisini modüle eder. Olgun glutamaterjik sinapsların çoğu, dikenler olarak bilinen mantar şeklindeki çıkıntılarda meydana gelir ve birçok hücre adezyon molekülünün, aktin hücre iskeletinin modülasyonu yoluyla bu süreçte rol oynadığı gösterilmiştir. Örnekler arasında kaderinler, integrinler, nöroligin/neurexin, L1, nektinler ve NCAM yer alır. (Gerrow ve ark. 2006)'den uyarlanmıştır.

## Presinaptik ve Postsinaptik Moleküllerin Alınması

Birkaç molekül, aktif bir sinapsın işlevi için önemli olan sinaps öncesi ve sonrası moleküllerin toplanmasına aracılık eden proteinler sinaps indükleyicileri olarak tanımlanmıştır. Bu rolü yerine getirmek için birkaç CAM gösterilmiştir. Özellikle, sinaptik adezyon molekülü (SynCAM) ve nöroliginler, şimdiye kadar aksonlar ve heterolog hücreler arasındaki temaslarda presinaptik farklılaşmayı teşvik etme yeteneğini gösteren ve temas bölgelerinde sinaptik

proteinlerin toplanmasını sağlayan tek CAM'lardır (Dean ve ark. 2003; Biederer ve ark. 2002). Bu, en azından bazı hücre adezyon moleküllerinin, sinaptik proteinlerin temas bölgelerine alınmasını sağlamak için yeterli olduğunu göstermektedir.

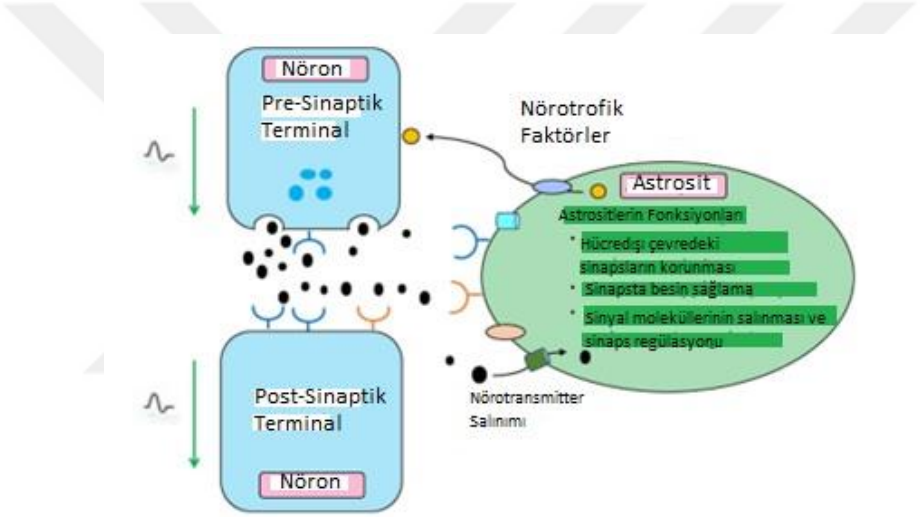
Nöroliginler ilk olarak bir presinaptik transmembran proteini olan β-neurexin'in üç izoformunu da bağlama yetenekleriyle tanımlanmıştır (Ichtchenko ve ark. 1995). Neuroligin ve β-neurexin arasındaki etkileşimin, presinaptik terminallerin boyutunu ve sayısını arttırdığı (Prange ve ark. 2004; Levinson ve ark. 2005) ve ayrıca bazı durumlarda postsinaptik protein PSD-95'in kümelenmesini güçlendirdiği gösterilmiştir (Scheiffele ve ark. 2000). Tersine, dendritlere heterolog hücreler yoluyla sunulan β-neurexin'in postsinaptik proteinleri topladığı gösterilmiştir (Graf ve ark. 2004).

Hem SynCAM hem de nöroliginler sinapsların güçlü indükleyicileri olsalar da, bu CAM'ler tarafından indüklenen sinapsların fonksiyonel olarak farklı olduğu görülmektedir (Gerrow ve ark. 2006). Bu CAM'lerin her ikisi tarafından heterolog hücreler üzerinde indüklenen yapay presinaptik terminallerin, birbirleriyle ve gerçek sinapslarla ölçülen tüm parametrelerde özdeş olduğu gösterilmiştir. Elektrofizyolojik ölçümlerle sadece SynCAM ekspresyonu sinaptik fonksiyonu arttırırken, morfolojik analiz aksini ortaya koymuştur ve sadece neuroliginin sinaps sayısını arttırdığı tespit edilmiştir (Sara ve ark. 2005). Buna karşılık, diğer çalışmalar, nöroligini aşırı eksprese eden nöronlarda artan sinaptik fonksiyonu göstermek için elektrofizyolojiyi kullanmıştır ve nörolginin yıkılması, sinaptik fonksiyon ve aktiviteyi azaltır (Chih ve ark. 2005). Bu gözlemlerin farklılıkları, incelenen nöronların gelişimsel ve hücre tipi farklılıkları ile açıklanabilir.

### 1.4. Sinaps Oluşumunda Rol Oynayan Astrosit Faktörleri

Gelişmekte olan beyinde, nöronal sinaps oluşumu ve olgunlaşması karmaşıktır ve birçok aşamada düzenlenir ve özellikle astrosit tutulumu önemlidir (Allen 2013). Nöral hücrelerin nöral progenitör hücrelerden farklılaşmasından sonra astrositler oluşur ve sinaps sayısı artar, bu da olgun, fonksiyonel sinapsların oluşumu ile sonuçlanır (Freeman 2010). Başka bir deyişle, astrositler sinaps oluşumunun erken aşamalarından itibaren aktif olarak yer alırlar ve dolaylı olarak nöronal plastisitede yer alırlar. Ayrıca, astrosit uzantıları olgun beyindeki presinaptik ve postsinaptik sonları sarar ve sinaptik yarıktan nörotransmitterlerin alınmasıyla nörotransmitter difüzyonunu sınırlar (Ullian ve ark. 2001). Ek olarak, kültüre edilmiş nöronlarda yapılan deneylerden, bir astrositin 300 ila 600 nöronun dendritleri ile temas

kurabileceği tahmin edilmiştir. Sinaps, presinaptik terminaller, postsinaptik yapılar ve astrositlerden oluşan üçlüdür. Üçlü sinaps bileşenleri, sinaps oluşumunu ve işlevini düzenlemek için bilgi alışverişinde bulunur (Halassa ve ark. 2007) (Şekil 2-13). Örneğin, üçlü sinapslarda astrositler, hücre dışı ortamın, besin kaynağının ve nörotransmisyonda yer alan gliotransmitterlerin korunmasını düzenler. Astrositler ayrıca sinaptik iletim ve plastisitede, dendrit omurga stabilizasyonunu ve sinaptik olgunlaşmayı düzenler. Ayrıca, astrositler birçok nörotransmitter reseptörünü ve iyon kanalını eksprese eder ve sinir hücrelerinden gelen uyarıya yanıt olarak nörotransmisyon ve sinaptik fonksiyonu düzenler. Örneğin, nörotransmitter norepinefrin, astrosit alfa-2 adrenerjik reseptörünü aktive eder ve γ-aminobütirik asit (GABA) salınımını uyarır (Gaidin ve ark. 2020).



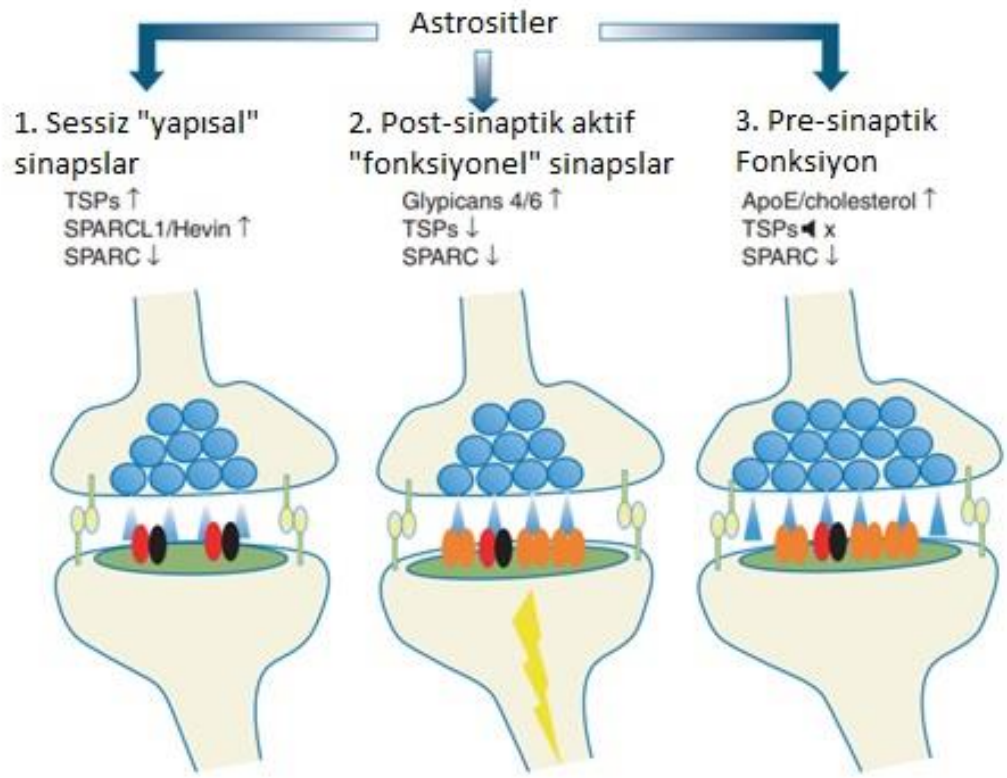

**Şekil 2-13: Üçlü sinapsta astrosit işlevleri.**

Nörotransmitter glutamat, presinaptik terminallerden salınır, postsinaptik reseptörlere bağlanır ve nörotransmisyonu indükler. Sinaptik yarıktaki glutamat aynı anda astrositler üzerindeki reseptörlere bağlanır ve glutamat taşıyıcı tarafından alınır (Yamagata 2021)'den uyarlanmıştır.

### 1.4.1. Astrositler Tarafından Üretilen Sinaps Oluşum Faktörlerinin Tipleri ve Özellikleri

Sinaps oluşumunun arkasındaki astrositik mekanizma, astrosit kaynaklı uyarıcı sinaps oluşumu ve sinaptik fonksiyonlar kültüre edilmiş retina ganglion hücreleri (RGC'ler) ile yapılan deneylerde gösterilmiştir (Ullian ve ark. 2001). Ayrıca deneyler; astrositlerin sinaptik plastisiteye aktif olarak katıldığını da göstermiştir. Ek olarak, astrositlerden türetilen transforme edici büyüme faktörü β'nın (TGF-β) serebral korteks nöronlarında sinaps oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca astrositler, farklı mekanizmalar yoluyla glutamaterjik ve

GABAerjik sinapsların oluşumunu teşvik eder ve arttırır (Hughes ve ark. 2010). Önceki çalışmalar, trombospondin, yüksek endotelyal venül proteini (hevin), asidik ve sistein açısından zengin salgılanan protein (SPARC), TGF-β1, glipikans 4 ve 6, semaphorin 3A, γ-protocadherin (γPcdh), ephrin A3, kolesterol ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) astrositlerden salgılandığını ve sinaps oluşumunu indüklediğini ve nihayetinde spesifik nöral devrelerin yapımında rol oynayabileceğini göstermiştir (Baldwin ve ark. 2017).




**Şekil 2-14: Astrosit tarafından salgılanan faktörler, uyarıcı sinaptik gelişimin farklı yönlerini kontrol eder.**

(1) Astrositler, yapısal sinapsların sayısını arttırır.bBu sinapslar normal morfolojiye sahiptir ve N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörleri (kırmızı ve siyah) içerir.bBununla birlikte, AMPA tipi glutamat reseptörlerinden (turuncu) yoksundurlar. (2) Astrositler, AMPA reseptör lokalizasyonunu postsinaptik yoğunluğa indükleyerek postsinaptik aktiviteyi arttırır. (3) Astrositler, salınım olasılıklarını artırarak presinaptik salınımı arttırır (Chung ve ark. 2015)'den uyarlanmıştır.

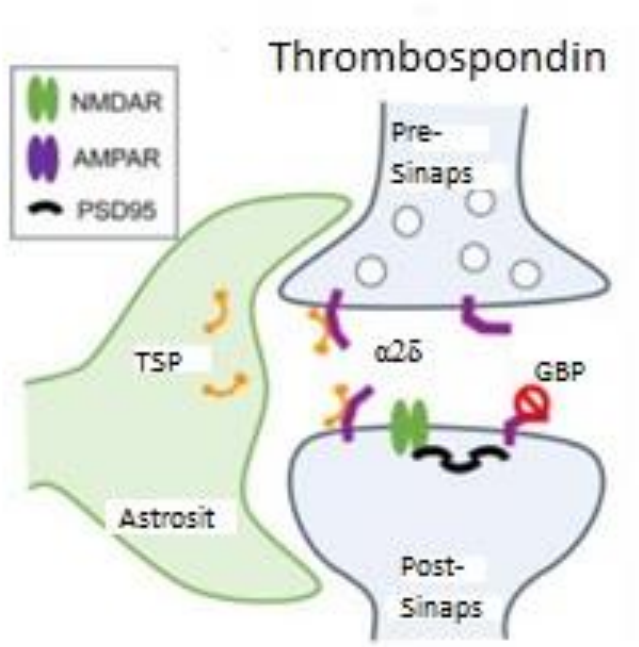
Ek olarak, TGF-β'nın, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II yoluyla kortikal nöronlarda inhibitör sinaps oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, astrositlerden salınan aktiviteye bağlı nörotrofik faktör (ADNF), sinir hücreleri üzerinde etki ederek nörotrofin 3 (NT-3) salgılanmasına neden olur. Hem ADNF hem de NT-3'ün, NMDA reseptör alt birimleri 2A

ve 2B'nin (NR2A ve NR2B) indüksiyonunu düzenlediği bulunmuştur (Blondel ve ark. 2000). Öte yandan, astrositlerin ve hipokampal nöronların ko-kültürü veya nöronların astrosit koşullu bir ortamla uyarılması, inhibitör presinaptik terminallerin sayısını arttırmıştır. Bu deneyde astrositlerin, inhibitör postsinaptik akımların sıklığını, GABA reseptör kümelerinin sayısını ve bunların sinaptik lokalizasyon derecelerini arttırdığı ortaya konmuştur (Elmariah ve ark. 2005). Bu sonuçlar, astrositler tarafından salınan faktörlerin inhibitör sinaps oluşumuna yol açabileceğini göstermektedir. Astrosit türevli endozepinin (benzodiazepinlerin bir beyin endojen taklidi) inhibitör retiküler talamik çekirdekten GABAerjik iletimi arttırmak için gerekli olduğu da gösterilmiştir (Christian ve ark. 2013).

### 1.4.2. Trombospondinler

Trombospondinler, ağırlıklı olarak kollajen gibi hücre dışı matriks bileşenleri arasındaki etkileşimlere aracılık eden bir glikoprotein ailesidir (Risher ve ark. 2018). Önceki çalışmalar, trombospondinlerin memeli embriyogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ek olarak, trombospondinlerin kemik, kas, kalp ve beyin gibi çeşitli organların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Tucker ve ark. 1995). Erken doğum sonrası gelişim sırasında astrositlerde trombospondinler gözlenmiştir. İn vitro çalışmalar, gelişen sinir sisteminde nöral sinaptik bağlantıların oluşumunda astrositlerden salgılanan trombospondinlerin önemine dikkat çekmiştir. Bir in vitro çalışmada, astrositlerde trombospondin ekspresyonu, 5 ila 10 aylık postnatal sinaps oluşum aşamasının başında zirveye ulaşmıştır ve ardından sonraki olgunlaşma sırasında azaldığı saptanmıştır (Christopherson ve ark. 2005). Kültüre edilmiş RGC'lerde saflaştırılmış trombospondin kullanan bir çalışma, trombospondinin normal bir sinapsa çok benzeyen bir üst yapıyı indüklediğini ve postsinaptik NMDA reseptör ekspresyonunu da indüklediğini ortaya koymuştur. Ancak bu deneyde trombospondinin, AMPA reseptör ekspresyonunu indüklemediği saptanmıştır (Christopherson ve ark. 2005). Yenidoğan uyarıcı sinapslarda, postsinaptik zara AMPA reseptör alımı, glutamaterjik iletimin işlev görmesini sağlayan sinaptik olgunlaşmada anahtar bir süreçtir (Hall ve ark. 2008). Bu nedenle, trombospondinin sinaptojenik etkisinin sinaptik olgunlaşmayı etkilemesi olası değildir. TSP-1'in, sinaptogenezin erken gelişim aşamasında kültüre edilmiş hipokampal nöronlarda uyarıcı sinapslar oluşturduğu gösterilmiştir (Hughes ve ark. 2010). Ayrıca, TSP, erken hipokampal nöron gelişiminde sinaps oluşumunu indükler, ancak nihai sinaptik yoğunluğu etkilemez (Xu ve ark. 2010). Öte yandan, TSP'nin, uyarıcı AMPAR birikimini azaltarak ve sinaptik inhibitör glisin reseptörü birikimini artırarak nöronlardaki uyarıcı sinyalleri azalttığı bildirilmiştir

(Hennekinne ve ark. 2013). Ayrıca, kültüre edilmiş sıçan hipokampal nöronlarında, TSP-1'in, nöroligin 1 yoluyla hipokampal nöron sinaps oluşumunu indüklediği bulunmuştur (Xu ve ark. 2010). Trombospondin ile indüklenen sinaps oluşumunun mekanizması üzerine önceki çalışmalar, sinaps oluşumunda yer alan TSP-1 için bir reseptör olarak α2δ-1'i (gabapentin reseptörü) tanımlamıştır (Şekil 2-15) (Baldwin ve ark. 2017).



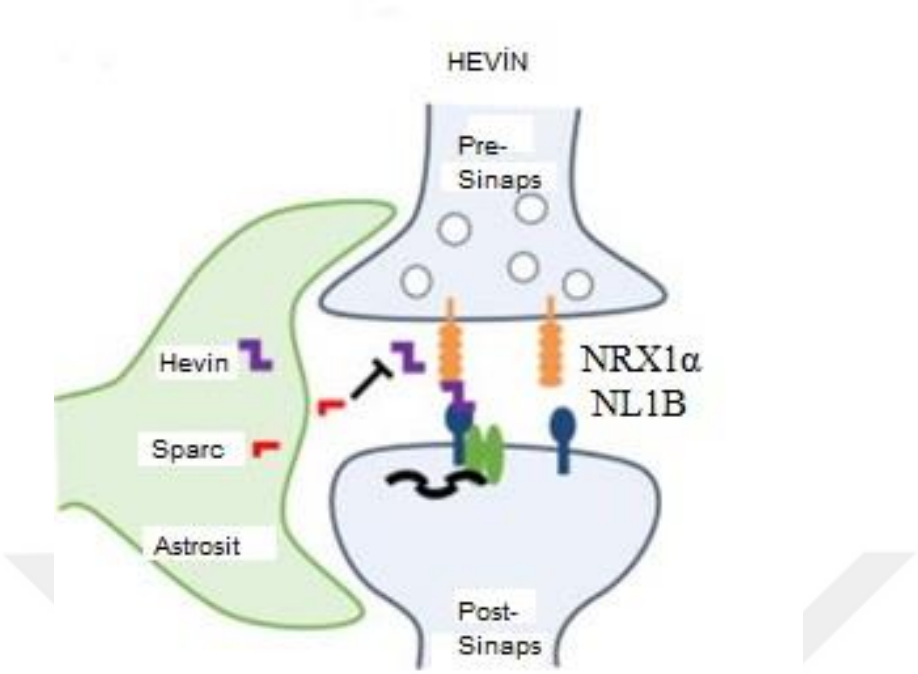

**Şekil 2-15: Astrositler, sessiz, yapısal sinapsların oluşumunu indüklemek için nöronal α2δ-1'e bağlanan trombospondinleri (TSP) salgılar.**

Anti-epileptik ilaç Gabapentin (GBP), α2δ-1'e bağlanarak TSP'nin neden olduğu sinaptogenezi önler (Baldwin ve ark. 2017)'den uyarlanmıştır.

TSP-1'in EGF benzeri bölgesinin sinapsları indüklemek için doğrudan α2δ-1'e bağlandığı ve α2δ-1'in sinaptik indüksiyon fonksiyonunun kalsiyum kanal fonksiyonu ile ilgili olmadığı gösterilmiştir (Risher ve ark. 2012). Benzer şekilde, omurga oluşumu için trombospondine ek olarak postsinaptik bölgede α2δ-1'in ekspresyonu gereklidir. Trombospondin kaynaklı sinaps oluşumunda, α2δ-1 ile etkileşim ras ile ilgili C3 botulinum toksin substratı-1 (Rac1), tarafından düzenlenir (Risher ve ark. 2018). Bu sonuçlar, trombospondin aracılı α2δ-1 yolağının sinaptogenezde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Risher ve ark. 2012).

### 1.4.3. Hevin

Hevin/SC1, SPARC ailesinin bir üyesidir ve SPARC benzeri protein 1 (SPARCL1) olarak da adlandırılır. Hevin, bir follistatin benzeri alan ve hücre dışı bir kalsiyum bağlayıcı alan içeren sistein açısından zengin bir glikoproteindir (Yan ve ark. 1999). Gelişmekte olan astrositlerde yüksek mRNA seviyeleri gözlenir ve yetişkinliğe ulaştıktan sonra bile yüksek seviyelerde mRNA ekspresyonu korunur (Eroglu ve ark. 2009). Önceki çalışmalar, astrosit tarafından salgılanan hevin'in, kültüre edilmiş RGC'lerde postsinaptik sessiz uyarıcı sinaps sayısını önemli ölçüde arttırdığını ve normal sinapslara çok benzeyen yapıları indüklediğini göstermiştir (Kucukdereli ve ark. 2011). Hevin ayrıca kültüre edilmiş sıçan RGC'lerinde sinaps oluşumunu indükler. Buna karşılık, aynı ailenin bir üyesi olan SPARC'ın sinaps oluşumunu indüklediği değil, hevin'in sinaptojenik etkisi üzerinde antagonize edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Kucukdereli ve ark. 2011). Sinir yaralanmasından sonra SPARC ve hevin ekspresyonunun değişmesi (Mendis ve ark. 2000), özellikle iskemik lezyonların kenarlarındaki astrositlerde artan hevin ekspresyonunu içerdiği gözlenmiştir (Lively ve ark. 2011). Bu sinir yaralanmalarında, antagonistik bir denge korunurken hevin ve SPARC ekspresyon seviyeleri değişir, bu da bu hastalıklarla ilişkili sinaptik disfonksiyona neden olabilir (Kucukdereli ve ark. 2011). Hevin'in ayrıca glutamaterjik sinapsları indüklemek için presinaptik neurexin (NRX)-1α ve postsinaptik nöroligin (NL)-1B'yi bağladığı gösterilmiştir (Singh ve ark. 2016). NRX ve NL'nin her ikisi de sinaptik hücre yapışma molekülleri olarak bilinir (Şekil 2-16). NRX esas olarak presinaptik zarda lokalize olurken, NL postsinaptik bölgede bulunur ve sinaps oluşumunu düzenler (Bang ve ark. 2013). NRX-1, proteaz bir disintegrin ve metalloproteinaz alanı içeren protein 10 (ADAM10) aracılığıyla uyarıcı sinapsta nanokümeler oluşturur (Trotter ve ark. 2019). Presinaptik bölgede NRX, NL, serebellin/GluD kompleksi ve latrofilin gibi çoklu ligandlarla farklı bağlar oluşturur. Bu farklı bağlantılar sinaps oluşumunu düzenler ve sinir devrelerinde yerleşik bir girdi ve çıktı modelini indükler (Sudhof 2017; Yamagata 2021).




**Şekil 2-16: Astrosit salgılayan SPARC, bilinmeyen bir mekanizma yoluyla Hevin kaynaklı sinaps oluşumunu antagonize eder.**

Astrosit tarafından salgılanan Hevin/SPARCL1, normalde etkileşime girmeyen iki protein olan presinaptik NRX1α ve postsinaptik NL1B ile etkileşimleri yoluyla sinaps oluşumunu destekler (Baldwin ve ark. 2017)'den uyarlanmıştır.

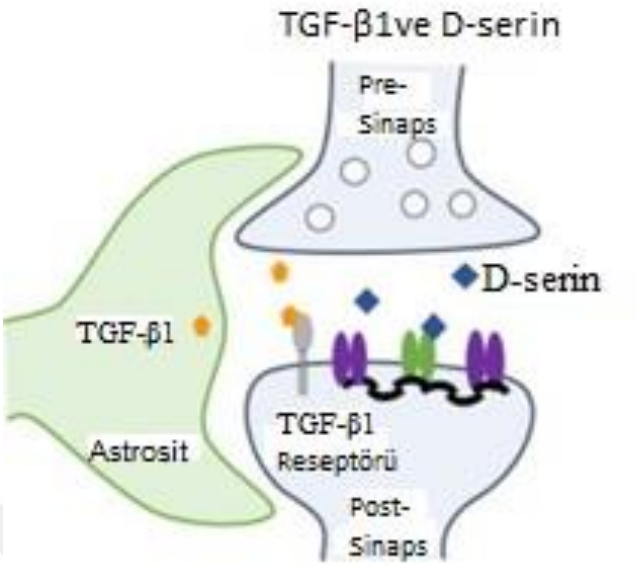
### 1.4.4. Glipikan

Glipikanlar, altısı memelilerde tanımlanmış olan bir heparan sülfat proteoglikan ailesidir (De Cat ve ark. 2001). Glipikan 4 ve glipikan 6'nın sinaps oluşumu üzerindeki etkileri üzerine kültüre edilmiş RGC'lerde yapılan deneylerde, her iki glipikan da glutamaterjik postsinaptik potansiyellerin frekansını ve genliğini arttırdığı, AMPA reseptörlerinin yüzey seviyelerini arttırdığı ve fonksiyonel sinapsları uyardığı saptanmıştır. Glypican 4'ün, presinaptik terminallerde bir AMPA reseptör kümeleme faktörü olan pentraksin salınımını indükleyerek ve postsinaptik terminallerde AMPA reseptörlerini biriktirerek sinaptik işlevi indüklediği gösterilmiştir (Farhy-Tselnicker ve ark. 2017). Benzer şekilde, glipikan 4'ün susturulduğu farelerle yapılan deneyler, hipokampal uyarıcı postsinaptik akımların sayısında ve genliğinde azalma ve AMPAR alımında azalma gösterdiği saptanmıştır ve böylece glipikan 4'ün fonksiyonel bir sinaps indüklediği tespit edilmiştir (Allen ve ark. 2012). Ayrıca, glipikan 4'ün, heparan sülfata bağlı bir şekilde presinaptik protein tirozin fosfataz σ'ya (PTPσ)

bağlanarak uyarıcı sinaps gelişimini ve işlevini indüklediği gösterilmiştir (Ko ve ark. 2015). PTPσ, glipikan-4 için presinaptik bir reseptör görevi görür ve uyarıcı sinaptik iletim için gereklidir. Ayrıca, glipikan-4'ün PTPσ'ya bağlanması, pentraksin 1 salınımını indükler ve postsinaptik terminalde AMPA reseptörlerini biriktirir (Farhy-Tselnicker ve ark. 2017). Benzer şekilde, pentraksin 3'ün, β1-integrin ve hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi yoluyla presinaptik AMPA reseptör kümelenmesini indükleyerek sinaptik işlevi desteklediği gösterilmiştir (Fossati ve ark. 2019). Ayrıca çalışmalar, glipikan mutasyonların otizm spektrum bozuklukları (Doan ve ark. 2016), dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu (Lesch ve ark., 2008) ve şizofreni ile ilişkili olduğunu ve bu hastalıklarla ilişkili sinaptik işlev bozukluğunda rol oynadığını göstermiştir (Yamagata 2021).

### 1.4.5. TGF-β

Hücre dışı matriks proteinlerine ek olarak, astrositlerden salınan ekstrinsik sitokin TGF-β, glutamaterjik ve GABAerjik sinaptogenezi artırır (Bae ve ark. 2011). Astrositik TGF-β1, D-serin salınımını indüklemek için sinaptik veya astrositik TGF-β reseptörlerine bağlanır ve daha sonra glutamatlarla birlikte, sinaptik sonrası N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörüne bağlı sinaps oluşumunu ve olgunlaşmasını başlatır. İlginç bir şekilde, TGF-β1 ile indüklenen inhibitör sinaps oluşumu aynı zamanda post-sinaptik CaMKII'nin aktivasyonunu gerektirir, yani glutamat ve D-serin, sinaptik sonrası NMDAR'a bağlanır ve GABAerjik sinapslarda nöroligin-2 kümelenmesini başlatır (Diniz ve ark. 2012). In vivo veriler, TGF-21'in ultrastrüktürel normal ve fonksiyonel sinapsların oluşumunu desteklediğini göstermiştir. Tersine, D-serin sinyalleşmesinin genetik veya farmakolojik inhibisyonu, TGF-21'in sinaptojenik etkilerini önler, ayrıca D serin'in TGF-21 kaynaklı sinaptogeneze aracılık ettiğini doğrular. TGF-β, hücre dışı proteolitik aktivasyon gerektiren bir öncü protein olarak salgılandığından, gelecekteki çalışmalarda TGF-β1 aktivatörünün aydınlatılması önemlidir (Şekil 2-17) (Shan ve ark. 2021).




**Şekil 2-17: Astrosit tarafından salgılanan TGF-β1, NMDA reseptörü agonisti D-serin ile birlikte NMDA reseptörü aktivitesi gerektiren mekanizmalar yoluyla uyarıcı sinapsların oluşumunu teşvik eder.**

(Baldwin ve ark. 2017)'den uyarlanmıştır.

### 1.4.6. BDNF

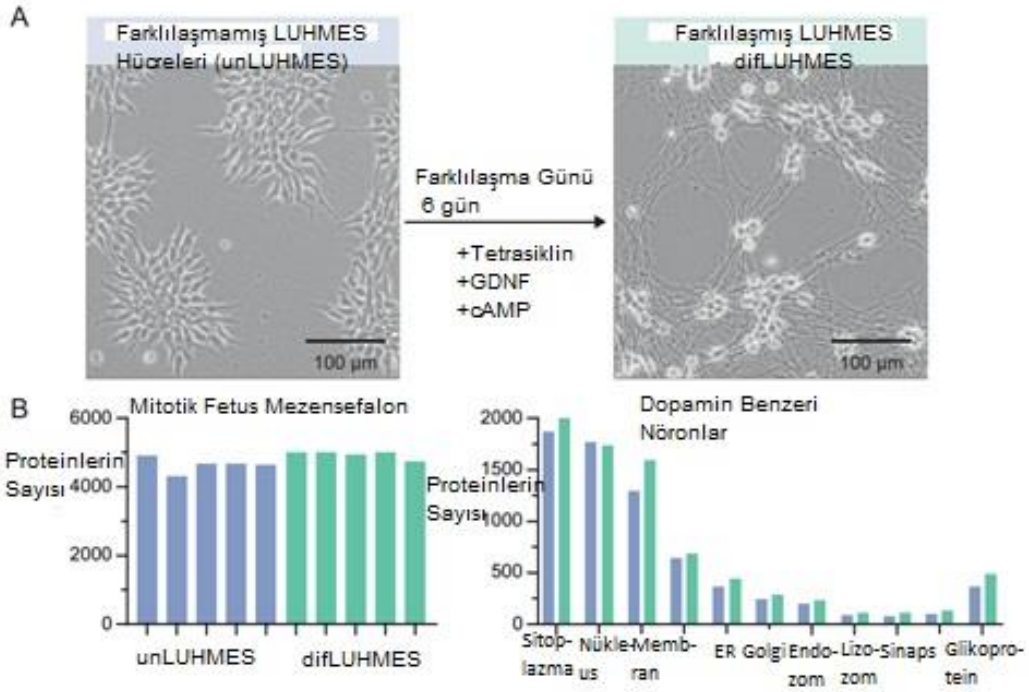
Vestibüler sistemden yapılan bir in vivo çalışma, BDNF'nin nöronal tirozin reseptör kinaz B (TrkB) ile çalıştığını ve GABAerjik aksonların büyümesini ve dallanmasını düzenlediğini bildirmiştir (Gomez-Casati ve ark. 2010). BDNF, GFAP ekspresyonu da dahil olmak üzere birçok glia özelliğine sahip destekleyici hücrelerden salınır. GFAP-DN-erbB4 farelerinin (glial fibriler asidik promotör altında baskın-negatif bir erbB4 reseptörünün ekspresyonu), sinaps oluşumu ve bakımında ciddi bir eksiklik gösterdiği keşfedilmiştir. Bu fenotip, erbB4 eksikliğinin neden olduğu BDNF sekresyonundaki azalmaya bağlıdır, çünkü (1) glia-erbB, BDNF üretimi için kritiktir, (2) GFAP-DN-erbB4, BDNF mRNA seviyesinde önemli bir azalma ifade eder. Birlikte ele alındığında glia, BDNF-TrkB ve nörogulin-1 (NRG1)-erbB yolakları dahil olmak üzere nöronlar ve glia arasındaki karşılıklı sinyaller yoluyla sinaps oluşumunu indükler. GABAerjik sinaptogenezin yanı sıra glia, glisinerjik sinaptogenezi de destekler. Yapılan çalışmalar, saflaştırılmış TSP-1'in kültüre eklenmesinin, inhibe edici glisin reseptörleri (GlyR'ler) ile sinapsların sayısını arttırdığını göstermektedir; β1-integrinleri bloke etmek, TSP-1'in etkilerini ortadan kaldırabilir. Bu bulgu, glia kaynaklı glisinerjik sinaptogenez mekanizmasını açıklamak için potansiyel bir yol sağlar. Özetle, astrositik TSP-1/2 ve α2δ-1, nöronal reseptörlerine bağlanır ve sinaptogenezi başlatırken, NRX1α-hevin-NL1 kompleksi,

sinaptik öncesi ve sinaptik sonrası hücre adezyon proteinlerini köprüler (Hennekinne ve ark. 2013).

### 1.5. LUHMES

AH ve PH, en yaygın nörodejeneratif hastalıklar arasındadır ve bugüne kadar tedavisi mümkün olmamıştır (Trompetero ve ark. 2018). Altta yatan hastalık mekanizmalarını ve risk genlerini incelemek, ilaçları taramak ve geliştirmek, uygun hücre modellerini gerektirir. Popüler bir hücre modeli, insan kaynaklı olmanın ve nöronal özelliklere sahip olmanın avantajlarını birleştiren Lund insan mezensefalik (LUHMES) hücre dizisidir. LUHMES hücreleri, 8 haftalık insan dişi mezensefalonundan elde edilir. Farklılaşmamış, tümör benzeri bir durumda hızla çoğalırlar ve böylece ilaç tarama çalışmaları için daha büyük hücre sayıları kolayca elde edilebilir. Dahası, Parkinson hastalığında etkilenen primer nöron tipi olan post-mitotik dopaminerjik benzeri nöronlara farklılaşabilirler (Scholz ve ark. 2011). Bu nedenle, LUHMES hücrelerinin farklılaşması, nörodejeneratif hastalıkları, özellikle PH'yi araştırmak ve aynı zamanda nörotoksisiteyi incelemek ve önlemek için yaygın olarak kullanılır (Zhang, Yin, ve ark. 2014; Harris ve ark. 2017). Nöronal farklılaşma genellikle gen ifadesindeki ve proteom içindeki önemli değişikliklerle yansıtılır (Pierce ve ark. 2018). Aslında, LUHMES hücrelerinin başarılı nöronal farklılaşması $\beta$3-tubulin ve TH gibi yalnızca birkaç seçilmiş hücresel belirtecin artan protein ekspresyonu tespit edildiğinde varsayılır (Scholz ve ark. 2011).

Yapılan bir çalışmada kütle spektrometrisi kullanılarak ve farklılaşmamış LUHMES (unLUHMES) ve farklılaşmış LUHMES (difLUHMES) hücrelerinin proteomu karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda nöronal farklılaşmanın, LUHMES hücre proteomu içinde, nörodejenerasyonla ilgili proteinlerin ekspresyon seviyelerinin değiştirilmesi de dahil olmak üzere önemli değişikliklere neden olduğu saptanmıştır. unLUHMES ve difLUHMES hücrelerinin proteomlarını karşılaştırmak için, unLUHMES hücreleri tetrasiklin, GDNF ve cAMP kullanılarak 6 gün boyunca farklılaştırılmıştır (Scholz ve ark. 2011; Pierce ve ark. 2018). Farklılaşmanın son gününde, difLUHMES hücreleri, önceki deneylerle uyumlu olarak, aksonlar ve dendritler gibi nöronların karakteristik morfolojik özelliklerini sergilediği saptanmıştır. unLUHMES ve difLUHMES hücrelerinin 5 biyolojik kopyasından en az 4'ünde 4499 ve 4931 protein tanımlanmış; bu veriler, tüm hücresel organellerin proteinlerini içermektedir (Şekil 2-18) (Tushaus ve ark. 2021).




## Şekil 2-18: LUHMES hücre farklılaşmasının proteomik karakterizasyonu.

A) Farklılaşmamış LUHMES hücrelerinin (unLUHMES) ve farklılaşmış LUHMES hücrelerinin (difLUHMES) tetrasiklin, GDNF ve cAMP içeren farklılaşma ortamlarında 6 gün kültüre edildikten sonraki mikroskopi görüntüsü. B) Her biyolojik kopyada ölçülen protein sayısı. Bir gruptaki beş biyolojik kopyadan en az dördünde tespit edilen proteinler dikkate alınmıştır (Tushaus ve ark. 2021)'den uyarlanmıştır.

# 3. YÖNTEM

Konu kapsam kısmında verilen bilgilerden yola çıkarak; hipotezimizi araştırmak üzere sunulan doktora tezi kapsamında, insan prekürsör nöral hücreler olan Lund human mesencephalic (LUHMES) hücreleri ile insan primer astrosit hücrelerini içeren bir ko-kültür sistemi oluşturulmuştur. Bu sistemde *SNCA* sadece astrositlerde aşırı eksprese edilmiş ve daha sonra *SNCA*'yı aşırı eksprese eden bu astrositler nöronlar ile biraraya getirilmiş olup astrositlerde artan α-sinükleinin nöronlara doğru hareket edip etmediği araştırılmış ve nöron-astrosit bağlantılarının sayısındaki değişimler western blot (WB) ve canlı görüntüleme sistemi ile saptanmıştır. Yapılan *SNCA* plazmid transfeksiyonunun muhtemel toksik etkisi ise sitotoksisite testi ile saptanmıştır. Bahsi geçen bütün yöntemler İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarları'nda (BNHAL) gerçekleştirilmiştir.

### 1.6. Astrosit Kültürü Deneyleri

Tez çalışmasında kullanılan primer insan astrositlerinin (N1808039-Gibco Invitrogen Inc., New York, USA) (ATCC® CRL-2266) kültür deneyleri; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda Büşra Şengül'ün yüksek lisans deneylerinde optimize edilen protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Primer insan astrositlerinin ekimi yapılmadan bir gün önce deney petrileri; stok poly-L-ornithin (PLO) (Sigma P-4957. Sigma- Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) solüsyonundan 1 ml alındı ve üzerine 49 ml (Sartorius 16534. Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, GE) MiliQ $dH_2O$ eklendi ve 0.20 μm filtreden geçirilerek hazırlandı. Ertesi gün PLO ile kaplı deney petrileri 3 kere MiliQ $dH_2O$ ile yıkandı. Her bir petriye kültür medyumu eklenerek 37$^oC$, %5 CO2 içeren etüvde bırakıldı (Sengul ve ark. 2020).

### 1.6.1. Astrosit Kültür Medyumunun Hazırlanması

80 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Medyumu (Gibco 10569-010 Invitrogen Inc., New York, USA) içine eklenen maddeler aşağıdaki tabloda görülmektedir (Tablo 3-1).

**Tablo 3-1: DMEM+ medyumu içerisine eklenen maddeler.**

| BİLEŞENLER | MİKTAR |
|---|---|
| **DMEM Medyumu** (Gibco 10569-010 Invitrogen Inc., New York, USA) | 80 ml |
| **N-2 supplement** (Gibco 17502- 048 Invitrogen Inc., New York, USA) | %1 |
| **One Shot Fetal Bovine Serum (FBS)** ( Gibco 16000-077 Invitrogen Inc., New York, USA) | %10 |
| **Epidermal Growth Factor (EGF)** (Gibco PHG0313 Invitrogen Inc., New York, USA) | 15 ng/ml |

- Hazırlanan DMEM+ medyumu 0,20 μ'luk filtreden geçirildi ve kullanılana kadar +4ºC'de saklandı.

### 1.6.2. Primer Astrosit Kültürü'nün Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması

- -196ºC'den çıkartılan hücreler 37°C'de çözündürüldü ve hücreler santrifüj tüplerine alınarak 290xg'de 5 dk. santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası hücre çökeltisi üzerindeki üst sıvı dikkatlice atıldı ve çökelti üzerine ısıtılmış 2–3 ml astrosit kültür medyumu eklendi ve pipet ile 2-3 kez karıştırıldı.
- Hücre sayısı hemasitometri ile hesaplandı. Pelette bulunan hücrelerden $cm^2$ başına $4x10^4$ olacak şekilde hücre alınarak T-25'lik flasklara toplam hacim 5 mL olacak şekilde ekildi ve %5 CO2 içeren etüvde ve 37°C'de inkübe edildi.

- Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra 2-3 günde bir medyumu değiştirildi ve hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında astrosit hücrelerinin pasajı yapıldı.
- %0,25'lik (v/v) tripsin-EDTA'dan (Gibco, 25200-056) petriye %0,05 konarak hücrelerin petri tabanıyla bağlantılarının ayrılması için 5 dk. inkübe edildi.
- Tripsin aktivitesini nötralize etmek için bazal medyum eklendi. Hücreleri içeren tüm sıvı toplanarak 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 290xg'de 5 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatan atıldı ve pellet üzerine önceden ısıtılmış astrosit medyumu eklendi.
- Hemasitometre ve tripan mavisi kullanarak hücre sayısı ve canlılığı belirlendi ve 6 kuyulu kültür tabağına $cm^2$ başına $4x10^4$ olacak şekilde hücre alınarak toplam hacim 1,5 mL olacak şekilde ekildi ve %5 $CO_2$ içeren etüvde 37°C'de inkübe edildi.

*Ekim yapılacak 35 mm'lik 6 kuyulu kültür tabağına =Toplam hücre sayısı/$cm^2$x$4x10^4$

### 1.6.3. İnsan Astrosit Hücrelerinin Çift İmmünfloresan İşaretleme Yöntemiyle Karakterlerinin Gösterilmesi

PFA ile fikse edildikten sonra 3 kere 10 dakika PBS ile yıkanıp +4°C'ye kaldırılan petriler immünfloresan işaretleme için kullanıldı. Astrositler, uygulamalara başlanmadan önce Aldehid dehidrojenaz ailesin üyesi L1 (Aldh1L1) ve glial fibriler asidik (GFAP) antikorları ile astrosit karakterlerinin korunduğunu belirlemek üzere immünfloresan işaretleme yapıldı.

**İmmünfloresan İşaretleme Protokolü**

**1.Gün**

1. Hücreler triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren %0,02 T-PBS içerisinde hazırlanan %30'luk normal keçi serumu içeren (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) bloklama solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. Hücreler 1:25 oranında sulandırılan Aldh1L1 (Millipore MABN495. Millipore Corp. California, USA) ve 1:4

3. 00 oranında sulandırılan GFAP (Millipore AB5804. Millipore Corp. California, USA) primer antikorları ile işaretlendi.
4. Primer antikorlar; %1,5 keçi serumu ve primer antikor içeren %0,02 TPBS içinde hazırlandı ve gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

**2.Gün**

5. Hücreler 3 kez 10 dakika 2 ml PBS ile yıkandı.
6. Bu aşamadan itibaren tüm işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi. Hücreler, %0,02 T-PBS içerisinde %1,5 keçi serumu içerisinde anti tavşan IgG TR (Texas Red) (Alexa Fluor® 568, Abcamab175471) ve anti fare IgG FITC (Fluorescein isothiocyanate Millipore AP181F. Millipore Corp. California, USA) içeren sekonder solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. Sekonder solüsyonu sonrasında hücreler 3 kez 10 dakika PBS ile yıkandı ve 2. yıkamadan önce $dH_2O$ ile 1:15.000 oranında sulandırılmış DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol dihidroklorür) solüsyonu içinde 15 saniye bekletilip hemen çekildi.
8. Kapama medyumu (ThermoFisher, P36970) ile kapatıldı ve görüntüleme sistemi için BioTek Lionheart FX kullanıldı.

## 1.7. *SNCA* Geni Plazmidinin ve Boş Plazmidin (Mock Plazmid) Çoğaltılması

### 1.7.1. Bakteriyel Transformasyon Protokolü

Transfeksiyon ve transformasyonda kullanılan *SNCA* plazmidinin (NM_000345) Human Tagged ORF Clone (RG-210606) haritası Şekil 3-1'de verilmiştir.

1. -80$^{o}$C'de bulunan Alpha Gold Competent Cell (OrıGene CC100001) çıkartıldıktan sonra buzun üzerine alındı ve yavaşça alt üst edilerek tüpün içindeki hücreler karıştırıldı.

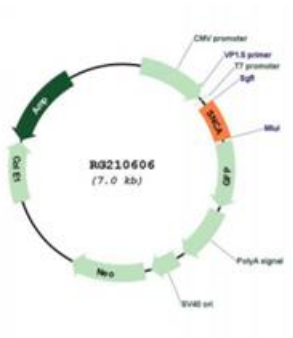
2. Competent Cell'e *SNCA* plazmidi eklendi ve 30 dakika buzun üzerinde inkübe edildikten sonra 30-45 saniye 42 $^{o}$C'de su banyosunda bekletildi ve yeniden buz üzerinde bekletildi.
3. Transformasyon reaksiyonu 1 ml olacak şekilde süper optimal medyumu (SOC, Invıtrogen 15544-034) ile sulandırıldı.
4. Tüpler 37$^{o}$C'de 60 dakika 200 RPM'de çalkalandı ve tüplerden 200 µl alınarak Luria-Bertani-Agar (%1.5 (w/v)-LB-agar) petrilerine ekim yapıldı ve gece boyu 37$^{o}$C'de çalkalayıcıda inkübe edildi.
5. Petriler çalkalayıcı inkübatörden çıkarıldı ve oluşmuş konilerden pipet ucu vasıtasıyla birkaç tanesi toplandı.
6. İçerisinde kanamycin (25µg/ml) bulunan Luria-Bertani (LB)'nin içerisine bu pipet ucu bırakıldı ve ağzı folyo ile yarım kapatılıp bantlandı. 6-7 saat 200 RPM 37 $^{o}$C'de çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrasıda LB'nin içerisindeki kolonilerde üreme meydana geldi.
8. Tüp içerisinde koloni hücrelerini içeren LB daha önce ısıtılan ve içerisinde kanamycin bulunan 50 ml LB içeren bir erlenmayerin içerisine döküldü ve gece boyu 200 RPM 37$^{o}$C'de çaklalayıcı inkübatörde inkübe edildi.
9. Erlenmayerin içinde de üremenin olduğu bulanıklıktan ve kokudan teyit edildi ve plazmidler izole edilmeye başlandı.

### 1.7.2. Plazmid İzolasyon Protokolü

PureLink® Quick Plasmid Kiti (K2100-10 Invitrogen Inc., New York, USA) kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Erlenmayerde bulunan plazmidler 15ml'lik tüplere 5 ml olacak şekilde alındı ve tüpler 15 dk. 3900xg'de santrifüj edildi. Hücreler çöktürüldü ve çökelti üzerine 250 µl R3 solüsyonu eklenerek homojen hale getirildi.
2. Tüplere L7 solüsyonu eklendi ve tüpler alt üst edilerek homojen hale getirildi ve oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi.
3. Tüplere N4 solüsyonundan 350 µl eklendi ve hızlıca çalkalanarak 14.000xg'de 10 dk. santrifüj edildi.

4. Üst sıvı toplanıp toplama tüpü içerisindeki spin kolona konuldu ve 1 dk. 12.000xg'de santrifüjlendi.
5. Her bir tüpe W9 solüsyonundan 700 µl konuldu ve 1 dk. 12.000xg'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve spin kolon yeni bir tüpe aktarılıldı.
6. Tüpler boş olarak 1 dk. 12.000xg'de santrifüj edildi ve üst sıvı atılarak 65°C'de ısıtılan TE solüsyonundan konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
7. 2 dk. 12.000xg'de santrifüj edildi ve spin kolon atılarak plazmid DNA'sı elde edildi.




ACCN: NM_000345
ORF Size: 420 bp

**Şekil 3-1: Transfeksiyon ve transformasyonda kullanılan *SNCA* plazmidinin haritası.**

## 1.8. İnsan Astrosit Kültüründe Gerçekleştirilen Uygulamalar

İnsan *SNCA* genini taşıyan plazmid, lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı kullanılarak aşağıda verilen protokole göre hücrelere aktarıldı. Astrosit hücrelerine geçici (transient) transfeksiyon yapıldı ve transfeksiyonu takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde transfeksiyon başarısı kontrol edildi ve transfeksiyon verimliliğinin yüksek olduğu zaman aralığı 72 saat olarak belirlendi. Daha sonra insan asrosit hücreleri ile LUHMES hücrelerinin ko-kültürü gerçekleştirildi.

**İnsan astrosit kültürü grupları:**

**1. Grup: Kontrol grubu**: Plazmid transfeksiyonu yapılmayan grup.

**2. Grup: Sadece Myc-GFP-tag içeren boş plasmid (mock plazmid) uygulanan grup:** ORF içermeyen sadece ilgili promoter ve kuyruğu (Myc-GFP) içeren plazmid.

**3. Grup: İnsan SCNA (pCMV6-AC-GFP) plazmid uygulanan grup:** Astrosit hücrelerine plazmid uygulandıktan sonra mikroskop ile GFP ekspresyonun varlığı saptanan grup.

### 1.8.1. Hücre Kültüründe Plazmid ile Transfeksiyon Aşamaları

1. Astrosit kültüründe hücre yoğunluğunun %60-70'e gelmesi beklendi.
2. TurboFectin 8.0/DNA (ORIGENE TF81001) kompleksinin hazırlanması
    a) 1 µg DNA 250µl DMEM içerisinde çözündürüldü ve yavaşça vortekslendi.
    b) Dilüe edilmiş DNA'ya 3 µl TurboFectin 8.0'i eklendi ve yavaşça pipetleyerek karıştırıldı.
    c) Oluşturulan karışım 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

3. Hazırlanan TurboFectin 8.0/DNA karşımı her bir plaka kuyusuna damla damla eklendi. Plaka yavaşça sağa sola ve ileri geri hareket ettirilerek karıştırıldı ve 37$^{o}$C'de gece boyu inkübe edildi.

4. Daha sonra her bir kuyudaki transfeksiyon medyumu, büyüme faktörü ve serum içermeyen medyum ile değiştirilerek 48 saat daha inkübe edildi ve toplam inkübasyon süresi 72 saat olarak uygulandı.

## 1.9. Lund İnsan Mezensefalik (LUHMES) Kültürü Deneyleri

### 1.9.1. LUHMES Hücre Kültürü

Luhmes hücrelerinin ekimi yapılmadan bir gün önce deney petrileri; stok poly-L-ornithin (PLO) (Sigma P-4957. Sigma- Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) solüsyonu, MiliQ $dH_2O$ ile 1:2 oranında sulandırılarak (Sartorius 16534. Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, GE) hazırlandı ve 0.20 µm filtreden geçirilerek kaplandı. Ertesi gün PLO ile kaplı deney petrileri 3 kere MiliQ $dH_2O$ ile yıkandı ve petriler daha sonra 1 µg/mL fibronektin ile kaplandı.

37ºC, %5 CO2 içeren etüve petriler kaldırılarak 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petriler yeniden MiliQ $dH_2O$ ile 3 kere daha yıkandı ve her bir petriye kültür medyumu eklenerek 37ºC, %5 CO2 içeren etüvde bırakıldı.

### 1.9.2. LUHMES Kültür Medyumunun Hazırlanması

50 ml Advanced (NEAA+, Sodium Pyruvate+, L-Glutamine-) DMEM/F12 Medyumu (Gibco 12634-010 Invitrogen Inc., New York, USA) içine eklenen maddeler aşağıdaki tabloda görülmektedir (Tablo 3-2).

**Tablo 3-2: Bazal LUHMES medyumu içerisine eklenen maddeler.**

| **BİLEŞENLER** | **MİKTAR** |
|---|---|
| **Advanced** (NEAA+, Sodium Pyruvate+, L-Glutamine-) **DMEM/F12 Medyumu** (Gibco 12634-010 Invitrogen Inc., New York, USA) | 49 ml |
| **N-2 supplement** (Gibco 17502-48 Invitrogen Inc., New York, USA) | %1 |
| **L-Glutamin** 200mM 100X (Gibco 25030-024 Invitrogen Inc., New York, USA) | %1 |

- Hazırlanan Bazal LUHMES medyumu 0,20 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılana kadar +4ºC'de saklandı.

### 1.9.3. LUHMES Hücre Kültürü'nün Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması

- Bazal LUHMES kültür medyumu hazırlandı ve 37ºC'de ısınmaya bırakıldı. Medyum kullanılmadan hemen önce içerisine 40 ng/ml b-FGF eklendi.
- -196ºC'den çıkartılan hücreler su banyosunda 37°C'de çözündürüldü ve b-FGF bulunmayan kültür medyumu içerisinde 125xg'de 5-10 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası hücre çökeltisi üzerindeki üst sıvı dikkatlice atıldı ve çökelti 2 ml 40 ng/ml b-FGF içeren Bazal LUHMES kültür medyumunda süspanse edildi ve daha önce kaplama yapılmış petrilere ekimi gerçekleştirildi.
- Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra, yoğunluğu %80'e ulaşana kadar her 2-3 günde bir 40 ng/ml b-FGF içeren Bazal LUHMES kültür medyumu ile değiştirildi.

- Hücrelerin yoğunluğu %80'e ulaşınca pasajlama yapıldı. %0,25'lik (v/v) tripsin-EDTA'dan (Gibco, 25200-056) petriye 1:4 oranında olacak şekilde konarak hücrelerin bağlantılarının ayrılması için 5 dk. inkübe edildi.
- Tripsin aktivitesini nötralize etmek için bazal medyum eklendi. Hücreleri içeren tüm sıvı toplanarak 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 125xg'de 7 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatan atıldı ve pellet üzerine önceden ısıtılmış 40 ng/ml b-FGF içeren Bazal LUHMES medyumu eklendi.
- 6 kuyulu kültür tabağına $cm^2$ başına $4x10^4$ olacak şekilde hücre alınarak toplam hacim 1,5 mL olacak şekilde ekildi ve %5 $CO_2$ içeren etüvde 37°C'de inkübe edildi.
- Farklılaşma adımına geçilmeden önce LUHMES hücrelerinin bölünme karakteri Ki67 ile doğrulandı.

### 1.9.4. LUHMES Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılma Medyumunun Hazırlanması

50 ml Advanced (NEAA+, Sodium Pyruvate+, L-Glutamine-) DMEM/F12 Medyumu (Gibco 12634-010 Invitrogen Inc., New York, USA) içine eklenen maddeler aşağıdaki tabloda görülmektedir (Tablo 3-3).

**Tablo 3-3: Nörona farklılaştırılma medyumunun içerisine eklenen maddeler.**

| **BİLEŞENLER** | **MİKTAR** |
|---|---|
| **DMEM Medyumu** (Gibco 10569-010 Invitrogen Inc., New York, USA) | 47,255 ml |
| **N-2 supplement** (Gibco 17502- 048 Invitrogen Inc., New York, USA) | %1 |
| **L-Glutamin** 200mM 100X (Gibco 25030-024 Invitrogen Inc., New York, USA) | %1 |
| **Tetracycline Hydrochloride** (Sigma T7760 Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) | (3µg) |

| | |
|---|---|
| **Dibutyryl-cAMP** (SantaCruz (sc-201567B) SantaCruz Inc. California, USA) | 1mM |
| **Recombinant Human GDNF 50 µg** (Applied Biological Materials Inc. (abm), Canada) | 2 ng/ml |

- Hazırlanan nörona farklılaştırılma medyumu 0,20 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılana kadar +4ºC'de saklandı.

### 1.9.5. LUHMES Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

- Hücrelerin üzerindeki 40 ng/ml b-FGF içeren Bazal LUHMES kültür medyumu uzaklaştırıldı ve hücreler $Ca^{+2}$ ve $Mg^{+2}$ içermeyen D-PBS ile nazikçe yıkandı.
- Tripsin-EDTA uygulamasıyla kaldırılan hücreler b-FGF bulunmayan medyum içerisinde 190xg'de 7 dk. santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı, hücreler nörona farklılaştırma medyumunda süspanse edildi.
- Hemasitometri yöntemiyle total hücre sayısı belirlendikten sonra daha önceden kaplanmış olan petrilere $cm^2$ başına 6 x $10^4$ hücre olacak şekilde ekildi ve petriler %5 $CO_2$ içeren 37 ºC'lik etüvde inkübe edildi.
- Hücreler tam olarak farklılaşana kadar her 2-3 günde bir nörona farklılaştırma medyumu 1:2 oranında değiştirildi.
- Nöron karakterinin doğrulanması için; LUHMES hücrelerinde farklılaşma Ki67, MAP2 ve TUBB3 belirteçleri ile takip edildi (Tong ve ark. 2017).

### 1.10. Luhmes Hücreleri ile İnsan Primer Astrositlerinin Ko-Kültürü

1. Primer astrositlerin; hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında pasajı yapıldı ve 6 kuyulu plakalara ekildi ve yeniden hücrelerin uygun yoğunluğuna ulaşması beklendi.

2. Daha sonra, önceden (2 gün) farklılaştırılmış LUHMES hücreleri üzerine, (L-Glutamin, N2 ve 3µg tetrasiklin içeren DMEM/F12'de) 180.000/$cm^2$ yoğunlukta olacak şekilde astrosit hücreleri ekildi ve 4 gün daha birlikte %5 $CO_2$ içeren etüvde 37°C'de inkübe edildi.

### 1.10.1. Ko-Kültürdeki Hücrelerin Ayrımının Yapılması

Tamamen farklılaşmış LUHMES (nöronlar), 5-6 gün sonra nöronal spesifik belirteçler ile boyanırken; astrositler ise astrosite özgü belirteçler ile boyandı.

**Farklılaşmış LUHMES (nöronlar) için;**

- Anti-beta III Tubulin antibody (ab41489) abcam – 1:500
- Ki-67 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (MA5-14520)- 1:25

**Astrositler için;**

- GFAP (Millipore AB5804. Millipore Corp. California, USA) - 1:400
- Aldh1L1 (Millipore MABN495. Millipore Corp. California, USA) - 1:25

***SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonunun gösterilmesi için hücreler aşağıdaki spesifik belirteçler ile işaretlendi;**

- Anti-Alpha Synuclein (Syn211) (Thermo Scientific, 328100) 1:250
- Anti-MAP2 (Thermo Scientific, MA5-12826) 1:250

**1.Gün**

- Kültürdeki hücreler %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15812-7. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika fikse edildi.

- Hücreler 3 defa 2 ml PBS ile yıkandı. Hücreler %0,02 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %30'luk keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

- Hücreler primer antikor ile işaretlendi. Primer antikorlar %0,02 T-PBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu ile sulandırıldı ve örnekler gece boyu +4°C'de bekletildi.

**2.Gün**

- Hücreler 3 kere oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.

- Hücreler %1,5 keçi serumu %0,02 T-PBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan keçi anti tavşan IgG TR (Texas Red) (Alexa Fluor® 568, Abcamab175471) ve 1:100 oranında sulandırılan keçi anti fare IgG FITC (Fluorescein isothiocyanate Millipore AP181F. Millipore Corp. California, USA) sekonder antikorları ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Hücreler 3 kere oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı. Hücreler 1:15.000 oranında $dH_2O$ ile sulandırılmış DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi ve kapama medyumu ile kapatıldı.

### 1.10.2. Astrosit- Luhmes Ko-Kültüründen Total Protein İzolasyonu

Ko-kültür sonrası bütün gruplardan total protein izolasyonu yapıldı.

- İzolasyon öncesinde protein izolasyonunda kullanılacak Lizis Tamponu hazırlandı (Tablo 3-4).

**Tablo 3-4: Protein izolasyonunda kullanılan lizis tamponunun içerisine eklenen maddeler.**

| BİLEŞENLER | MİKTAR |
|---|---|
| **Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi (MPER)** (Thermo Scientific, 78501) | 200 µl |
| **Fosfataz İnhibitörü** (Roche, 4906845001) | 20 µl |
| **Halt Proteaz İnhibitör Kokteyli** (Thermo Scientific, 78430) | 2 µl |

- Kültürdeki her 2 petriden ilkine 200 µl Lizis tamponu karışımı eklendi ve hücreler kazınarak kaldırıldı ve diğer petriye aktarıldı.

- Diğer petrilerde de kazıma işlemi uygulandıktan sonra elde edilen tüm hücreler önce bir tüpte toplandı ve vortekstendi ve +4°C'de 14.000xg'de10 dk. santrifüj edildi.
- Proteinleri içeren üst sıvı temiz bir tüpe alındı ve -80ºC'de deneyde kullanılana kadar saklandı.

### 1.10.3. Astrosit-Luhmes Ko-Kültüründen Sinaptik Protein İzolasyonu

Ko-kültür sonrası bütün gruplardan sinaptik protein izolasyonu yapıldı.

- İzolasyon öncesinde sinaptik protein izolasyonunda kullanılacak olan Sinaptik Lizis Tamponu hazırlandı (Tablo 3-5).

**Tablo 3-5: Sinaptik protein izolasyonunda kullanılan sinaptik lizis tamponunun içerisine eklenen maddeler.**

| BİLEŞENLER | MİKTAR |
|---|---|
| **Syn-PER** (Thermo Scientific 87793, Thermo Fisher Scientific Inc. Illinois, USA) | 200 µl |
| **Fosfataz İnhibitörü** (Roche, 4906845001) | 20 µl |
| **Halt Proteaz İnhibitör Kokteyli** (Thermo Scientific, 78430) | 2 µl |

- Kültürdeki her 2 petriden ilkine 200 µl Sinaptik Lizis Tamponu karışımı eklendi ve hücreler kazınarak kaldırıldı ve diğer petriye aktarıldı.
- Diğer petrilerde de kazıma işlemi uygulandıktan sonra elde edilen tüm hücreler önce bir tüpte toplandı ve vortekstendi daha sonra1200xg'de10 dk boyunca 4°C'de santrifüj edildi.
- Üst sıvı yeni bir tüpe transfer edildi ve 15000xg'de 20 dk 4°C'de tekrar santrifüj edildi.
- Üst sıvı sinaptozom pelletten ayrıldı ve sinaptozom pellet üzerine Syn-PER solusyonu eklendi.
- Elde edilen örnekler -80ºC'de deneyde kullanılana kadar saklandı.

### 1.11. Western Blot Protokolü

İnsan astrosit hücrelerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildi. Daha sonra bu kültür gruplarında α-sinükleinin ve nöron-astrosit bağlantılarındaki sinaptik proteinlerin ekspresyon seviyelerinin gruplar arası karşılaştırmalı analizlerini yapabilmek için önce tüm gruplardaki hücrelerden total ve sinaptik protein izolasyonu yapıldı ve ardından Western Blot deneyleri gerçekleştirildi.

Western Blot deneylerinde kullanılmış olan antikorlar ve oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3-6).

**Tablo 3-6: Western Blot'ta Kullanılan Primer Antikorlar ve Seyreltme Oranları**

| **Antikor tipi** | **Antikor** | **Konak Organizma** | **Seyreltme Oranı** |
|---|---|---|---|
| Primer Antikor | **Anti-PSD95** (Abcam, ab18258) | Fare | 1/500 |
| Primer Antikor | **Anti- TSP-1** (Abcam, ab85762) | Fare | 1/250 |
| Primer Antikor | **Anti-Synaptophysin (SP11)**/(Thermo Scientific, MA5-14532) | Tavşan | 1/500 |
| Primer Antikor | **Anti-Synapsin-1/** (ThermoScientific,51-5200) | Tavşan | 1/500 |
| Primer Antikor | **Anti-NGF** (Novus,Ep13204) | Tavşan | 1/1000 |
| Primer Antikor | **Anti-Alpha Synuclein (Syn211)/**(Thermo Scientific, 328100) | Fare | 1/375 |
| Primer Antikor | **Anti-beta Aktin** (Abcam, ab8226) | Fare | 1/3000 |

**Tablo 3-7: Western Blot'ta Kullanılan Sekonder Antikorlar ve Seyreltme Oranları**

| **Antikor tipi** | **Antikor** | **Konak Organizma** | **Seyreltme Oranı** |
|---|---|---|---|
| Sekonder Antikor | **Anti-fare IgG H&L (HRP)/** (Abcam, ab97040) | Keçi | 1/3000 |
| Sekonder Antikor | **Anti-tavşan IgG H&L (HRP)/**(Thermo Scientific, 65-6120) | Keçi | 1/3000 |

- Deneye başlamadan önce, izole edilen sinaptik ve total proteinlerin konsantrasyonları NanoDrop One (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.

- Miktarları ölçüldükten sonra eşit konsantrasyona getirilen tüm proteinlerie; %10 beta-merkaptoetanol (Applichem, A1108,0500) eklenerek hazırlanan 4X Bolt LDS (Lityum Dodesil Sülfat) Yükleme Tamponu (Invitrogen, B0007) final konsantrasyonu 1X olacak şekilde eklendi.

- Protein örnekleri 95°C'de 5 dk. kaynatılıp kısaca santrifüj edildikten sonra jele yüklendi.

- Örnekler dikey jel elektroforezde (Invitrogen PowerEase500) (200V, 25 dakika) yürütüldükten sonra, Biorad Trans-Blot Turbo cihazında PVDF membrana (ThermoFisher, PB3210) transfer edildi.

- Proteinlerin aktarıldığı PVDF membranlar; miktarı saptanmak istenen proteinlere karşı oluşturulmuş antikorlar ile işaretlendi.

- Bunun için, öncelikle PVDF membran 10 ml PBS içerisinde çözündürülen %5 süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilerek bloklandı.

- Membran 3 kere 5 dk. PBS ile yıkandıktan sonra, 10 ml PBS içerisinde çözündürülen %5 süt tozu ve primer antikor ile bir gece +4$^{o}$C de inkübe edildi.

- PVDF membranlar tekrar 3 kere 5 dk. PBS ile yıkandıkan sonra 10 ml PBS içerisinde çözündürülen %5 süt tozu ve uygun sekonder antikor ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Luminol ve hidrojen peroksit çözeltileri içeren kemilüminesan substrat (ThermoScientific, 34580) ile membran 4-5 dk. inkübe edildi.

- DNR MicroChemi 4.2 MP cihazında görüntüleme yapıldı ve ImageJ yazılımıyla grupların bant yoğunlukları ölçüldü.

### 1.12. Sitotoksite Ölçümü

Sitotoksisite, kültürdeki ölü hücrelerden veya membranı hasarlı hücrelerden medyuma salınan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının öçlülmesiyle belirlendi. LDH salınımı analizinde kullanılacak olan; düşük konsantrasyonlu kontrol, yüksek konsantrasyonlu kontrol ve negatif kontrol grupları, çalışmada yer alan deney grupları ile birlikte hazırlandı.

- Negatif kontrol; DMEM+'dan oluşan kültür medyumundaki LDH aktivitesini belirlemek üzere hazırlandı.

- Düşük konsantrasyonlu kontrol grubu; Hiçbir madde verilmeyen kontrol gruplarındaki hücrelerden normal koşullardaki LDH salınımını belirlemek için kullanıldı.

- Yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu; Kültür medyumuna %2 Triton X-100 verilip 24 saatlik inkübasyon ile hücrelerden salınabilecek en yüksek LDH miktarını belirlemek için kullanıldı.

Uygulama süreleri sonunda tüm deney gruplarına ait kültür medyumlarından ELISA çalışmaları için toplandı ve -80$^{o}$C'de saklandı.

LDH salınımı Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche 11 644 793 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Her bir örnekten 96 kuyulu mikroplakalara oda sıcaklığına getirilen kültür medyumlarından 100 µl yüklendi.

2. Üzerlerine taze hazırlanmış katalizör ve boya çözeltisi içeren reaksiyon karışımıdan 100 µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası örneklerin absorbansları 492 nm'lik filtre ile Thermo MultiSkan EX (Thermo Fisher Scientific$^{TM}$ Delaware, USA**)** ELISA okuyucuda okundu. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

### 1.13. İstatiksel Analiz

Hedef proteinlerin göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere, er bir gruba ait Western Blot görüntülerindeki bant yoğunluklarının ham verileri; bilimsel görüntüleri işlemek ve analiz etmek için kullanılan Image J (1.53v sürümü) yazılımı ile tayin edilmiştir.

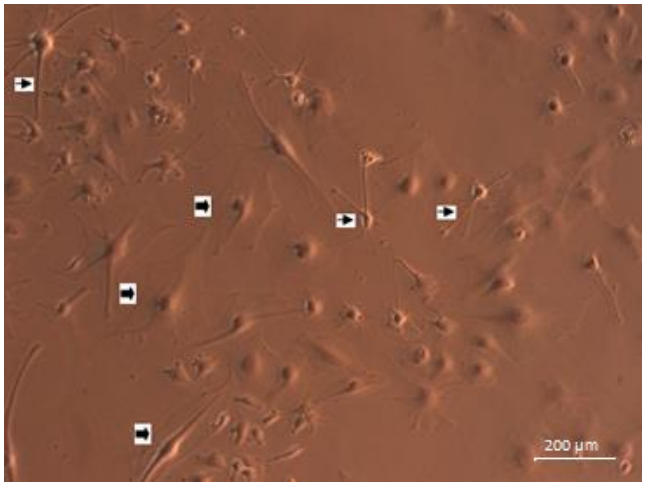
Transfeksiyon kontrolü için kullanılan ***SNCA*** immün işaretleme deneylerine ait ham verileri ve sitotokisiste deneylerine ait ham veriler GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) veya SPSS 24.0 yazılımı kullanılarak datanın normal dağılıp dağılmamasına ve elde edilen SD'lerin arasındaki farkın anlamlı olup olmamasına göre, önce one-way ANOVA, takibinde çoklu karşılaştırma için Tukey-Kramer Multiple Comparision testleri ile veya önce Kruskal Wallis, sonrasında çoklu karşılaştırma için Dunn's Multiple Comparision testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p<0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edildi.

# 4. BULGULAR

İnsan astrosit kültürüne *SNCA* genini içeren plazmidler ile α-sinüklein proteinin aşırı ekspresyonu sağlanarak LUHMES hücreleri ile bir ko-kültür sistemi oluşturuldu. α-sinüklein aşırı ekspresyonunun başarısı immün floresan işaretleme yöntemi ile belirlendi. Astrositlerde artan α-sinükleinin bilinenin aksine nöronlara doğru hareket ettiği ve nöron-astrosit bağlantılarının sayısındaki değişimler ise çoklu immunfloresan işaretleme ve canlı görüntüleme sistemi ile saptandı. Sitotoksik değişiklikler, kültür ortamına salınan laktat dehidrogenaz miktarı ölçülerek saptandı.

### 1.14. Astrositlerin Morfolojik ve Mikroskopik Değerlendirmesi

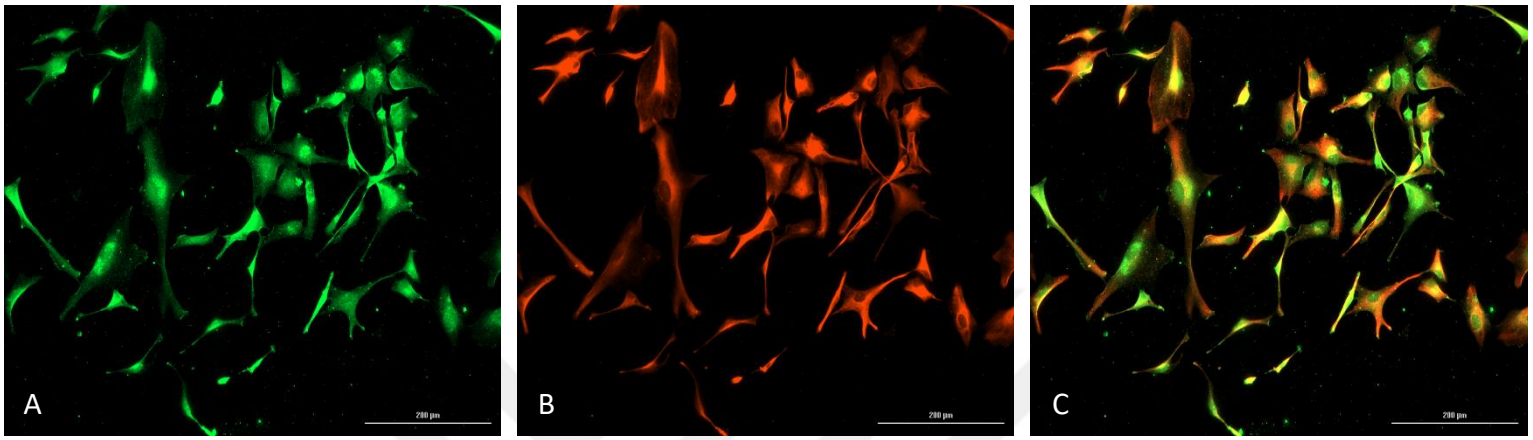
İnsan astrositlerinin morfolojisi ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir. Fibröz ve protoplazmik olmak üzere her iki astrosit tipinin de kültürde bulunduğu ve bu hücrelerin hücre gövdesi ve uzantıları bakımından birbirinden farklı morfolojilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4-1).




**Şekil 4-1: Işık mikroskobu altında primer insan astrositlerinin morfolojisinin gösterilmesi.**

( ➔ ) Fibröz astrosit, ( ➡ ) Protoplazmik astrosit

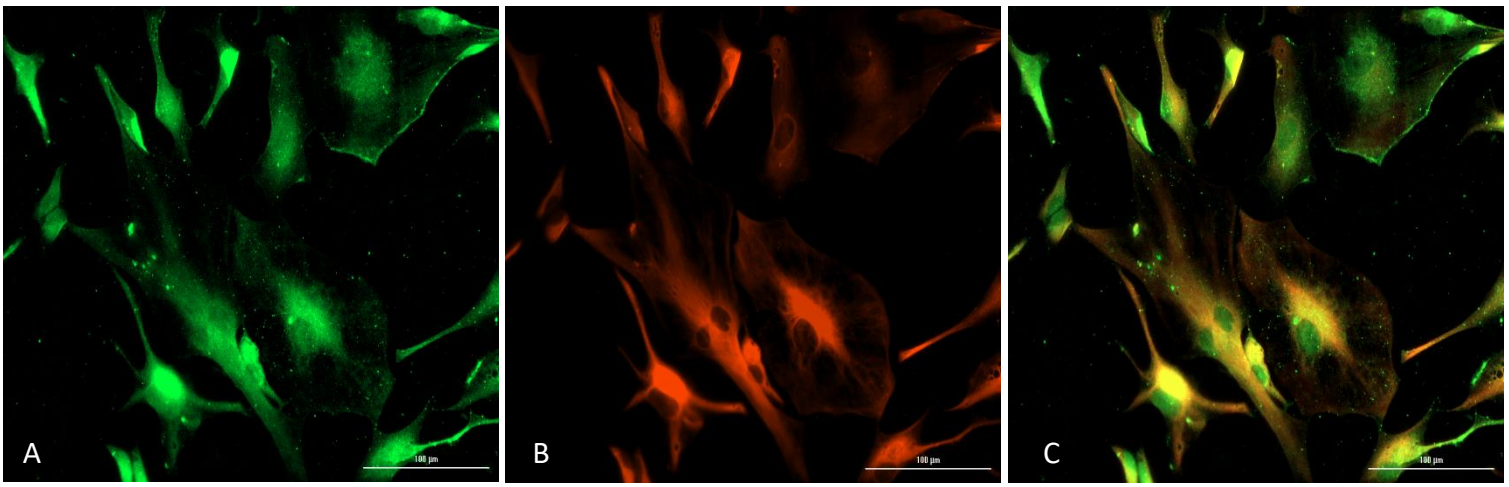
Kültür koşullarındaki insan astrositlerinin karakterleri; bir astrosit belirteci olan glial fibriler asidik (GFAP) ve Aldehid dehidrojenaz ailesin üyesi L1 (Aldh1L1) kullanılarak çift immünfloresan işaretleme yöntemiyle işaretlenmiş olup, 10X büyütmedeki görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 4-2).




**Şekil 4-2: İki farklı astrosit belirtecinin immünfloresan işaretlenmesi ile insan astrositlerinin kültür koşullarındaki karakterlerinin gösterilmesi.**

A) İnsan astrositlerinde bir astrosit belirteci olan GFAP (kırmızı) immün işaretlemesi. B) 10X büyütmedeki insan astrositlerinde başka bir astrosit belirteci olan Aldh1L1 (yeşil) immün işaretlemesi. C) 10X büyütmedeki GFAP (kırmızı) ve Aldh1L1 (yeşil) immün işaretlemelerinin çakıştırılması. Büyütme: 10x

Kültür koşullarındaki insan astrositlerinin karakterleri; bir astrosit belirteci olan glial fibriler asidik (GFAP) ve Aldehid dehidrojenaz ailesin üyesi L1 (Aldh1L1) kullanılarak çift immünfloresan işaretleme yöntemiyle işaretlenmiş olup, 20X büyütmedeki görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 4-3).



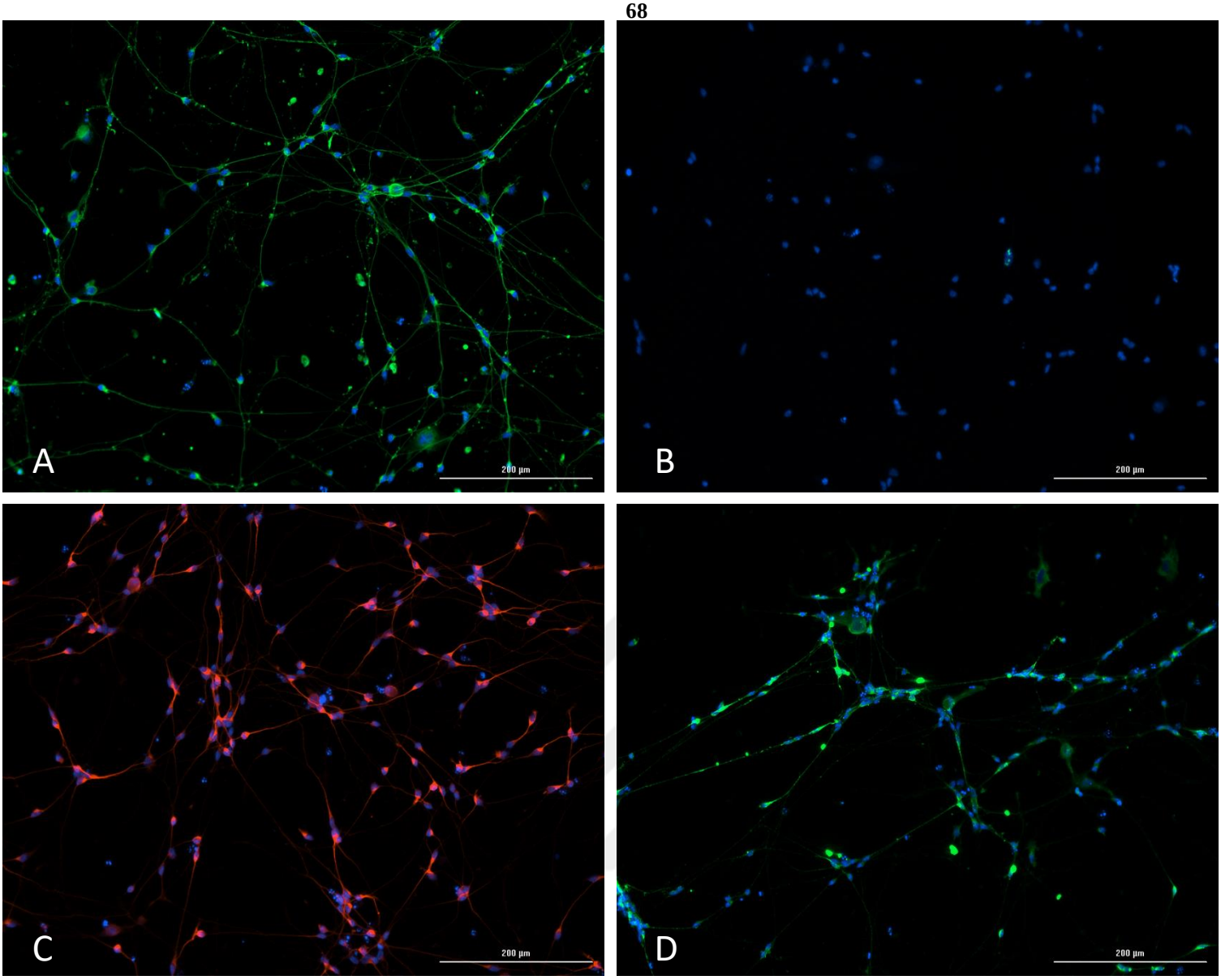
**Şekil 4-3: İki farklı astrosit belirtecinin immünfloresan işaretlenmesi ile insan astrositlerinin kültür koşullarındaki karakterlerinin 20X büyütmede gösterilmesi.**

A) 20X büyütmedeki insan astrositlerinde bir astrosit belirteci olan GFAP (kırmızı) immün işaretlemesi. B) 20X büyütmedeki insan astrositlerinde başka bir astrosit belirteci olan Aldh1L1 (yeşil) immün işaretlemesi. C) 20X büyütmedeki GFAP (kırmızı) ve Aldh1L1 (yeşil) immün işaretlemelerinin çakıştırılması.

### 1.15. Farklılaştırılmış LUHMES Hücrelerinin Nöral Karakterlerinin Gösterimi

İnsan embriyonik prekürsör nöral hücreleri olan Lund human mesencephalic (LUHMES) hücreleri başarı ile çoğaltıldı ve farklılaştırma protokolü optimize edildi. En iyi farklılaştırma protokolünü belirlemek üzere ekilen hücre sayısında ve farklılaştırma medyumunda değişiklikler gerçekleştirilmiş, nöronal belirteçler kullanılarak farklılaştırma protokolü doğrulanmıştır.

Yapılan denemeler sonucu belirlenen en iyi farklılaştırmanın; $cm^2$ başına 3 x $10^4$ hücre ekilip, 3 µg/ml tetrasiklin içeren farklılaştırma medyumu ile gerçekleştirilen protokol olduğuna karar verilmiştir. Farklılaştırmanın başarısını kontrol etmek için hücreler; Mikrotübül İlişkili Protein 2 (MAP-2), β-tubulin-III, ve bir dopaminerjik nöron belirteci olan Tirozin Hidroksilaz (TH) ile immünfloresan işaretleme yöntemiyle gösterildi. Alınan görüntülerde hücrelerde β-tubulin-III, MAP2 ve TH ekspresyonlarının olduğu ve hücrelerin uzantılar gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4-4).



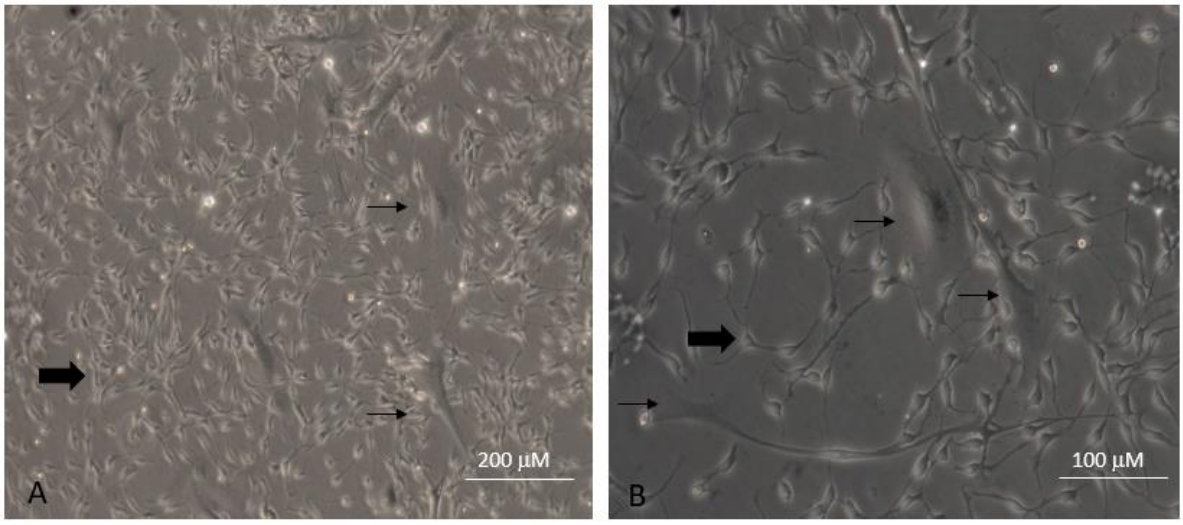

**Şekil 4-4: Farklılaştırılmış LUHMES hücrelerinin nöral karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.**

A) Anti-β-tubulin antikoru (yeşil) ve nukleus boyası DAPI (mavi) çakıştırma B) Ki67 (yeşil) ve nukleus boyası DAPI (mavi) çakıştırma C) Mikrotübül İlişkili Protein 2 (MAP2) (kırmızı) ve nukleus boyası DAPI (mavi) çakıştırma D) Tirozin Hidroksilaz (yeşil) ve nukleus boyası DAPI (mavi) çakıştırma. Büyütme:10X

- Ki-67 proteini (MKI67 olarak da bilinir) hücresel proliferasyon ile ilişkili bir belirteçtir. Ki-67 proteini, hücre döngüsünün aktif fazlarında bulunur, ancak hücre döngüsünün aktif olmayan fazlarında yoktur. Ki67 proliferasyon belirteci olduğundan dolayı; farklılaşmış LUHMES'te Ki67 ekspresyonu beklenmemektedir. Şekil 4-4'ün B bölümünde Ki67 (yeşil) sinyalinin alınmaması bölünmenin durduğunu doğrulamaktadır.

## 1.16. LUHMES ve İnsan Astrositleri ile Gerçekleştirilen Ko-Kültürdeki Hücrelerin Morfolojilerinin Gösterimi

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda ko-kültürdeki hücrelerin morfolojileri ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir (Şekil 4-5).

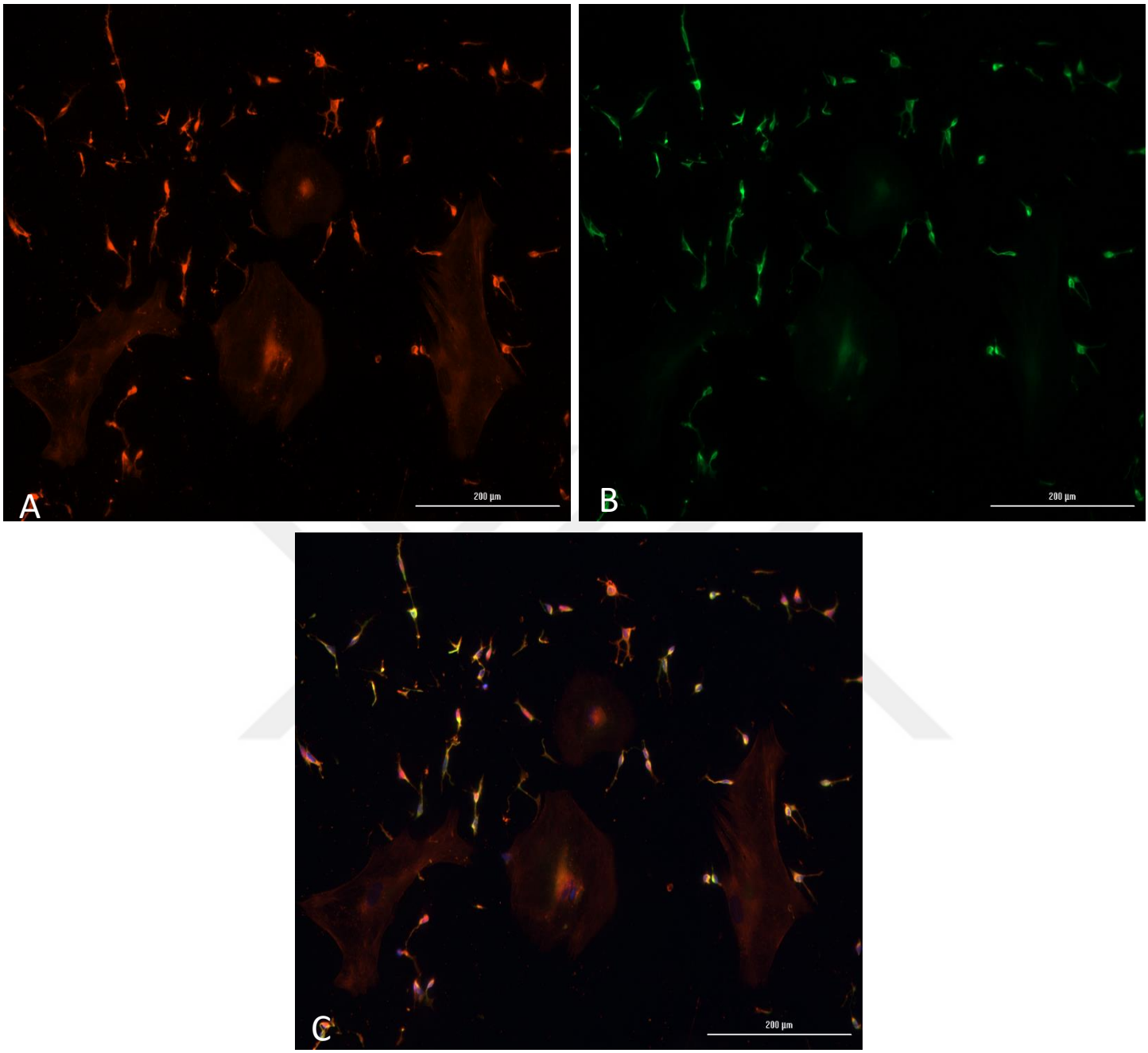



**Şekil 4-5: Işık mikroskobu altında ko-kültür koşullarındaki primer insan astrositlerinin ve LUHMES hücrelerinin morfolojisinin gösterilmesi.**

Işık mikroskobu altında ko-kültür koşullarındaki primer insan astrositlerinin ve LUHMES hücrelerinin morfolojisi ışık mikroskobu altında gözlemlenmiş ve farklı büyütmelerde görüntüleri alınmıştır. A) 4X büyütmedeki görüntüleri. B)10X büyütmedeki görüntüleri.

( → ) İnsan astrosit hücreleri ( ➡ ) Farklılaştırılmış Luhmes Hücreleri

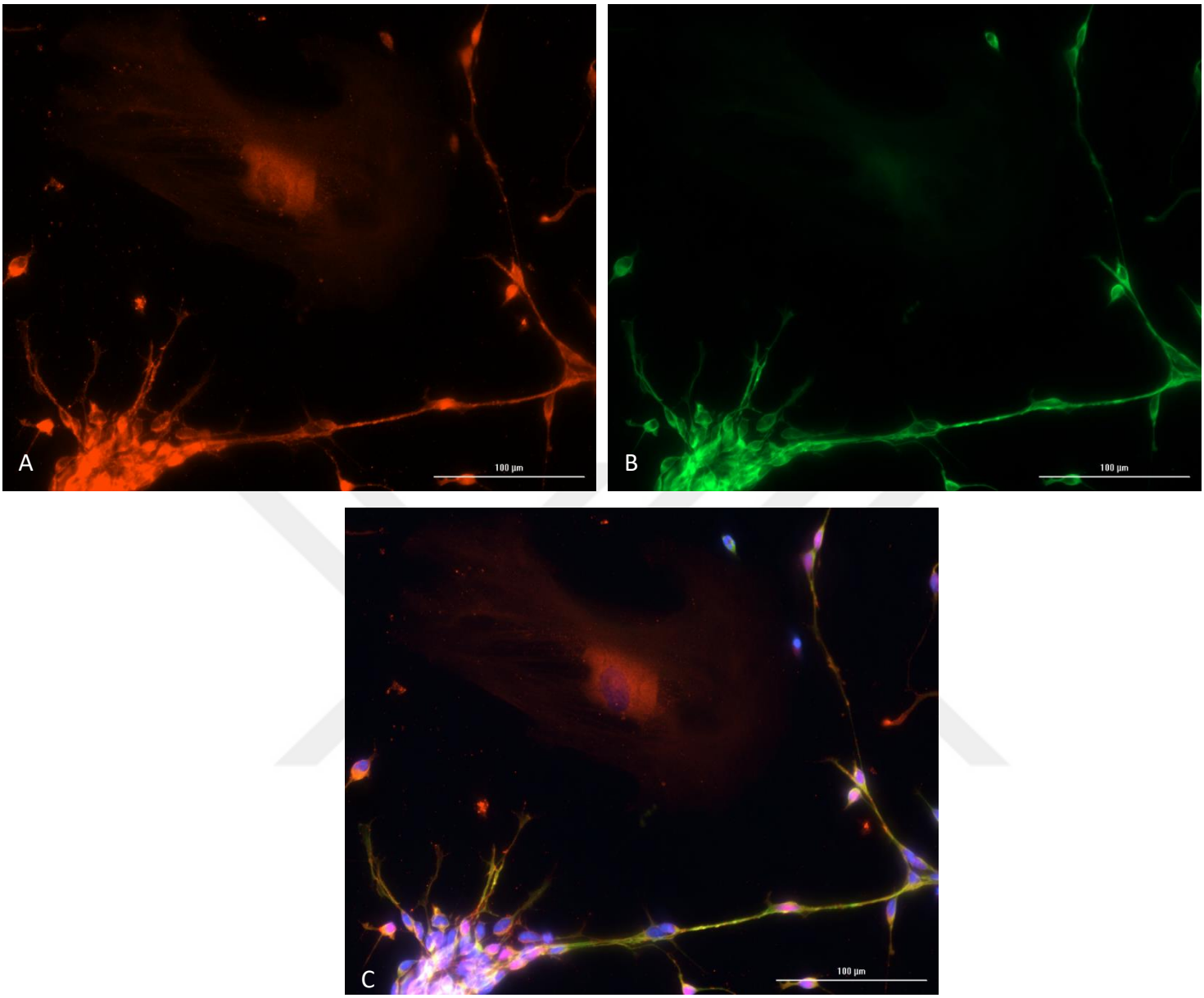
Ko-kültürün 4. gününde farklılaşmış LUHMES hücreleri (nöronlar) nöronal spesifik belirteçler olan β-tubulin-III ile işaretlenirken; insan astrositlerinin karakterleri; astrosit belirteci olan GFAP ile çift immünfloresan işaretleme yöntemiyle işaretlenmiş olup, 10X büyütmedeki görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 4-6).




**Şekil 4-6: Ko-kültür koşullarında hücre karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.**

A) Bir astrosit belirteci olan GFAP (kırmızı) immün işaretlemesi. B) Nöronal belirteç olan Anti-β-tubulin antikoru (yeşil) immün işaretlemesi. C) GFAP (kırmızı) ve Anti-β-tubulin (yeşil) immün işaretlemeleri ile DAPI (mavi) nukleus boyasının çakıştırılması (10x)

Ko-kültürün 4. gününde farklılaşmış LUHMES hücreleri (nöronlar) nöronal spesifik belirteçler olan β-tubulin-III ile işaretlenirken; insan astrositlerinin karakterleri; astrosit belirteci olan GFAP ile çift immünfloresan işaretleme yöntemiyle işaretlenmiş olup, 20X büyütmedeki görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 4-7).



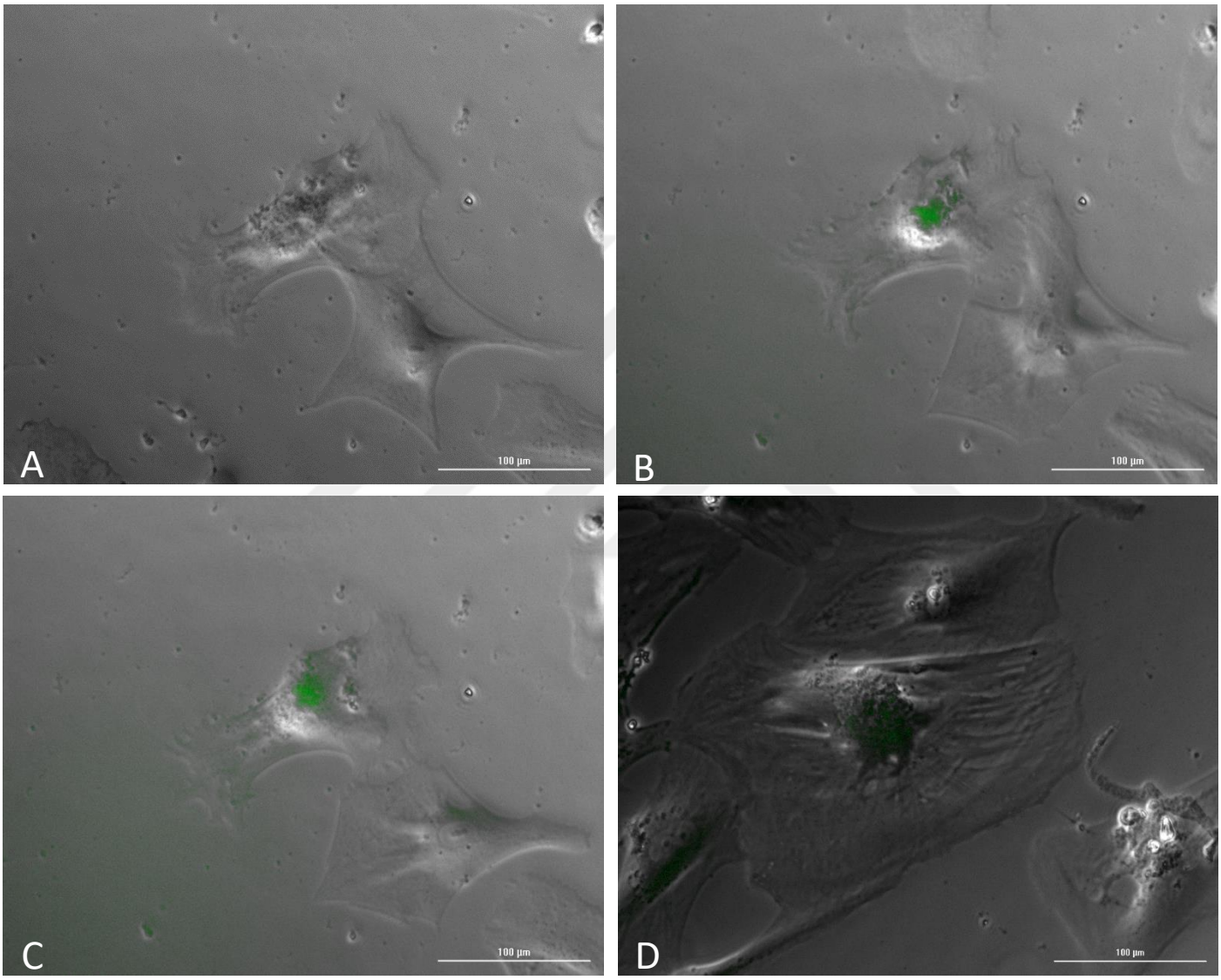

**Şekil 4-7: Ko-kültür koşullarında hücre karakterlerinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.**

A) Bir astrosit belirteci olan GFAP (kırmızı) immün işaretlemesi. B) Nöronal belirteç olan Anti-β-tubulin antikoru (yeşil) immün işaretlemesi. C) GFAP (kırmızı) ve Anti-β-tubulin (yeşil) immün işaretlemeleri ile DAPI (mavi) nukleus boyasının çakıştırılması (20x)

### 1.17. *SNCA* Aşırı Ekspresyonu

#### 1.17.1. İnsan Astrositlerinin *SNCA* Genini İçeren Plazmid ile Transfeksiyonu

İnsan astrositlerindeki *SNCA* geni transfeksiyonun lipid bazlı ajan yardımı ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği, plazmid haritasında da gösterildiği gibi (Şekil 3-1) sahip olduğu GFP kuyruğu canlı hücre görüntüleme yöntemiyle takip edilerek gösterilmiştir (Şekil 4-8).

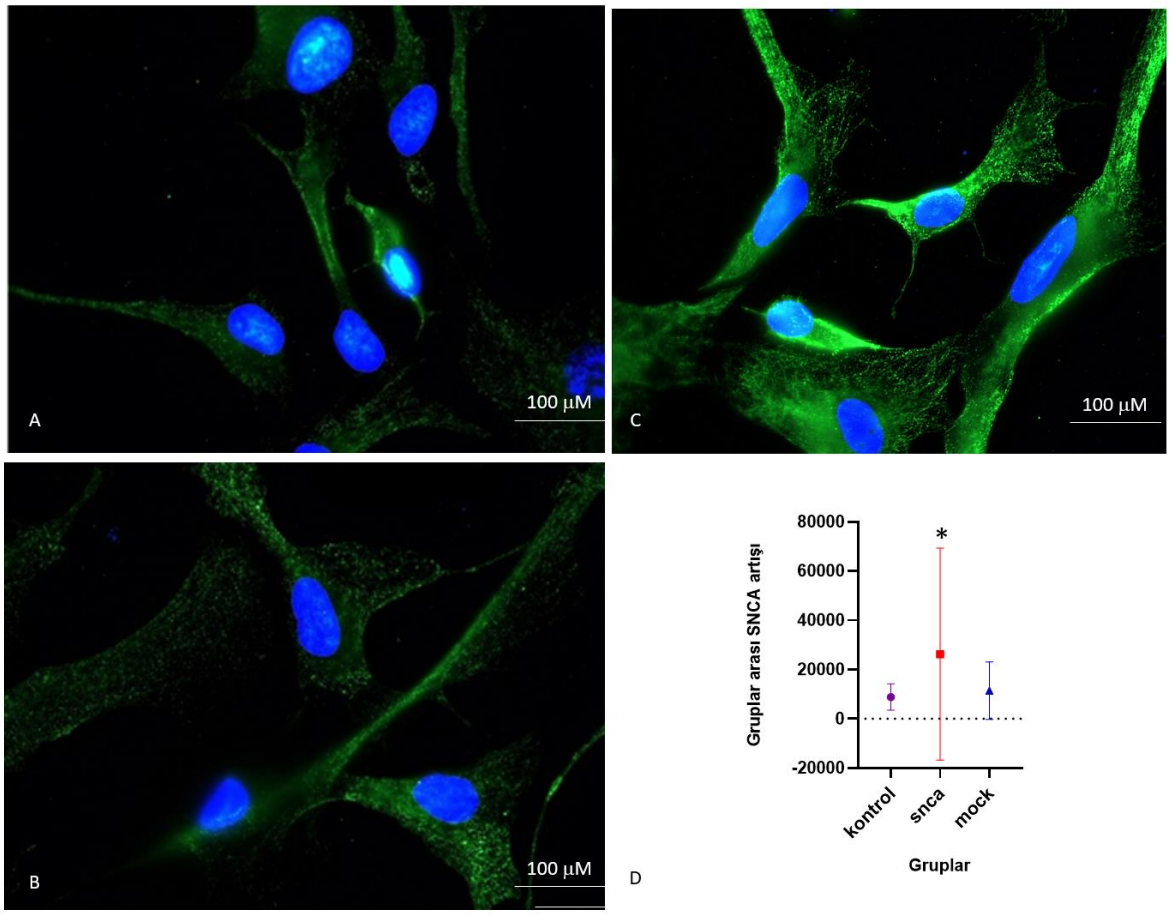



**Şekil 4-8 : İnsan astrositlerinde *SNCA* plazmid transfeksiyonun 72. saatte başarılı bir şekilde gerçekleştiği immün işaretleme yapılarak gösterilmiştir.**

A) *SNCA* plazmid transfeksiyonun 24. saati. Büyütme: 40X B) *SNCA* plazmid transfeksiyonun 48. saati Büyütme: 40X C) *SNCA* plazmid transfeksiyonun 72. saati Büyütme: 40X D) *SNCA* plazmid transfeksiyonun 72. saati Büyütme: 60X

İnsan astrositlerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonunun başarısı, Anti-Alpha Synuclein (Syn211) (Thermo Scientific, 328100) antikoruyla IF işaretleme yöntemi

kullanılarak gösterildi. IF işaretleme sonuçlarına göre plazmid transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği 72. saatte saptandı (Şekil 4-9).



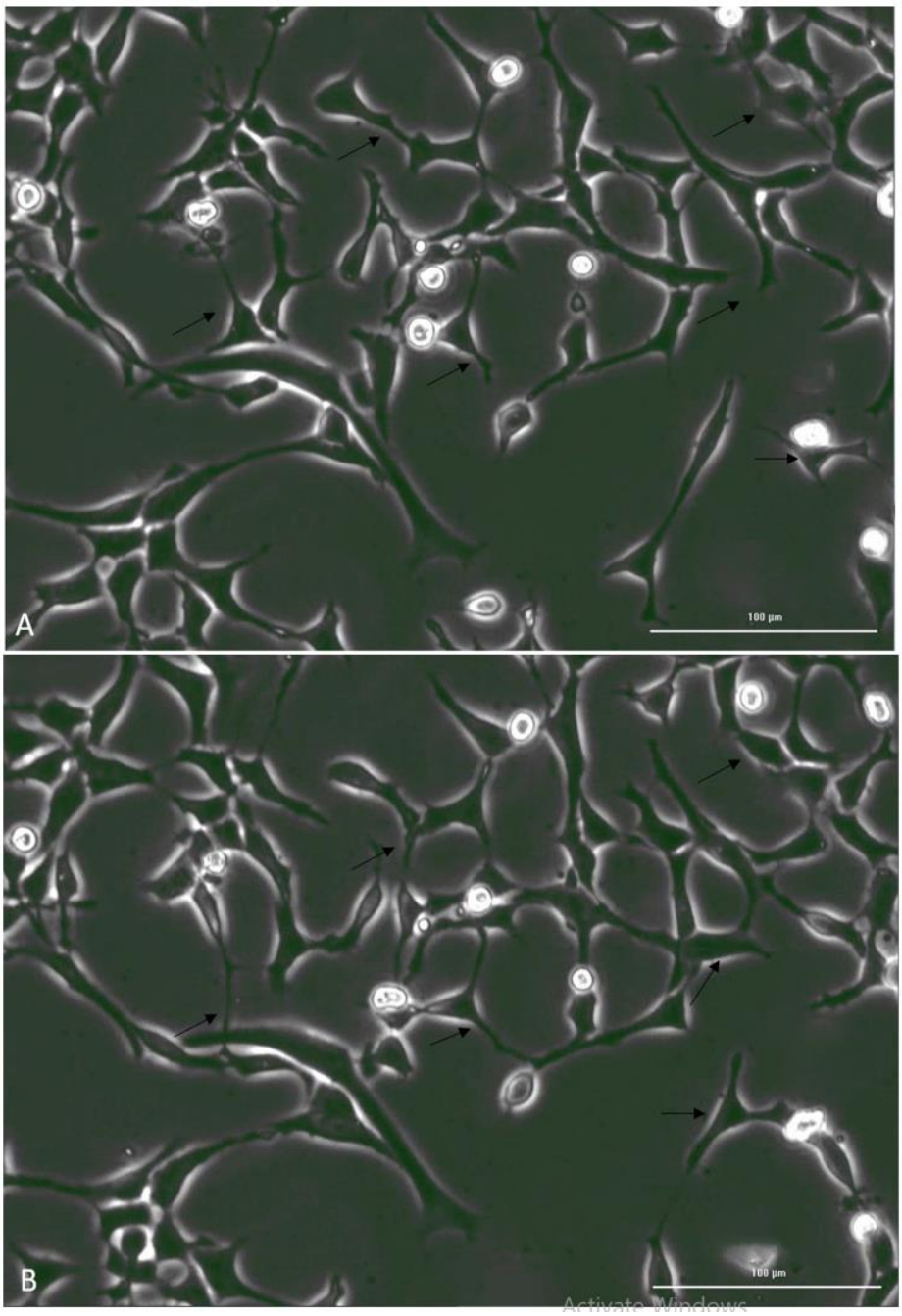

**Şekil 4-9: İnsan astrosit kültüründe *SNCA* plazmid transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin İmmünfloresan işaretleme gösterilmesi.**

İnsan astrositlerinde SNCA plazmid transfeksiyonun 72. saatte başarılı bir şekilde gerçekleştiği immün işaretleme yapılarak gösterilmiştir. A) Kontrol grubu, B) MOCK grubu (boş plazmid), C) SNCA grubu. DAPI (mavi) ve α-syn (yeşil) Büyütme 100X. D) Gruplar arasında α-syn'in immün sinyal yoğunluğunun değerlendirilmesi. *SNCA* grubunda α-syn'in immün yoğunluğunun Kontrol ve MOCK gruplarına göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$)

### 1.17.2. Ko-Kültürde *SNCA* Genini İçeren Plazmid ile Transfeksiyonu

İnsan prekürsör nöral hücreler olan LUHMES hücreleri ile insan primer astrosit hücrelerini içeren bir ko-kültür sistemi oluşturulmuştur. Bu sistemde insan SNCA genini taşıyan plazmid, lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı kullanılarak sadece astrositlere akrarılmış ve daha sonra SNCA'yı aşırı eksprese eden bu astrositler nöronlar ile biraraya getirilmiştir. Çalışmamızda, α-sinükleini aşırı eksprese eden astrositler kullanılarak oluşturulan nöron-glia ko-kültürlerinde astrosit kaynaklı α-sinükleinin nöronlara taşındığı; plazmid haritasında da

gösterildiği gibi (Şekil 3-1) sahip olduğu GFP kuyruğu canlı hücre görüntüleme yöntemiyle takip edilerek gösterilmiştir (Şekil 4-10).

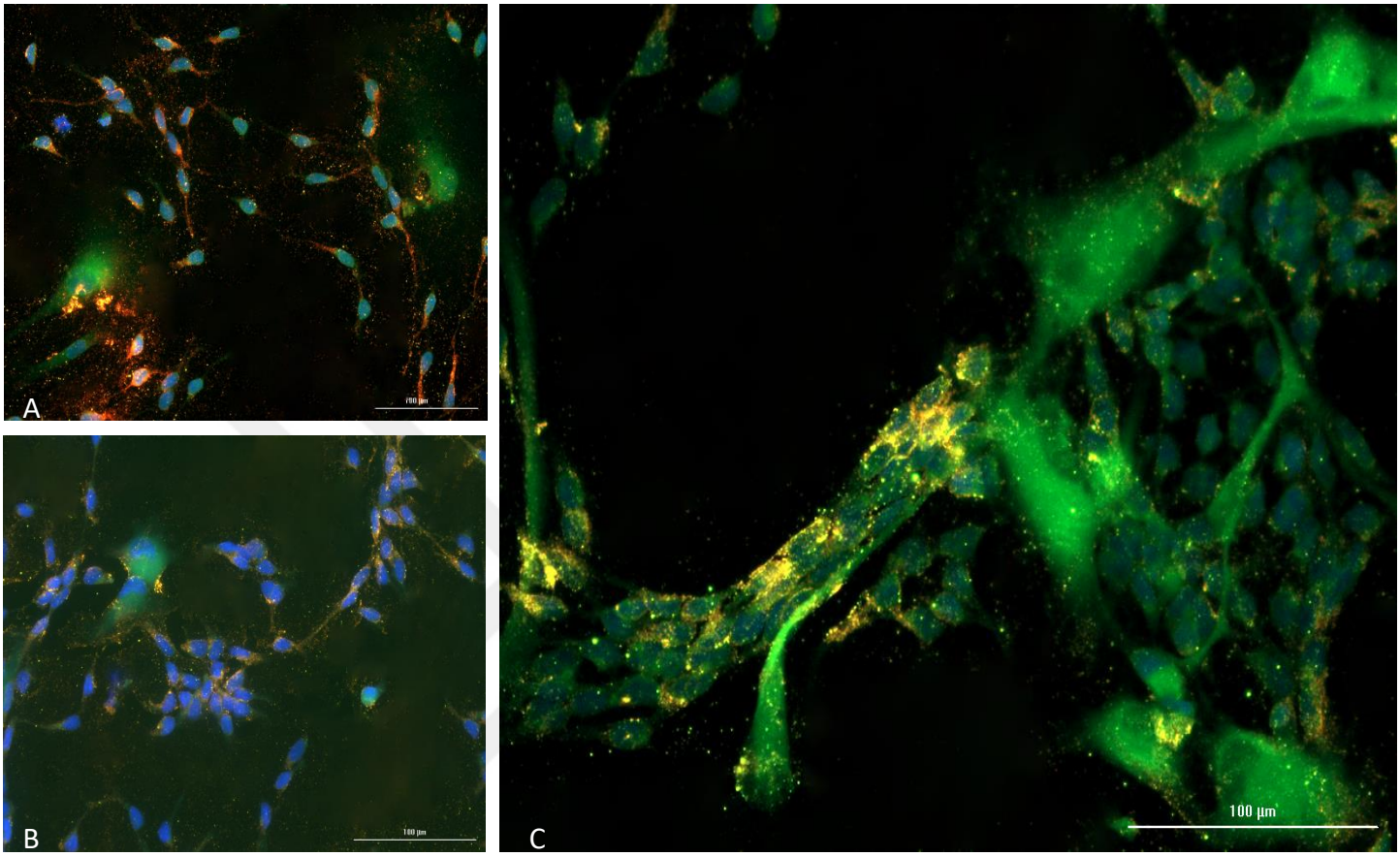



**Şekil 4-10: Ko-kültürde astrosit kaynaklı α-sinükleinin nöronlara taşındığı; plazmidin sahip olduğu GFP kuyruğu canlı hücre görüntüleme yöntemiyle takip edilerek gösterilmiştir.**

Ko-kültürün 4. gününde astrosit kaynaklı α-sinükleinin nöronlara taşındığı; A ile B resmi arasındaki fark sayesinde (⟶) ile gösterilmiştir.

İnsan astrositlerine *SNCA* transfeksiyonu gerçekleşririldikten sonra; farklılaşmış LUHMES hücreleri ile ko-kültürünün 4. gününde *SNCA* transfeksyonunun başarısı; LUHMES

hücreleri nöronal spesifik belirteç olan MAP-2 ile; insan astrositleri ise α-syn antikoruyla çift immünfloresan işaretleme yöntemiyle gösterilmiştir (Şekil 4-11).




**Şekil 4-11: Ko-kültürde *SNCA* plazmid transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin İmmünfloresan işaretleme gösterilmesi.**

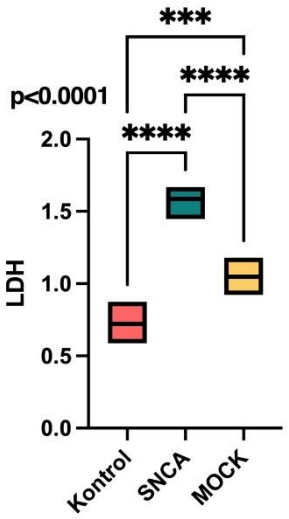
A) Kontrol Grubunda; MAP2 (kırmızı) ve α-syn (yeşil) immün işaretlemeleri ile DAPI (mavi) boyamasının çakıştırılması B) MOCK Grubunda; MAP2 (kırmızı) ve α-syn (yeşil) immün işaretlemeleri ile DAPI (mavi) boyamasının çakıştırılması C) SNCA Grubunda; MAP2 (kırmızı) ve α-syn (yeşil) immün işaretlemeleri ile DAPI (mavi) boyamasının çakıştırılması. Büyütme:20X

Ko-kültür öncesi sadece insan astrositlerine *SNCA* transfeksiyonu gerçekleşririlmiştir. *SNCA*'yı aşırı eksprese eden bu astrositler nöronlar ile biraraya getirilmiştir. Astrositlerde artan α-sinükleinin bilinenin aksine nöronlara doğru hareket ettiği elde edilen bulgular sonucunda saptanmıştır.

### 1.18. Sitotoksite Ölçüm Sonuçları

*SNCA* genini içeren plazmidle 72 saat süreyle transfekte edilen insan primer astrosit hücreleri ile LUHMES hücrelerinin ko-kültüründe ortaya çıkan sitotoksik etki, kültür ortamına salınan LDH miktarı ölçülerek saptanmıştır. Grupların LDH salınım miktarlarındaki

değişiklikler, gruplara ait ortalama LDH salınım yüzdeleri ile GraphPad InStat DTCG 3.06 yazılımı aracılığıyla belirlenen gruplar arasındaki farkların istatistiksel karşılaştırmaları Şekil 4-12'de gösterilmiştir.




**Şekil 4-12: *SNCA* genini içeren plazmid ile transfekte edilen insan astrosit hücreleri ile LUHMES hücrelerinin ko-kültüründe tüm grupların LDH miktarları.**

**** SNCA grubundaki LDH miktarı ile Kontrol ve Mock grubu arasında anlamlılık saptanmıştır ***Mock grubundaki LDH miktarı ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark vardır (p<0.0001).

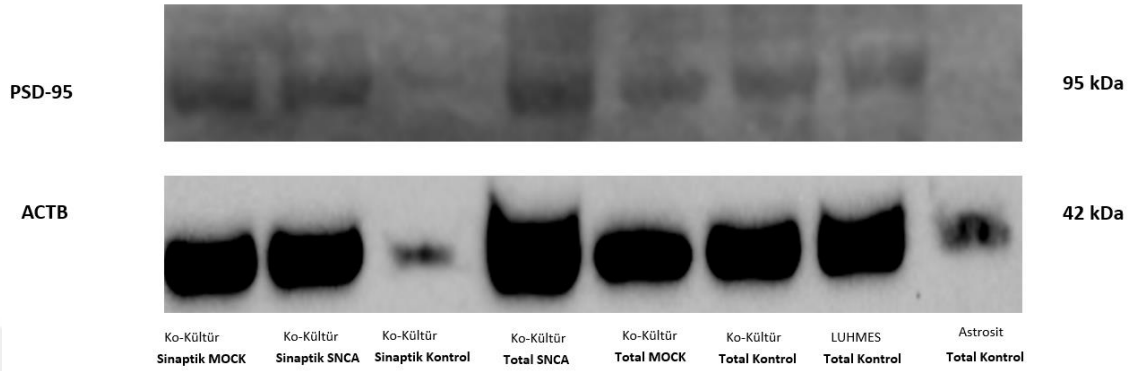
## 1.19. Western Blot Analizi ile Saptanan Protein Ekspresyon Sonuçları

İnsan astrositlerine *SNCA* transfeksiyonu gerçekleşririldikten sonra; farklılaşmış LUHMES hücreleri ile ko-kültüründe tüm gruplardan elde edilen total ve sinaptik protein örneklerinde, Western Blot analizleri gerçekleştirildi.

-MOCK grubu: Plazmidin hücreye girişinin sebep olabileceği mimikri ve inhibitör/aktivatör etkiler ile gerçek etki arasındaki ayrımı yapmak üzere kullanılan, herhangi bir gen içermeyen GFP kuyruklu plazmid ile transfekte edilmiş insan astrosit kültürü, negatif kontrol grubudur.

### 1.19.1. PSD-95'in Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

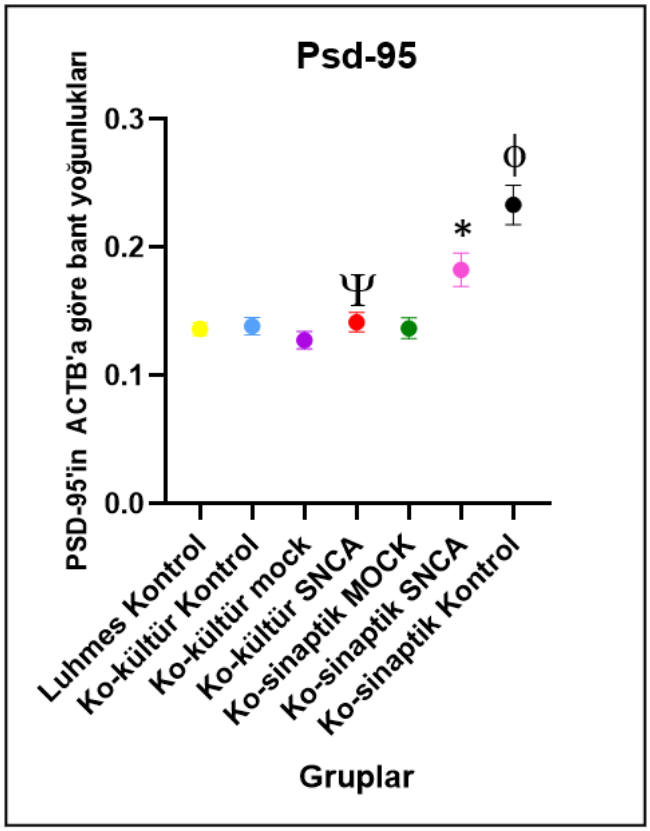
İnsan astrosit hücrelerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildi ve tüm deney gruplarında total ve sinaptik protein izolasyonu yapılarak PSD-95 proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlendi (Şekil 4-13, Şekil 4-14, Şekil 4-15, Şekil 4-16).




**Şekil 4-13: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında PSD-95 proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.**

ACTB (Beta Aktin) antikoru Referans protein olarak kullanılmıştır.

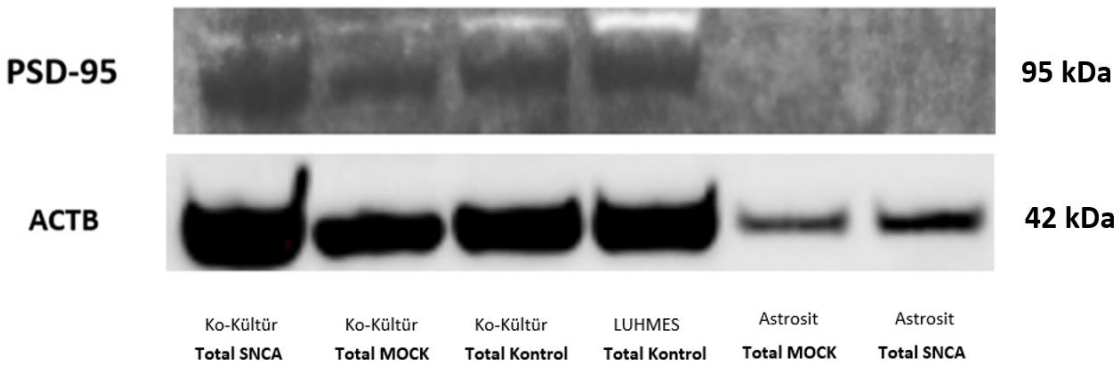
Western Blot görüntülemesinin (Şekil 4-13) analiziyle elde edilen sonuçta; Ko-sinaptik *SNCA* grubundaki PSD-95'in ekspresyon seviyesinin; Ko-sinaptik kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0.0001$). Ko-kültür *SNCA* grubundaki PSD-95'in ekspresyon seviyesinin Ko-sinaptik kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0.0001$). Ko-sinaptik Kontrol grubundaki PSD-95'in ekspresyon seviyesinin Ko-kültür Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.0001$). (Şekil 4-14).




**Şekil 4-14: Ko-Kültürden elde dilen total ve sinaptik protein izolasyonları sonucu tüm gruplarda PSD-95 proteinin ekspresyon seviyesi.**

(* p<0.0001, Ψ p<0.0001, ϕ p<0.0001)

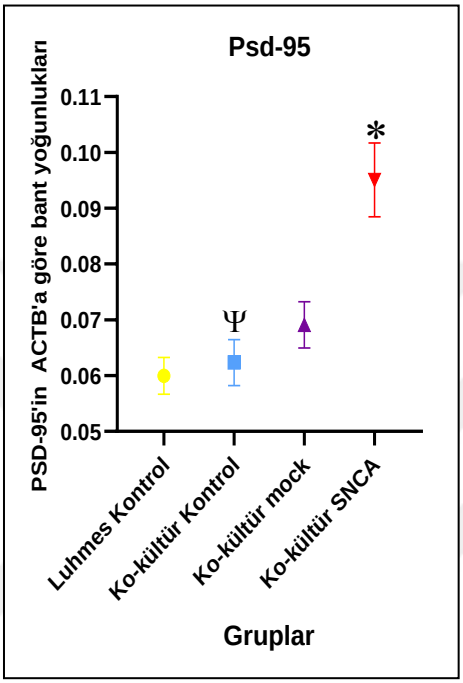
- PDS-95 ekpresyonu tespit edilemeyen gruplar dahil edilmemiştir.




**Şekil 4-15: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında PSD-95 proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.**

ACTB (Beta Aktin) antikoru Referans protein olarak kullanılmıştır.

Western Blot görüntülemesinin (Şekil 4-15) analiziyle elde edilen sonuçta; Ko-kültür kontrol grubundaki PSD-95'in ekspresyon seviyesinin; Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.01$). Ko-kültür *SNCA* grubunda ise PSD-95'in ekspresyon seviyesi Ko-kültür kontrol grubuna ve Ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.0001$) (Şekil 4-16).



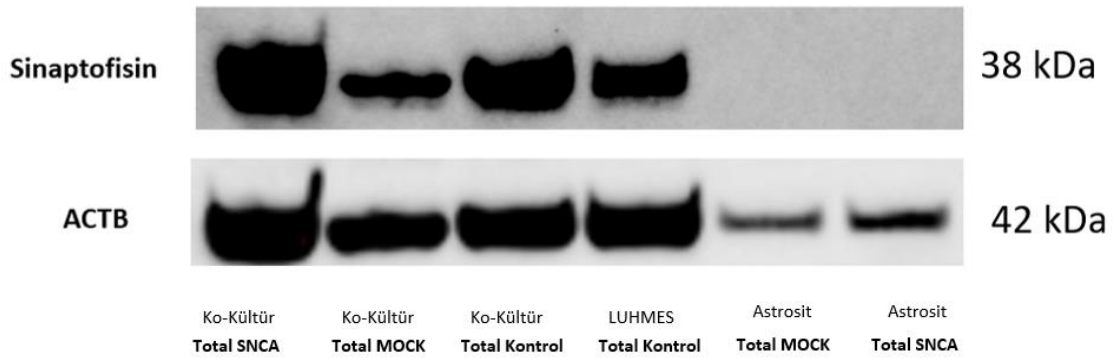

**Şekil 4-16: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında PSD-95 proteinin ekspresyon seviyesi.**

(* $p<0.01$, Ψ $p<0.0001$)

- PDS-95 ekpresyonu tespit edilemeyen gruplar dahil edilmemiştir.

### 1.19.2. Sinaptofisin'in Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

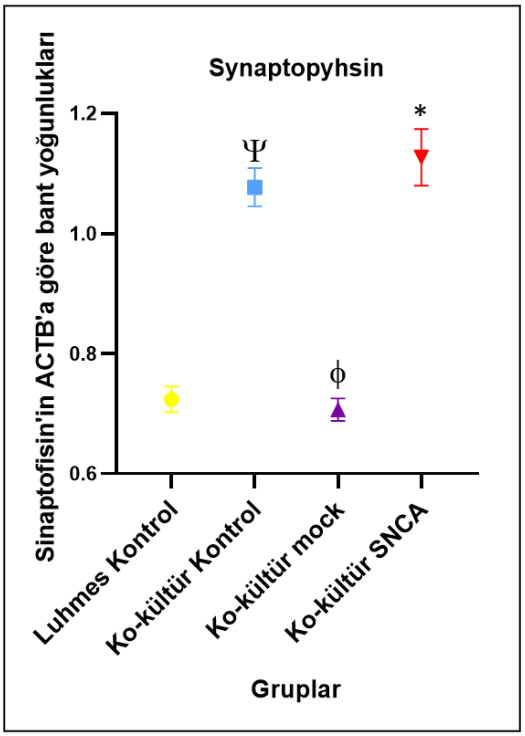
İnsan astrosit hücrelerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildi ve tüm deney gruplarında total protein izolasyonu yapılarak Sinaptofisin proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlendi (Şekil 4-17, Şekil 4-18).




**Şekil 4-17: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Sinaptofisin proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.**

ACTB (Beta Aktin) antikoru Referans protein olarak kullanılmıştır.

Western Blot görüntülemesinin (Şekil 4-17) analiziyle elde edilen sonuçta; Ko-kültür *SNCA* grubundaki Sinaptofisin'in ekspresyon seviyesinin; Luhmes Kontrol grubu ve Ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.0001$). Ko-kültür kontrol grubunda Sinaptofisin'in ekspresyon seviyesi Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken, Ko-kültür MOCK grubunda ise Ko-kültür kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$) (Şekil 4-18).



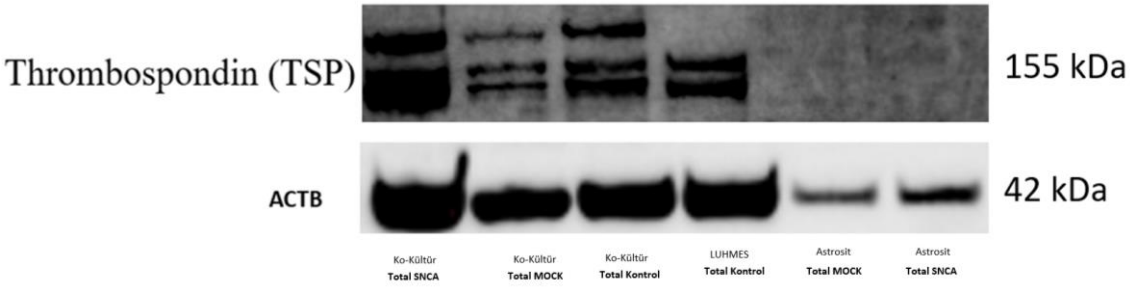

**Şekil 4-18: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Sinaptofisin proteinin ekspresyon seviyesi.**

(* p<0.0001, Ψ p<0.0001, ϕ p<0.0001)

- Sinaptofisin ekpresyonu tespit edilemeyen gruplar dahil edilmemiştir.

### 1.19.3. Thrombospondin (TSP)'in Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

İnsan astrosit hücrelerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildi ve tüm deney gruplarında total protein izolasyonu yapılarak Thrombospondin (TSP) proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlendi (Şekil 4-19, Şekil 4-20).

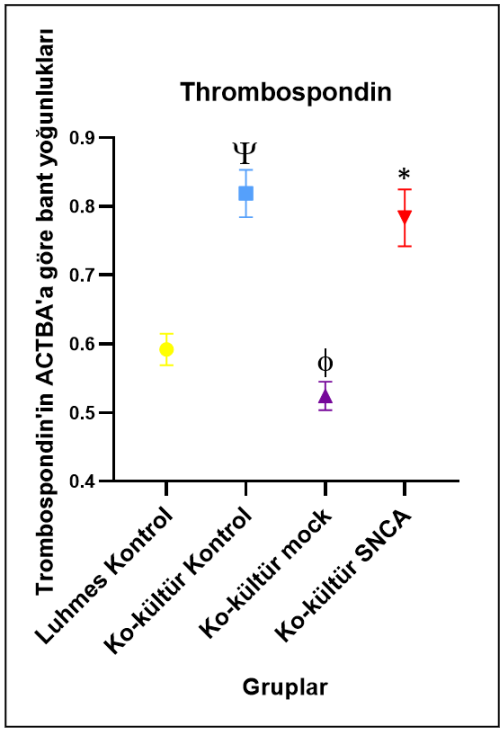



**Şekil 4-19: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Thrombospondin (TSP) proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.**

ACTB (Beta Aktin) antikoru Referans protein olarak kullanılmıştır.

Western Blot görüntülemesinin (Şekil 4-19) analiziyle elde edilen sonuçta; Ko-kültür *SNCA* grubundaki Thrombospondin'in ekspresyon seviyesinin; Luhmes Kontrol grubu ve Ko-

kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.0001$). Ko-kültür kontrol grubunda Thrombospondin'in ekspresyon seviyesi Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken, Ko-kültür MOCK grubunda ise Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.01$) (Şekil 4-20).



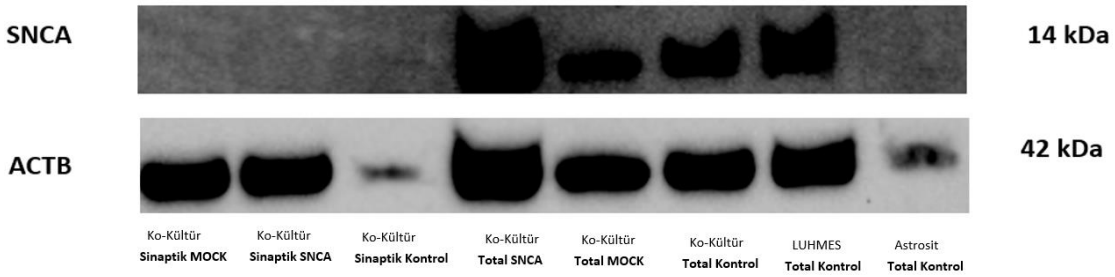

**Şekil 4-20: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında Thrombospondin (TSP) proteinin ekspresyon seviyesi.**

(* $p<0.0001$, Ψ $p<0.0001$, ϕ $p<0.01$)

- Thrombospondin ekpresyonu tespit edilemeyen gruplar dahil edilmemiştir.

### 1.19.4. *SNCA*'nın Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

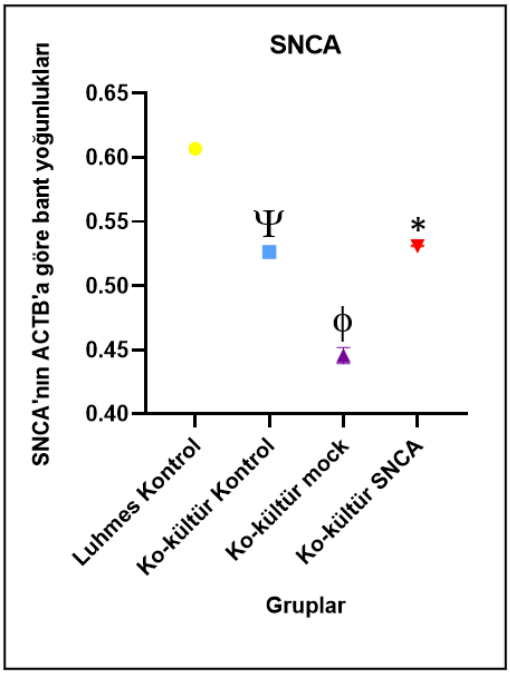
İnsan astrosit hücrelerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildi ve tüm deney gruplarında total ve sinaptik protein izolasyonu yapılarak *SNCA* proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlendi (Şekil 4-21, Şekil 4-22).




**Şekil 4-21: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında *SNCA* proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.**

ACTB (Beta Aktin) antikoru Referans protein olarak kullanılmıştır.

Western Blot görüntülemesinin (Şekil 4-21) analiziyle elde edilen sonuçta; Ko-kültür *SNCA* grubundaki *SNCA*'nın ekspresyon seviyesinin; Luhmes Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken; Ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$). Ko-kültür kontrol grubunda *SNCA*'nın ekspresyon seviyesi Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı; Ko-kültür MOCK grubunda *SNCA*'nın ekspresyon seviyesinin ise Luhmes kontrol grubuna ve Ko-kültür kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) (Şekil 4-22).



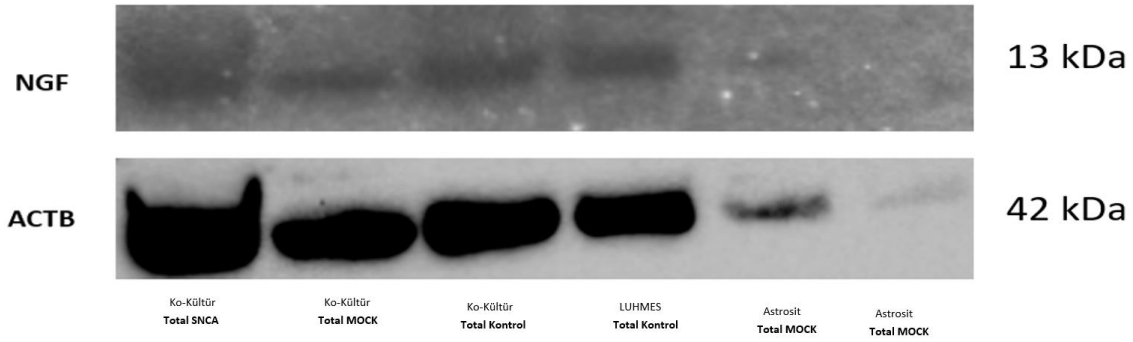

**Şekil 4-22: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında *SNCA* proteinin ekspresyon seviyesi.**

(* $p<0.0001$, Ψ $p<0.0001$, ϕ $p<0.0001$)

- SNCA ekpresyonu tespit edilemeyen gruplar dahil edilmemiştir.

### 1.19.5. MSS'nin Trofik Faktörlerinden NGF'nin Ekspresyon Seviyesindeki Değişimler

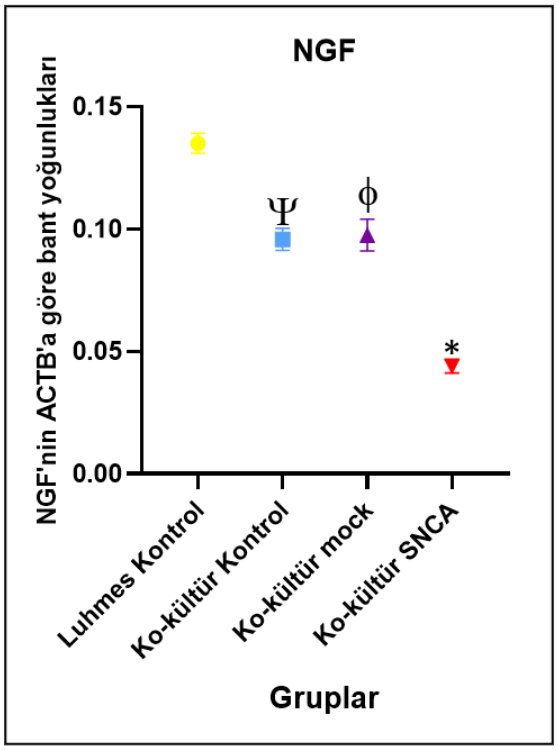
İnsan astrosit hücrelerinin *SNCA* genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildi ve tüm deney gruplarında total protein izolasyonu yapılarak NGF proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlendi (Şekil 4-23, Şekil 4-24).




**Şekil 4-23: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında NGF proteinin ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.**

ACTB (Beta Aktin) antikoru Referans protein olarak kullanılmıştır.

Western Blot görüntülemesinin (Şekil 4-23) analiziyle elde edilen sonuçta; Ko-kültür *SNCA* grubundaki NGF'nin ekspresyon seviyesinin; Luhmes Kontrol grubu, Ko-kültür kontrol grubu ve Ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.000$, $p<0.0001$). Ko-kültür kontrol grubunda NGF ekspresyon seviyesi Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı; Ko-kültür MOCK grubunda da NGF'nin ekspresyon seviyesinin ise Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$) (Şekil 4-24).




**Şekil 4-24: Ko-Kültürdeki hücre gruplarında NGF proteinin ekspresyon seviyesi.**

(* p<0.0001, Ψ p<0.0001, ϕ p<0.0001)

- NGF ekpresyonu tespit edilemeyen gruplar dahil edilmemiştir.

# 5. TARTIŞMA

Astrositler düzgün bir sinaps yapısının oluşturulması için gereklidir. Astrositlerde ortaya çıkan fonksiyon bozuklukları, sinaptik bağlantıların kaybına ve nörodejenerasyona neden olur. Astrositler, trofik faktörlerin en önemli kaynağıdır. Trofik faktörler nöron sağkalımı ve sinaptik bağlantıların oluşumunda oldukça önemli rollere sahiptir. Sinükleopatilerin ana patolojik bileşeni olan α-sinükleinin aşırı ekspresyonunun veya mutasyonunun yarattığı nöronal toksisitenin; otofaji, ubikitin-proteazom sistemi, ER stresi, oksidatif stres, ER'den Golgi'ye transport (Martin-Jimenez, Garcia-Vega ve ark. 2017), Golgi homeostazı, presinaptik trafik, endositoz, erken ve geç salgı yolaklarında bozulmalara yol açtığı düşünülmektedir (Colla, Coune ve ark. 2012). Bu mekanizmalar aynı zamanda, trofik faktörlerin üretimine ve salınmasına aracılık eden temel yolaklardır. Bu bilgiler, α-sinüklein patolojisinin trofik faktör sentezini de etkilediğine işaret etmektedir (Alberdi, Wyssenbach ve ark. 2013).

Glial hücrelerin önemli bir popülasyonunu oluşturan astrositler, gelişim sırasında sinaps oluşumunun ve işlevinin önemli düzenleyicileridir. Nöronal sinapslar, iki nöron arasındaki sinyallerin aktarıldığı temas bölgeleridir. Nöronal sinapsların sadece pre- ve post-sinaptik nöronlardan oluşmadığı, aynı zamanda birçok durumda bir astrosit uzantısı ile temas ettiği keşfedilmiştir. Astrositler tarafından salgılanan sinyal moleküllerine ek olarak, nöronların astrositlerle doğrudan teması, sinaps oluşumu için gerekli görünmektedir. Ayrıca, astrositler sinapsların işlevselliğini birçok yönden düzenler. İnsan beynindeki nöronların pre-sinaptik ve post-sinaptik sonlanmaları ile temas kurar, bunları örter ve onlarla iletişim kurarak üçlü sinaps oluştururlar (Garcia-Segura ve Melcangi 2006).

Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmada, α-sinükleini aşırı eksprese eden astrositler kullanılarak oluşturulan nöron-glia ko-kültürlerinde astrosit kökenli α-sinükleinin 1) nöronlara taşınıp taşınmadığını ve nöronal sitotoksisiteyi tetikleyip tetiklemediğini, 2) sinaptik fonksiyonu etkileyip etkilemediğini, 3) üçlü sinapsta NGF ekspresyon seviyesini değiştirip değiştirmediğini saptamayı amaçladık. Çalışmamız sonucunda, astrosit kaynaklı α-sinükleinin nörona farklılaştırılmış LUHMES hücrelerine göç ettiği, α-sinüklein patolojisinin nöronal sitotoksisiteyi arttırdığı, sinaps oluşumunda rol alan thrombospondin, sinaptofizin ve PSD-95 protein seviyelerini arttırdığı ve NGF ekspresyon seviyesini azalttığını belirledik.

α-sinüklein (α-syn) proteini küçük, çözünür ve yüksek oranda korunmuş olup, 140 amino asit uzunluğundadır (Jakes ve ark. 1994). Çevreye bağlı olarak farklı konformasyonları benimseme yeteneğine sahiptir ve lipitler gibi diğer ligandlarla kolayca etkileşime girer (Uversky 2003). α-sinüklein normalde MSS'de, ağırlıklı olarak presinaptik sinir terminallerinde lokalizedir ve sinaptik bakım, mitokondriyal homeostaz, proteazom fonksiyonu, dopamin metabolizması ve şaperon aktivitesi dahil olmak üzere önemli düzenleyici roller oynar (Uversky 2003). α-sinükleinin kesin işlevi hala bir tartışma konusu olsa da, sinaptik veziküllerin geri dönüşümünde rol oynadığı düşünülmektedir (Burre ve ark. 2010). Özellikle α-sinüklein, sinaptik vezikül salınımını inhibe eder ve SNARE kompleksi aracılı lipit membran füzyonunu bozar (Abeliovich ve ark. 2000). Yakın tarihli bir çalışma, α-sinükleinin sinaptik vezikül havuzlarını kümelemek için VAMP2 ile etkileşime girerek geri dönüşümlerini azalttığını göstermiştir (Sun ve ark. 2019). α-sinüklein, sitozoldeki katlanmamış form ile zarlara bağlandığında α-sarmal bakımından zengin bir form arasında dengede bulunur. Şaşırtıcı bir şekilde, fizyolojik koşullar altında, α-sinükleinin ayrıca agregasyona karşı daha dirençli olabilen sarmal katlanmış tetramerler olarak var olduğu tarif edilmiştir, ancak bu bulgular tartışmalı olmaya devam etmektedir (Bartels ve ark. 2011). Hastalık koşullarında, hastaların beyinlerinde biriken β-yaprak bakımından zengin amiloid fibrilleri oluşturur (Burre ve ark. 2014). Kümelenme işleminde, doğal olarak katlanmamış α-sinüklein monomerleri, patolojik oligomerlere ve ardından çözünmeyen fibrillere kendi kendine kümelenebilir. İlginç bir şekilde, α-sinükleinin dopamin ile etkileşimi, oksidasyonuna ve α-sinüklein protofibrillerinin birikmesine yol açar ve bu da dopaminerjik nöronların artan hassasiyetini açıklayabilir (Conway ve ark. 2001). Nöropatolojik kanıtlara ek olarak, genetik kanıtlar, α-sinükleini PH ve diğer sinükleinopatilerin patogenezi ile ilişkilendirir. α-sinükleini kodlayan gendeki nokta mutasyonlarının yanı sıra genomik duplikasyonlar veya triplikasyonlar, ailesel PH formları ile sonuçlanır (Chartier-Harlin ve ark. 2004). SNCA genindeki yanlış anlamlı mutasyonlar, otozomal dominant PH (A53T, A30P, E46K, H50Q, G51D ve A53E) ile ilişkilendirilmiştir. Mutasyonlar, bu bölgenin α-sinüklein işlev bozukluğuna katkısını düşündüren, zar bağlama alanı içinde kümelenmiştir (Pasanen ve ark. 2014).

Şaşırtıcı bir şekilde, α-sinüklein sitozolik bir protein olarak kabul edilmesine rağmen tükürük, plazma, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kırmızı kan hücreleri dahil olmak üzere birçok insan biyosıvısında bulunur (Wang ve ark. 2015). Klasik olmayan salgı yolaklarının, α-sinükleinin hücrelerden salınmasına dahil olduğu öne sürülmüştür. Bunlar hem pasif hem de aktif mekanizmaları içerir (Lee ve ark. 2008). Pasif mekanizmalar, hücre zarından difüzyonu ve hasarlı hücre zarlarından salımı içerir. α-sinüklein lipit çift katmanını geçemediğinden, bu işlem muhtemelen bir zar translokatörüne dayanır. Son zamanlarda, α-sinükleinin bitişik hücreler arasında bulunan boşluk bağlantıları yoluyla da aktarılabileceği açıklanmıştır (Reyes ve ark. 2019). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, 14-3-3 proteinlerini, α-sinüklein iletiminin potansiyel düzenleyicileri olarak tanımlamıştır ve işlev bozukluğu altında, bunların α-sinüklein oligomerizasyonuna aracılık edebileceklerini öne sürmüştür (Wang ve ark. 2018). Ayrıca, diğer α-sinüklein düzeneklerinin oluşumu veya translasyon sonrası modifikasyonlar, endojen α-sinükleinin pasif olarak hücreden kaçmasını önleyebilir. Hücresel α-sinükleinin bir kısmı, klasik olmayan ER/Golgi'den bağımsız ekzositoz yoluyla aktif olarak salgılanabilir. α-sinükleinin katlanma durumuna bağlı salınımı birkaç hücre tipinde gösterilmiştir ve büyük olasılıkla hücredeki işlevleriyle ilişkilidir (Rostami ve ark. 2017). Bu süreç ayrıca oksidatif stres (Bae ve ark. 2013), stres koşulları (Jang ve ark. 2010) veya dopamin tedavisi altında gerçekleşir (Lee ve ark. 2011). İlginç bir şekilde, hücre ortamına salınan α-sinüklein miktarı, hücre içi seviyelerle ilişkilidir.

Eksozomlar, multiveziküler cisimlerin (MVB) plazma zarı ile füzyonundan üretilen ve hücre dışı boşluğa salınmalarıyla sonuçlanan küçük veziküllerdir (Colombo ve ark. 2013). Eksozomlar, nöronlar, astrositler ve mikroglia dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden salgılanır ve sinapslarda ve membran proteinlerinin hücreler arası değişiminde düzenleyici bir işleve sahiptirler (Faure ve ark. 2006). İlginç bir şekilde, vesiküler α-sinüklein, sitoplazmik α-sinükleine göre kümelenmeye daha yatkındır. α-sinükleinin eksozomlar tarafından kalsiyuma bağımlı bir şekilde salınabileceği açıklanmıştır. Stres koşulları, α-sinükleinin veziküllere translokasyonunu arttırır, böylece daha sonra hücre dışı boşluğa salınmasına neden olur (Jang ve ark. 2010). Ayrıca, mikroglial hücrelerden salınan eksozomlar, nöronlara α-sinüklein iletimi sürecinde aktif bir rol oynayabilir. Bu süreç, proinflamatuar sitokinlerin salınmasıyla daha da geliştirilerek protein agregasyonuna ve yayılmasına neden olur (Courte ve ark. 2020).

Tünel açma nanotüpleri (TNT'ler), yeni bir tür hücreler arası iletişim mekanizmasını temsil eder (Abounit ve ark. 2016). Bu membranöz yapılar, komşu hücreler arasındaki iletişime

aracılık eder ve patolojik α-sinüklein agregatlarının transferinde rol oynar. Bununla birlikte, bu yapıların aslında in vivo olarak farklı hücre tiplerinin bağlantısına aracılık edip etmediği belirsizliğini korumaktadır (Ahn ve ark. 2006). Pasif difüzyon konvansiyonel endositoz, plazma zarından doğrudan penetrasyon ve reseptör aracılı endositoz, α-sinükleinin hücre içine alınmasında yer alan yolaklar olarak önerilmiştir. α-sinüklein salgılanmasının nedenleri, prion benzeri yayılma hipotezi bağlamında hala açık bir soru olmaya devam etmektedir (Hudak ve ark. 2019; Bras ve ark. 2021).

Hücre vezikül trafiğinin bozulması, belirli proteinlerin bozunmasına neden olur ve ayrıca nöronlar üzerinde toksik bir etki gösteren anormal protein agregasyonuna yol açar (Mazzulli ve diğerleri, 2016). Rab GTPazlar (Rabs), hücre içi trafik olaylarında temel işlevleri yerine getirir (Wilson ve ark. 2014; Lesage ve ark. 2015; Mata ve ark. 2015; Shi ve ark. 2016). İnsan genomunda 60'tan fazla üyesi ve mayada 11 üyesi bulunan Rab'lar, vezikül trafiğinde moleküler "anahtarlar" olarak görev yapan Ras benzeri GTPazların en büyük alt ailesidir (Pereira-Leal ve Seabra, 2001). Organeller arasındaki etkileşimleri düzenleyerek ve hücresel homeostazı sürdürerek veziküllerin oluşumu, olgunlaşması, taşınması, bağlanması ve füzyonunda temel işlevleri yerine getirirler (Binotti ve diğerleri, 2016). Fagozomlar, lizozomla ilgili organellerdir ve büyük ölçüde hem Rab5 hem de Rab7 tarafından düzenlenir. SNARE proteinleri, memeli hücrelerinde hücre içi membran füzyonlarının önemli bileşenleridir. Rab3 ve Rab27b, sinaptik vezikül ekzositozuna katılırken; Rab27b ayrıca presinaptik sinir terminalinde sinaptik vezikül geri dönüşümünde ek bir role sahiptir (Underwood, 2020). Rab5, klatrin aracılı endositoz yoluyla sinaptik vezikül bileşenlerinin biyogenezine ve alınmasına katılır. Rab3 protein ailesinin alt üyeleri (Rab3a, Rab3b ve Rab3c), beyindeki en bol bulunan küçük GTPazları temsil eder. Bu alt üyeler özellikle sinaptik veziküllere lokalizedirler ve nöronlarda yüksek oranda eksprese edilirler. Rab3a'nın; nöronlarda nörotransmiter salınımının düzenlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Gurkan, 2005). Otofaji ile ilişkili Rab proteinleri de sinaptik veziküllerde (örneğin, Rab26 ve Rab33) tanımlanmıştır ve bu durum, hasarlı sinaptik vezikül proteinlerinin otofaji yoluyla ortadan kaldırılmasında rol oynadıklarını düşündürmektedir. SV'lerin klatrin aracılı yolakla geri dönüşümü muhtemelen bir endozomal ara ürün yoluyla gerçekleşir. Endozomal Rab proteinlerinden olan Rab5'in sinaptik vezikül geri dönüşümü ve SV morfolojisinde doğrudan yer aldığı, Rab5 mutasyonlarının SV geri dönüşümünü bozduğunu göstermiştir (Wucherpfennig, 2003). Endozomal yolaktaki anormallikler, Alzheimer, Huntington ve Parkinson hastalığı gibi yaygın olarak bilinen bazı

nörodejeneratif hastalıklarda bulunur. Örneğin, Rab5'in, eksojen α-sinükleinin hücre içine alınmasında rol oynadığı düşünülmektedir ve yapısal olarak aktif Rab5 veya efektörü Rabaptin'in aşırı ekspresyonu, kültüre edilmiş nöronlarda Lewy cisimciklerine benzeyen hücre içi inklüzyonlarının oluşumuna yol açtığı saptanmıştır (Ravikumar, 2008) Rab7, α-sinüklein kümelerinin temizlenmesini indükler. α-sinüklein kümeleri, otofago-lizozomal yolakla bozulur (Bucciet ve ark. 2000; Gutierrezet ve ark. 2004; J€ageret ve ark. 2004). Rab7'nin geç endozomların ve otofagozomların transportunu düzenlediği gösterildiğinden, Rab7'yi aşırı eksprese etmenin PH'ye faydalı olabileceğine dair hipotez öne sürülmüştür. Bu hipotezi test etmek için yapılan çalışmada, HEK-293T hücrelerinde ve Drosophila'da α-sinükleinin patojenik A53T mutantını eksprese edilmiştir. Rab7'in aşırı ekspresyonu, α-sinüklein kümelerini ve α-sinüklein protein miktarını içeren hücrelerin yüzdesini düşürdüğü saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar; Rab7'in dopaminerjik nöronlarda koruyucu otofagozom benzeri organellerin biyogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Dinter, 2016).

α-sinükleinin aşırı ekspresyonunun, maya ve diğer organizmalarda ER-Golgi seviyesinde veziküler trafiğe zarar verdiği (Cooper ve ark. 2006), ER stresinin indüksiyonu, Golgi parçalanması ve lizozomal enzimlerin tükenmesiyle ER proteinlerinin birikmesine neden olduğu gösterilmiştir (Oaks ve ark. 2013; Mazzulli ve ark. 2016). Ayrıca Rab-11a vezikül trafiğinde ve geri dönüşümünde α-sinüklein için önemli bir rol oynamaktadır (Breda ve diğerleri, 2015). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, kültür ortamına saflaştırılmış rekombinant α-sinükleinin eklendiğinde, hücre dışı α-sinükleininin rab5a'ya bağımlı bir şekilde hücreler tarafından alındığını göstermiştir. α-sinükleininin hücreden hücreye salınımı ve alımı, "prion benzeri" yayılma için önemli işlemler olarak kabul edilir (Kordower, 2008) α-sinüklein bir sinyal peptidine sahip değildir ve klasik ER-Golgi sekretuar yolu ile salınmaz. α-sinükleinin, ekzozomal, yanlış katlanma ile ilişkili protein sekresyonu ve lizozomal yolaklar dahil olmak üzere klasik olmayan endozomal yolaklardan salındığına dair kanıtlar vardır (Tsunemi, 2019). Rab39b ve Rab32'deki mutasyonlar, sırasıyla erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı PH'nin otozomal resesif formlarına neden olur. Rablar, α-sinüklein iletiminde potansiyel olarak rol oynayan otofajik, ekzositotik ve endositotik yolakları düzenler. Rab1, 7, 8 veya 11'in aşırı ekspresyonu, α-sinüklein toksisitesine karşı koruyucudur ve bu Rab'lar, PH modellerinde α-sinüklein agregat oluşumunda rol oynar (Breda, 2015).

Yapılan çalışmalar, α-sinükleinin direkt olarak olarak nörondan astrositlere göç edebildiğini göstermiştir (Lee, suk ve ark 2014). Aşırı α-sinüklein eksprese eden nöronlarda yapılan bir çalışma, nöronların α-sinükleini ekzositoz yoluyla ekstraselüler alana saldığını ve astrositlerin de nöronal kökenli α-sinükleini endositoz ile hücre içine aldığını göstermiştir (Halliday ve Stevens 2011). Domenico ve ark. yakın zamanda, lösin açısından zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2) mutasyonları olan ailesel PD hastalarından elde edilen iPS hücrelerinden farklılaştırılan astrositlerde a-sinüklein birikimlerini saptamışlar ve ardından bu toksik birikimlerin astrositlerden dopaminerjik nöronlara geçebildiğini göstermişlerdir (di Domenico, 2019). Çalışmamızda, insan astrositlerinin GFP işaretli SNCA genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirilmiş ve GFP işaretli α-sinükleinin transfekte edilmemiş LUHMES hücrelerinde lokalize olduğu saptanmıştır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular, α-sinükleinin astrositlerden nörona farklılaştırılmış LUHMES hücrelerine transportunun Domenico ve ark.'nın çalışmasını destekler şekilde mümkün olduğunu göstermiştir. Ancak sonuçlarımızın Domenico ve ark'nın çalışmasından en büyük farkı kullandığımız astrositlerin herhangi bir mutasyon taşımayan primer insan astrositleri olmasıdır. Bu hücrelerde sadece α-sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmıştır. Bu durum α-sinükleinin herhangi bir mutasyona ihtiyaç duymadan da transportunun mümkün olduğunu göstermektedir. Diğer yandan bu proteini oldukça az üreten astrositlerin α-sinüklein aşırı ekspresyonu ile nörotrofik faktör salınımını arttırdığı daha önce yaptığımız çalışma ile gösterilmiştir (Sengul ve ark. 2020). Bu bulgular, daha önceki çalışmamızı destekler şekilde, sinaptik vezikül oluşumunda yer alan α-sinükleinin nörotrofik faktör salınımına etki ettiğini, sinaptik yarığa birlikte salınma olasılığının olduğunu ve astrosit kökenli α-sinükleinin nöronlara göç ettiğini göstermektedir.

Astrositler, memeli beyninde en bol bulunan glial hücrelerdir (Kettenmann ve ark. 2008). Bu glial hücreler 1800'lerin sonlarında ilk kez tanımlandığında, karmaşık morfolojileri onları gözlemleyenlerin dikkatini çekmiş ve MSS'deki altta yatan işlevlerini sorgulamıştır. Astrositlerin başlangıçta beyni bir arada tutan ve beyin mimarisi ve nöron dağılımı için bir matris sağlayan inert hücreler olduğu düşünülüyordu (Volterra ve ark. 2005). Daha sonra astrositler, nöronal işlevi sürdürmek için gerekli destek hücreleri olarak görüldü. Bu işlevler arasında iyon (özellikle K+ tamponlama) ve su homeostazının yanı sıra nörotransmitter alımı, geri dönüşümü ve salımı yer alır (Mederos ve ark. 2018). Daha yakın zamanlarda, astrositler,

sinaps oluşumunu, ortadan kaldırılmasını ve işlevini doğrudan düzenleyen, sinapsta aktif oyuncular olarak kabul edilmiştir. Kapsamlı dallanma ağları sayesinde, sıçan astrositleri yaklaşık 100.000 sinapsla iletişim kurabilir (Halassa ve ark. 2007) ve insan astrositleri 2 milyona yakın sinapsla iletişim kurabilir. Bu nedenle, beyindeki birçok sinaps, yalnızca nöronal elemanlardan, yani presinaptik bir akson ve postsinaptik dendritten oluşmaz, aynı zamanda sinapsta kritik yapısal ve işlevsel roller oynayan perisinaptik bir astrosit uzantısıyla yan yana gelir. Bu hücresel ilişkiyi tanımlamak için, "üçlü sinaps" terimi Haydon ve arkadaşları tarafından türetilmiştir (Araque ve ark. 1999).

Sinaptogenezin, bir presinaptik akson ve bir hedef postsinaptik dendritin birbiriyle temas etmesiyle başladığı düşünülmektedir (Schikorski ve ark. 1997). Sinapstan geçen hücre adezyon molekülleri daha sonra pre ve postsinaptik bölümleri birbirine bağlayarak bunların stabilizasyonunu ve büyümesini sağlar. Presinaptik terminal, nörotransmitter dolu vezikülleri ve vezikül salma mekanizmasını biriktirirken, postsinaptik terminal, nörotransmitter reseptörlerini bağlayan çeşitli proteinler içerir. Uyarıcı sinapslar söz konusu olduğunda, postsinaptik terminal genellikle morfolojik olarak ince, filopodia benzeri bir yapıdan mantar benzeri bir şekle olgunlaşan dendritik bir omurgaya lokalize edilir. Dendritik bir omurganın bu yapısının, verimli nörotransmisyon ve sinyal işlemeyi en üst düzeye çıkarmak için önemli olduğu varsayılmaktadır (Adrian ve ark. 2014). Fonksiyonel olarak olgunlaşmamış sinapslar, sadece NMDA içerdikleri ve AMPA reseptörlerinden yoksun oldukları için genellikle post-sinaptik olarak sessizdirler, AMPA reseptörü alt birimlerini topladıkça olgunlaşırlar ve uyarıcı sinapsın elektriksel olarak aktif olmasına izin verirler (Hama ve ark. 2004). Sinapsların oluşumu ve olgunlaşması, astrositlerin doğumu, morfolojik ve fonksiyonel olgunlaşması ile yakından örtüşen bir zaman diliminde gerçekleşir. Ayrıca, sinaptogenez, astrositlerin doğrudan katılımı olmadan düzgün bir şekilde ilerlemez. Yapılan önemli çalışmalarda, saflaştırılmış sıçan RGC nöron kültürlerine astrosit ortamının eklenmesinin, RGC'ler tarafından oluşturulan sinapsların sayısında güçlü bir artışa neden olmanın yanı sıra bu sinapsların fonksiyonel olgunlaşması için yeterli olduğu gösterilmiştir (Pfrieger ve ark. 1997). Bu sonuçlar, astrositlerin sinaptojenik süreçleri yönlendiren faktörleri salgıladığını göstermektedir (Ullian ve ark. 2001).

Trombospondinler (TSP), astrositler tarafından salgılanan sinaptojenik faktörlerdir ve in vitro olarak RGC'ler arasında yapılan sinapsların sayısını artırmak için kritik öneme sahiptir (Christopherson ve ark. 2005). TSP'ler (memelilerde beş farklı gen tarafından yapılan beş izoform vardır), hücre yüzeyi reseptörleri, sitokinler ve diğer ECM proteinleri ile etkileşime girerek birçok vücut sisteminde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini değiştiren büyük, oligomerik ECM proteinleridir (Adams 2001). 1'den 4'e kadar olan TSP'ler, MSS'de eksprese edilir ve bu TSP'ler, nöronlara kıyasla astrositlerde daha çoktur. İlginç bir şekilde, TSP1 ve TSP2 ekpsesyonunun zirvesi, kemirgenlerde doğum sonrası uyarıcı sinaptogenezin, P5 ila P7'nin başlamasıyla çakışır; oysa TSP3 ve TSP4, yetişkinlikte astrositler tarafından eksprese edilir (Zhang, Chen, ve ark. 2014). Astrosit tarafından salgılanan sinaptojenik faktörleri belirlemeye yönelik bir aday taramada, Christopherson, Ullian ve meslektaşları TSP'leri RGC nöronal kültürlerine uygulamış ve TSP1 veya TSP2'nin uyarıcı sinaptik yapıların sayısını büyük ölçüde artırdığını bulmuşlardır (Ullian ve ark. 2001). Elektron mikroskobu analizleri, TSP uygulaması ile indüklenen sinapsların, RGC'ler besleyici bir astrosit tabakasına maruz bırakıldığında oluşanlarla yapısal olarak aynı olduğunu ortaya çıkardı; bununla birlikte, TSP'nin neden olduğu sinapslar, postsinaptik AMPA reseptörlerinden yoksun oldukları için sinaps sonrası sessizdir. Bununla birlikte, bu sinapslar, glutamatın salınması ve geri alınması yeteneğine sahiptir. Nakavt fareleri kullanarak hem TSP1 hem de TSP2'nin in vivo erken sinaps oluşumu için gerekli olduğunu gösterdiler, çünkü TSP1 ve TSP2 devre dışı bırakılmış fareler, P8 ve P21'de intrakortikal sinapsların sayısını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Christopherson ve ark. 2005). Gelişimsel rollerine ek olarak, TSP'ler yetişkin MSS'de sinaptik yapı ve işlevi de düzenleyebilir. Bununla uyumlu olarak, TSP1/β-integrin sinyali, glisinerjik reseptörleri yukarı regüle ederek ve AMPA reseptörü yüzey ekspresyonunu azaltarak yetişkin omurilik kültürlerinde eksitasyon/inhibisyon dengesini düzenler (Hennekinne ve ark. 2013). Yapılan çalışmalarda, yetişkin striatumdaki astrosit aracılı TSP1/α2δ-1 sinyalinin uyarıcı sinaps aktivitesini düzenlediği gösterildi. Nöronlar, astrositik GABAB reseptörlerine bağlanan GABA'yı serbest bırakarak hücre içi kalsiyum sinyallemesinde ve astrositlerde TSP1 mRNA bolluğunda bir artışa neden olur. TSP1 gen ekspresyonundaki bu artış, yetişkin striatumda artan uyarıcı sinaps oluşumu ve işlevi ile ilişkilidir, orta dikenli nöron ateşlemesini arttırır ve bu etkiler gabapentin tedavisi ile bloke edilebilir. Bu uyarımın sonucu, farelerde hiperaktivite ve azalmış dikkati andıran davranışsal sonuçlardır (Nagai ve ark. 2019). Yapılan bir çalışmada; gelişmekte olan beyinde TSP1 ve TSP2'nin eksprese edilip edilmediğini belirlemek için, sinaptogenezin büyük kısmının meydana geldiği doğum sonrası beyinde TSP1'e karşı

antiserum ile işaretlenmiştir. TSP1/2 immünoreaktivitesi, P8'de korteks, superior kollikulus ve retina boyunca gözlenmiştir ve astrositler tarafından salgılanan bir matriks molekülü için beklendiği gibi yaygın göründüğü saptanmıştır. İlginç bir şekilde, TSP1/2 immünoreaktivitesi, hem kortekste hem de superior kollikulusta sinaptik işaretleyici sinaptotagmin ile kolokalize olan ayrı noktalarda da görülmüştür (Lu ve ark. 2010). Ayrıca TSP1/2'nin, doğum sonrası MSS'de sinapsları örten ince astrosit uzantılarının bir belirteci olan ezrin ile kapsamlı ko-lokalizasyonu da bulunmuştur. İlginç bir şekilde, TSP1/2 immünoreaktivitesi, bu beyin bölgelerinde P21'de büyük ölçüde ortadan kalkmıştır; bu, TSP1 ve TSP2'nin geçici bir işleve hizmet ettiğini ve yetişkinlerde sinapsların bakımı için gerekli olmadığını düşündürür. Son olarak, hem TSP1 hem de TSP2'den yoksun fareler, birçok MSS bölgesinde önemli ölçüde azalmış sinaps sayısına sahiptir; bu, bu TSP'lerin in vivo olarak normal MSS sinaptogenezini desteklemeye yardımcı olduğunu gösterir (Wang ve ark. 2012). Yaptığımız ko-kültür çalışmaları sonunda western blot görüntülemesinin analiziyle elde ettiğimiz sonuçlarda; ko-kültür kontrol grubunda Thrombospondin'in ekspresyon seviyesinin Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, ko-kültür grubundaki Thrombospondin artışının astrositler tarafından kaynaklandığını bunun da muhtemelen MSS sinaptogenezini teşvik etme amaçlı olduğunu göstermektedir. Ek olarak, ko-kültür SNCA grubundaki Thrombospondin'in ekspresyon seviyesinin; ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Astrositlerde α-sinüklein aşırı ekspresyonunun Thrombospondin üzerine etkisine ilişkin literatürde herhangi bir bilgi yer almamaktadır. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz bu bulgular, α-sinükleinin bir şekilde Thrombospondin seviyesini arttırarak sinaps oluşumunu etkiliyor olabileceğine işaret etmektedir. Ancak bu artış, artan membran hasarı ile birlikte değerlendirildiğinde kaybedilen sinapsların geri kazanılmasına yönelik bir cevap olabileceği de düşünülebilir.

Nöronal uyarılabilirlik, tek bir nöron tarafından alınan eksitatöre karşı inhibitör (E/I) temaslarının sayısıyla düzenlenen bir süreç olan, uyarıcı ve engelleyici sinyallerin toplamına dayanır (Li ve ark. 2006; Schummers, 2002; Voytenko ve Galazyuk, 2006). Beyindeki uyarıcı sinaptik iletime ağırlıklı olarak nörotransmiter glutamat aracılık ederken, inhibitör iletime esas olarak nörotransmiter gama amino bütirik asit (GABA) aracılık eder. İlgili her bir nörotransmitteri içeren sinapslar, bileşimleri ve yapıları bakımından farklılık gösterir. Uyarıcı sinapsların postsinaptik bölümü, postsinaptik yoğunluk (PSD) olarak adlandırılan ve bu

bölgelerdeki nörotransmitter reseptörlerinin ve ilişkili moleküllerin yüksek yoğunluğuna atfedilebilen elektron yoğun bir bölge ile karakterize edilir (Boeckers, 2006; Craig ve ark. 2006). İskele moleküllerinin temas bölgelerinde kümelenmesinin, belirli bir sinaps tipinde spesifik nörotransmiter reseptörlerinin tutulmasında rol oynadığı düşünülmektedir. PSD'de, üzerinde nörotransmiter reseptörlerinin, sinyal iletim bileşenlerinin ve adezyon moleküllerinin düzeneğinin meydana geldiği iskele görevi gören çok sayıda protein ailesi vardır (Cho ve ark. 1992; Kim ve Sheng, 2004). Uyarıcı glutamaterjik sinapsların PSD'sinde lokalize olan ana yapı iskelesi molekülü, postsinaptik yoğunluk proteini PSD-95'tir (Keith ve ark. 2008).

PSD-95 (aynı zamanda SAP90, sinapsla ilişkili protein 90 olarak da bilinir), insanlarda DLG4 (discs large homolog 4) geni tarafından kodlanır ve MAGUK ailesinin önemli bir üyesidir. PSD'nin uyarıcı sinapslarında bir iskele proteini olarak işlev görür. PSD-95, üç N-terminal PDZ alanından (PSD-95, dlg ve zonula occludens-1), src homoloji alanından (SH3) ve katalitik olarak aktif olmayan bir guanilat siklaz alanından (GUK) oluşur (Cho, Hunt, 1992, Kim, 2004). PSD-95, PDZ alanları aracılığıyla doğrudan NMDA reseptör alt birimlerinin karboksi-terminal kuyruklarına ve AMPA reseptör yardımcı proteinlerine bağlanır (Zhang ve ark. 2013). Ayrıca PSD-95, iyon kanalları, reseptörler, adezyon proteinleri, yapı iskelesi proteinleri ve glutamaterjik iletimi etkileyen sinyal molekülleri dahil olmak üzere PSD içindeki geniş bir protein ağının ana bileşenidir. Örneğin, PSD-95'in K+ kanalları, nöroligin ve nNOS ile doğrudan etkileşimleri vardır (Brenman ve ark. 1996). MAGUK ailesinin ek üyeleri arasında SAP102, SAP97 ve PSD-93 bulunur ve ayrıca NMDA ve AMPA reseptörlerinin alınmasından ve dengelenmesinden sorumludurlar. PSD-95, NMDA ve AMPA reseptörlerinin etkileşimi ve fonksiyonel etkileri nedeniyle nörogelişim sırasında glutamaterjik sinapsların sinaptik plastisitesi ile uzun süredir ilişkilendirilmiştir. Uzun vadeli potansiyelizasyon (LTP) ve uzun vadeli depresyon (LTD) gibi sinaptik plastik süreçler, dendritik omurganın sinaptik olgunlaşmasında yoğun bir şekilde yer alır; bu nedenle, PSD'deki değişiklikler, sinapsın nöropatolojilerine yol açan omurga oluşumunun ayrılmaz sürecini tehlikeye atabilir (Coley ve ark. 2018). PSD-95'in nöronlarda aşırı ekspresyonu, LTP'yi taklit eden sinaptik iletimin özelliklerindeki değişikliklerle ilişkilidir. Bu etki, PSD-95'in AMPA reseptörlerinin sinaptik hedeflenmesindeki ve plastisite sırasında düzenlenen ekspresyonlarındaki rolüyle ilişkili görünmektedir (Chen ve ark. 2000; Schnell ve ark. 2002). Bunun için PSD-95, AMPA reseptörü ile ilişkili protein stargazin ile etkileşime girer ve yalnızca AMPA reseptörlerinin yüzey

ekspresyonunu değil, aynı zamanda bunların sinaptik bölgelerde difüzyonunu ve yakalanmasını da düzenler (Schnell ve ark. 2002). Sinaptik fonksiyona ek olarak, PSD-95'in sinaps olgunlaşmasını ve stabilizasyonunu ve dolayısıyla sinaps sayısını etkilediği de öne sürülmüştür. PSD-95'in akut yıkımı, sinaptik yapıların gelişimini azaltır ve PSD-95 mutant farelerde, çeşitli beyin bölgelerinde omurga yoğunluklarında farklılıklar gösterir (Bresler ve ark. 2001; Gray ve ark. 2006). PSD-95, hücre içi ve sinaptik havuzlar arasında sürekli bir dinamik düzenleme gösterir ve ayrıca sinaps oluşumu veya stabilizasyonu için trans-sinaptik sinyallemeye aracılık edebilecek sinaptik GTPaz aktive edici protein, nöroliginler veya NOS dahil olmak üzere birkaç önemli sinaptik proteinle etkileşime girer (Kim ve Sheng, 2004).

Farklı beyin bölgelerinde astrositlerin sinaptojenik profilindeki heterojenliği ve in vitro sinaps oluşumundaki etkisini araştırmak için, nöronal kültürlere DMEM/F12 (kontrol) ve astrosit koşullu ortam (ACM) uygulanmıştır. Sinaps oluşumu, pre ve postsinaptik proteinlerin, sinaptofizinin ve PSD-95'in immün boyaması ile değerlendirilmiştir. ACM uygulaması, serebral korteks, hipokampus, orta beyin ve serebellumda yapısal olarak oluşan sinapsların sayısını iki kattan fazla artırdığı saptanmıştır (Craven ve ark. 1999). Serebral korteks ve hipokampusa uygulanan ACM'lerin sinaptofizin ve PSD-95 ekspresyonunu arttırırken, orta beyin ve serebellumdaki uygulamanın; bu bölgelerde sinaps oluşumunun indüklenmesinin altında yatan farklı mekanizmaları öne sürmemesi ilginçtir. Nöron-astrosit etkileşimleri, bazı bölgelerde sinaps oluşumu için gereklidir; ancak, bunun hücreye özel olup olmadığı (astrosit veya nöronlar veya her ikisi) hala tartışma konusudur (Buosi ve ark. 2018). Sinaptojenik potansiyelin astrositik bir özellik olup olmadığını veya spesifik nöronal yanıt verebilirlikten etkilenip etkilenmediğini belirlemek için serebral korteks ve orta beyin nöronal kültürleri korteks, hipokampus, orta beyin ve serebelluma kontrol ve ACM uygulanmıştır. ACM uygulanan dört bölgede, kontrol koşullarına kıyasla kortikal ve orta beyin nöronları arasındaki sinaps sayısını önemli ölçüde artırdığını gözlemlenmiştir. Sinaps oluşumu, pre ve postsinaptik proteinler, sinaptofisin ve PSD-95'in ekspresyonu ile analiz edilmiştir. ACM uygulanan dört bölgede, aynı ve farklı beyin bölgelerinden gelen nöronlar üzerindeki sinaptofisin/PSD-95 ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır (Buosi ve ark. 2018). Serebellar astrositler, daha az konsantre ACM uygulandığında daha yüksek sinaptojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ko-kültürde yapılan deneyler, serebral korteks ve orta beyinden gelen nöronların ACM'ye eşit şekilde yanıt verdiğini ortaya çıkarmıştır; bu, sinaps etkisindeki farklılıkların nöron-özerk olmaktan farklı olduğunu göstermiştir. Farklı beyin bölgelerinden astrositler

tarafından salgılanan sinaptojenik moleküllerin ekspresyon profili, qPCR ile analiz edilmiş olup; glypicans 4 ve 6, hevin ve SPARC'ın gen ekspresyonu, farklı beyin bölgelerindeki astrositler arasında büyük farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Kucukdereli ve ark. 2011). Bizim çalışmamızda da insan astrosit hücrelerinin SNCA genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirilmiş olup total ve sinaptik PSD-95 proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar; ko-kültür kontrol ve ko-kültür SNCA grubunda sinaptik PSD-95 seviyesinin, Luhmes kontrol grubu, Ko-kültür kontrol grubu, Ko-kültür MOCK grubu ve Ko-kültür SNCA grubundaki total PSD-95 seviyelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, PSD-95'in sinaptik veziküllerde daha fazla bulunduğunu göstermektedir. Ek olarak, ko-kültür SNCA grubunun sinaptik PSD-95 seviyesinin ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. Nöronlar ve nörona farklılaştırılmış hücreler ile yapılan çalışmalar, α-sinüklein aşırı ekspresyonunun sinaptik proteinlerin seviyesini azalttığını göstermiştir. Ancak astrositlerde α-sinüklein aşırı ekspresyonunun sinaptik proteinler üzerine etkisine ilişkin literatürde herhangi bir bilgi yer almamaktadır. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz bu bulgular, α-sinüklein patolojisinin nöronlar üzerinde oluşturduğu yanıtın astrosit varlığında değişebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, SNCA aşırı ekspresyonu sinaps fonksiyonunu bozabilir ve hücrelerin de buna cevaben PSD-95 ekspresyonunu tetiklediği düşünülebilir.

Sinaptofisin (SYP), karakterize edilen ilk sinaptik veziküler (SV) proteinlerden biridir (Davidson ve ark. 1998; Wiedenmann ve ark. 1985) ve sinaptogirin ve sinaptoporin dahil olmak üzere dört transmembran alana sahip olduğu bilinmektedir. Sinaptofizin, toplam vezikül proteininin ~%10'unu oluşturan, kütlece en bol bulunan SV proteinidir (Takamori ve ark. 2006). SYP özel olarak SV'lere lokalize olduğundan, sinaptik öncesi terminaller için bir belirteç olarak yaygın şekilde kullanılır. Yapısal olarak SYP, her ikisi de SV zarının sitoplazmik yüzeyinde açığa çıkan kısa bir amino- ve uzun bir karboksi-terminal kuyruğu ile vezikül zarını dört kez kaplar (Evans ve ark. 2005). Ek olarak, disülfit bağları içeren iki kısa intravesiküler halka vardır. SYP, birinci intravesiküler döngüde N-glikosile edilir ve uzun sitoplazmik kuyrukta fosforile edilir; bu çeviri sonrası değişikliklerin işlevi bilinmemektedir. SYP'nin, özellikle dört transmembran bölgesinin, küçük SV'lerde olduğu gibi oldukça kavisli zarların oluşumunu destekleyebileceğini gösteren kanıtlar vardır (Leube ve ark. 1989). SYP, nöronların

veya nöroendokrin hücrelerin sinaptik vezikülünde bulunur ve tüm nöral sinapslarda tutarlı bir şekilde dağıldığı bilinmektedir. SYP, sinaptik veziküller gibi oldukça kavisli zarların oluşumunu teşvik ettiği öne sürülmüştür. Ultra yapısal bir çalışmada SYP'nin konneksonlara benzer bir yapı oluşturduğu bulunmuştur (Kwon ve ark. 2011). Son zamanlarda, sinaptofisinin nöronlarda sinaptik veziküler endositoz kinetiğini düzenlediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, hipokampus, bilginin birleştirilmesinde ve uzamsal navigasyonda önemli roller oynayan omurgalıların önemli bir bileşenidir (Janz ve ark. 1999). Aslında, nöronal olmayan hücrelerde tek başına SYP'nin ektopik ifadesi, küçük sitoplazmik veziküllerin oluşumuna yol açar. Yakın tarihli bir elektron mikroskobu çalışması, SYP'nin konneksonlara benzer hekzamerik yapılar oluşturduğunu ortaya çıkardı. Önceki moleküler çalışmalar, SV'lerin ekzositozu, sinaps oluşumu, biyogenezi ve endositozu dahil olmak üzere sinaptik fonksiyonda SYP için çeşitli rollere işaret etmiştir (Kwon ve ark. 2011). İnsan deneylerinde yapılan son genetik tarama ve farelerde yapılan davranışsal çalışmalar, zekâ geriliği ve/veya öğrenme eksikliklerinde SYP'nin kaybını veya kesilmesini ima etmiştir. Bu yeni sonuçlar, SYP'nin öğrenme ve hafızada yer alan nöronal devrelerde sinaptik iletimi düzenlemede ince ama önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Kwon ve ark. 2011). Yapılan bir çalışmada, biri insandan (SH-SY5Y), ikisi sıçandan (PC-12 ve N27) ve üçü fareden (MN9D, Cath.a ve CAD) olmak üzere altı farklı dopaminerjik hücre hattında western analizi ile sinaptofisin proteinin ekspresyonu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarla tutarlı olarak, MN9D hücreleri, sinaptofisin proteininin düşük ekspresyon seviyelerini sergilediği saptanmıştır. CAD hücrelerinin SHSY5Y hücrelerine kıyasla daha fazla sinaptofisin eksprese ettiği bulunmuştur (Bai ve ark. 2014). Bununla birlikte, SHSY5Y hücrelerinin uzun nöritlere sahip olduğu, ancak CAD hücrelerinin olmadığı göz önüne alındığında, SHSY5Y hücre hattının sinaptofisin çalışmaları için daha iyi bir seçim olabileceğini düşünülmüştür. PC-12 hücreleri, NGF veya bFGF ile; SH-SY5Y hücreleri, retinoik asit ile; Cath.a hücreleri CRF ile CAD hücreleri, serum yoksunluğu ile (Qi ve ark. 1997); MN9D hücreleri, sodyum bütirat ile ve N27 hücreleri, dcAMP ile farklılaştırılabilir (Zhang, Kanthasamy, ve ark. 2011). Bu farklılaşma yöntemlerinden bazıları, sinaptofisin ekspresyonunu da etkileyebilir. Örneğin, SH-SY5Y hücrelerinin retinoik asit farklılaşmasında artmış nörit uzunluğu ve sinaptofisin protein seviyesi gösterilmiştir (Cheung ve ark. 2009). Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ise; Ko-kültür SNCA grubundaki sinaptofisinin ekspresyon seviyesinin; Luhmes Kontrol grubu ve Ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Ko-kültür kontrol grubunda sinaptofisinin ekspresyon seviyesi Luhmes kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı

derecede artarken, Ko-kültür MOCK grubunda ise Ko-kültür kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. PDD ve LBD'de nöropatolojisinde α-sinüklein oligomerlerinin rol oynadığı düşünülmektedir ve bizim de elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda SNCA aşırı ekspresyonu sinaps fonksiyonunu bozabilir ve astrositlerinde buna cevaben PSD-95'e benzer şekilde sinaptofisin ekspresyonunu arttırdığı düşünülebilir.

Astrositlerin fonksiyonel aktivasyonu, travmatik, inme ve inflamatuar uyarılara yanıt olarak hızla gerçekleşir ve astrositler, nörolojik hastalıkların patogenezi ve ilerlemesi sırasında merkezi bir element veya kritik düzenleyici olarak çalışır (Cekanaviciute ve Buckwalter, 2016; Pekny ve ark. 2016; Seifert ve ark. 2006). Aktive astrositler, fizyolojik ve patolojik koşullar altında, MSS nöronlarının farklılaşması, aksonal büyümesi ve sinaptik plastisitesi ile ilgili nörotrofik faktörler ve inflamatuar sitokinler gibi nöroaktif maddeleri sentezler ve serbest bırakır (Gosselin ve ark. 2013; Heales ve ark. 2004; Hillen ve ark. 2018; Verkhratsky ve ark. 2016). Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gibi nörotrofik faktörlerin olgun formları, nöronal sağkalımı desteklerken proNGF, proBDNF ve proGDNF gibi pro-formları aksi takdirde travmatik, inflamatuar ve nörodejeneratif hastalıklar altında nöronal hücre apoptozu veya nörodejenerasyonu tetikler (Fahnestock ve ark. 2004; Li ve ark. 2017; Sun ve ark. 2014; Xia ve ark. 2013).

Sinir Büyüme Faktörü (NGF), yaklaşık 60 yıl önce, kötü huylu bir fare sarkomunun 3 günlük bir civciv embriyosunun vücut duvarına nakledilmesinden sonra R. Levi-Montalcini tarafından keşfedilmiştir (Levi-Montalcini ve ark. 1951). Sonraki çalışmalar, saflaştırılmış murin NGF'nin (yetişkin submaksiller bez) morfolojik farklılaşmayı uyardığını, nöronal gen ekspresyonunu düzenlediğini (spesifik hücresel reseptörlerle etkileşim yoluyla) ve periferal duyusal ve sempatik nöronlar üzerinde doğrudan hareket etmek ve fonksiyonlarını ve fenotiplerini korumak için olgun nöronlarda kritik bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Sofroniew ve ark. 2001). Yapısal, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar, hedef hücreler ve bunların innervasyonları arasındaki trofik etkileşim başarısızlığının sinir işlev bozukluğuna ve nöronal dejenerasyona neden olabileceğini göstermektedir (Connor ve ark. 1998). Bu bulgular, saflaştırılmış NGF'nin, diyabette gözlemlendiği gibi periferik sinirleri dejenerasyondan korumak ve/veya önlemek için yararlı olabileceği hipotezine yol açmıştır. Hayvan modellerinde

ve insanlarda yürütülen çalışmalar, NGF'nin periferik duyusal ve sempatik sinir hücrelerinin hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve fonksiyonel aktivitesini destekleyebileceğini göstermiştir (Apfel ve ark. 1994). Diyabet, periferik nöronların dejenerasyonu ve değişen NGF/NGF reseptör seviyeleri ve NGF sinyal yolağının deregülasyonu ile karakterize edilen bir metabolizma bozukluğudur (Apfel 2002). Diyabetik nöropatilerin deneysel modellerinde, NGF uygulaması nörodejeneratif belirtileri tersine çevirdi ve periferik sinir sistemine ait nöronların aktivitesini normalleştirdi (Ferrari ve ark. 2014). Daha sonra yapılan çalışmalar, NGF'nin spesifik beyin hücreleri ve özellikle AH'de dejenerasyona uğrayan bazal ön beyin kaynaklı nöronlar ve çeşitli nöronal olmayan ve neoplastik hücreler üzerinde kritik bir koruyucu etki uyguladığını ortaya koydu. Ayrıca bu çalışmalar, insan hedef hücrelerinde koruyucu NGF rolünün, kornea ülserleri, glokom, makülopati, retinitis pigmentosa ve AH tedavisinde gözlendiği gibi, klasik sinir sistemi alanının dışında da ortaya çıkabileceğini ortaya koydu (Fischer ve ark. 1987). Bu çalışmalar, yakın gelecekte NGF'ye duyarlı hücrelere zarar veren insan patolojilerinin tedavisi için NGF'nin kullanılmasını önerecektir. Bu arada, kanser hücrelerinde NGF ve NGF reseptörlerinin varlığı, NGF'nin hücre proliferasyonunu ve nihayetinde kanser hücresinin hayatta kalmasını desteklemede yer alıp almadığı sorusunu gündeme getirmiştir (Aloe ve ark. 2016). Nörodejeneratif hastalıklarda trofik faktörlerde yaygın olarak azalma olduğu bildirilmiş ve bu azalmanın nöronların kendileri tarafından bu proteinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonunu azalttığı ileri sürülmüştür (Weis, Saxena ve ark. 2003). İnsan astrosit hücrelerinin SNCA genini içeren plazmid transfeksiyonundan 24 saat sonra LUHMES hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirildiğinde; tüm deney gruplarında total protein izolasyonu yapılarak NGF proteinin ekspresyonundaki değişimler belirlenmiştir. Western Blot görüntülemesinin analiziyle elde edilen sonuçlarda; Ko-kültür SNCA grubundaki NGF'nin ekspresyon seviyesinin; Luhmes kontrol grubu, Ko-kültür kontrol grubu ve Ko-kültür MOCK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Önceki çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular α-sinüklein aşırı ekspresyonuna cevaben astrositlerde hücre içi NGF düzeyi artarken, salınan NGF'nin azaldığını göstermiştir (Sengul ve ark. 2020). Bu çalışmada ise LUHMES-astrosit ko-kültürü hücrelerinden elde ettiğimiz veriler hücre içi NGF miktarının azaldığını göstermektedir. Daha önceki çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle birlikte değerlendirdiğimizde bu azalışın LUHMES hücrelerini yansıttığı ve astrositler tarafından salınan NGF miktarının azalması sonucu LUHMES hücre içi NGF miktarının da azaldığı şeklinde yorumlayabiliriz. Diğer taraftan astrositlerden LUHMES hücrelerine geçen α-sinüklein, bu hücrelerdeki NGF üretimini de baskılıyor olabilir. Ek olarak; parkinson modeli

oluşturulan çalışmalarda, serum NGF seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bizim de elde ettiğimiz sonuçlar bu bulgularla uyumlu olarak SNCA grubundaki NGF ekspresyonunundaki azalmanın dopaminerjik sistemde fonksiyon bozukluğunun erken bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda, astrositlerde miktarı arttırılmış α-sinükleinin herhangi bir indüklemeye ihtiyaç duymadan nörona farklılaştırılmış LUHMES hücrelerine göç ettiği saptanmıştır. Bu bulgu normal fizyolojik bir fonksiyon olarak α-sinükleinin ihtiyaç anında astrositlerden nöronlara doğru geçebileceği ya da tersi olarak astrositlerin normal koşullarda oldukça az ürettikleri bu proteinin artışına oldukça hassas oldukları ve hızlıca hücre dışına gönderdikleri şeklinde yorumlanabilir. Her iki durum da astrositlerin α-sinükleinin prion benzeri yayılma paternini desteklediğini göstermektedir. Diğer taraftan bulgular, α-sinüklein patolojisinin nöronal sitotoksisiteyi arttırdığını net bir şekilde göstermektedir. Sinaps oluşumunda rol alan thrombospondin, sinaptofisin ve PSD-95 protein seviyelerinin artması, artan sitotoksisiteye bir cevap olabilir. Bu sitotoksik etkiler sonucunda astrosit kökenli α-sinükleinin ko-kültürdeki hücrelerde NGF miktarını azalttığı dolayısıyla nöron sağkalımını etkileyebileceği saptanmıştır.

Daha önce elde ettiğimiz veriler α-sinüklein patolojisinin astrositlerde trofik faktör profilini değiştirdiğini ve pek çok trofik faktörün üretimini ve salınımın arttırdığını göstermiştir. α-sinüklein patolojisinin astrositlerde muhtemelen bu nörotrofik faktör artışını ve salınımını gerçekleştirebilmek için sinaptik vezikül oluşumunu arttırdığı; sinaptik vezikül oluşumunda rol olan α-sinükleinin bu faktölerin salınımına eşlik edebileceği tarafımızdan rapor edilmiştir. Doktora tezi kapsamında elde ettiğimiz sonuçlarla daha öncekli verilerimizi birlikte değerlendirdiğimizde, astrosit kökenli α-sinüklein'nin diğer trofik faktörlerin yanısıra, sinaps oluşumunda rol oynayan astrosit kaynaklı thrombospondin gibi faktörlerin üretimini ve salınımını arttırabileceği; ayrıca nöronlarda da sinaps oluşumuna katılan sinaptofisin ve PSD-95 proteinlerinin üretimini tetiklediği saptanmıştır. Membran hasarının artışıyla birlikte değerlendirildiğinde, sinaptik proteinlerdeki bu artışlar, hasarlanan hücre yapılarının geriye döndürülmesine yönelik bir hücre cevabı olarak değerlendirilebilir. Ancak α-sinükleinin nöronlara göç ederek nasıl bir mekinazmayı tetiklediği ve astrosit kökenli α-sinükleinin nöronların kendi ürettiği α-sinükleinden daha farklı bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir ve bu sorular ileri analizlerin yapılması gerektiğini göstermektedir.

# KAYNAKLAR


Aarsland, D., K. Andersen, J. P. Larsen, A. Lolk, and P. Kragh-Sorensen. 2003. 'Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study', *Arch Neurol*, 60: 387-92.

Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W. H. Ho, P. E. Castillo, N. Shinsky, J. M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, and A. Rosenthal. 2000. 'Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system', *Neuron*, 25: 239-52.

Abounit, S., L. Bousset, F. Loria, S. Zhu, F. de Chaumont, L. Pieri, J. C. Olivo-Marin, R. Melki, and C. Zurzolo. 2016. 'Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes', *EMBO J*, 35: 2120-38.

Adamczyk, A., M. Kacprzak, and A. Kazmierczak. 2007. 'Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneurosomes', *Folia Neuropathol*, 45: 230-5.

Adams, J. C. 2001. 'Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 25-51.

Adrian, M., R. Kusters, C. J. Wierenga, C. Storm, C. C. Hoogenraad, and L. C. Kapitein. 2014. 'Barriers in the brain: resolving dendritic spine morphology and compartmentalization', *Front Neuroanat*, 8: 142.

Ahn, K. J., S. R. Paik, K. C. Chung, and J. Kim. 2006. 'Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein', *J Neurochem*, 97: 265-79.

Alam, P., L. Bousset, R. Melki, and D. E. Otzen. 2019. 'alpha-synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities', *J Neurochem*, 150: 522-34.

Allen, N. J. 2013. 'Role of glia in developmental synapse formation', *Curr Opin Neurobiol*, 23: 1027-33.

Allen, N. J., M. L. Bennett, L. C. Foo, G. X. Wang, C. Chakraborty, S. J. Smith, and B. A. Barres. 2012. 'Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors', *Nature*, 486: 410-4.

Aloe, L., M. L. Rocco, B. O. Balzamino, and A. Micera. 2016. 'Nerve growth factor: role in growth, differentiation and controlling cancer cell development', *J Exp Clin Cancer Res*, 35: 116.

Anderson, M. A., Y. Ao, and M. V. Sofroniew. 2014. 'Heterogeneity of reactive astrocytes', *Neurosci Lett*, 565: 23-9.

Andriezen, W. L. 1893. 'The Neuroglia Elements in the Human Brain', *Br Med J*, 2: 227-30.

Anwar, S., O. Peters, S. Millership, N. Ninkina, N. Doig, N. Connor-Robson, S. Threlfell, G. Kooner, R. M. Deacon, D. M. Bannerman, J. P. Bolam, S. S. Chandra, S. J. Cragg, R. Wade-Martins, and V. L. Buchman. 2011. 'Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family', *J Neurosci*, 31: 7264-74.

Apfel, S. C. 2002. 'Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold?', *Int Rev Neurobiol*, 50: 393-413.

Apfel, S. C., J. C. Arezzo, M. Brownlee, H. Federoff, and J. A. Kessler. 1994. 'Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy', *Brain Res*, 634: 7-12.

Appel-Cresswell, S., C. Vilarino-Guell, M. Encarnacion, H. Sherman, I. Yu, B. Shah, D. Weir, C. Thompson, C. Szu-Tu, J. Trinh, J. O. Aasly, A. Rajput, A. H. Rajput, A. Jon Stoessl, and M. J. Farrer. 2013. 'Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease', *Mov Disord*, 28: 811-3.

Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri, and P. G. Haydon. 1999. 'Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner', *Trends Neurosci*, 22: 208-15.

Askanas, V., W. K. Engel, R. B. Alvarez, J. McFerrin, and A. Broccolini. 2000. 'Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions', *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 592-8.

Bae, E. J., D. H. Ho, E. Park, J. W. Jung, K. Cho, J. H. Hong, H. J. Lee, K. P. Kim, and S. J. Lee. 2013. 'Lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal promotes seeding-capable oligomer formation and cell-to-cell transfer of alpha-synuclein', *Antioxid Redox Signal*, 18: 770-83.

Bae, J. J., Y. Y. Xiang, A. Martinez-Canabal, P. W. Frankland, B. B. Yang, and W. Y. Lu. 2011. 'Increased transforming growth factor-beta1 modulates glutamate receptor expression in the hippocampus', *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 3: 9-20.

Bai, X., and R. Strong. 2014. 'Expression of synaptophysin protein in different dopaminergic cell lines', *J Biochem Pharmacol Res*, 2: 185-90.

Baldwin, K. T., and C. Eroglu. 2017. 'Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis', *Curr Opin Neurobiol*, 45: 113-20.

Bang, M. L., and S. Owczarek. 2013. 'A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse', *Neurochem Res*, 38: 1174-89.

Bartels, T., J. G. Choi, and D. J. Selkoe. 2011. 'alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation', *Nature*, 477: 107-10.

Bartels, T., N. C. Kim, E. S. Luth, and D. J. Selkoe. 2014. 'N-alpha-acetylation of alpha-synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation', *PLoS One*, 9: e103727.

Bavinton, C. E., R. Sternke-Hoffmann, T. Yamashita, P. C. Knipe, A. D. Hamilton, J. Luo, and S. Thompson. 2022. 'Rationally designed helical peptidomimetics disrupt alpha-synuclein fibrillation', *Chem Commun (Camb)*, 58: 5132-35.

Bayraktar, O. A., L. C. Fuentealba, A. Alvarez-Buylla, and D. H. Rowitch. 2014. 'Astrocyte development and heterogeneity', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a020362.

Benskey, M. J., R. G. Perez, and F. P. Manfredsson. 2016. 'The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease', *J Neurochem*, 137: 331-59.

Bernheimer, H., W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, K. Jellinger, and F. Seitelberger. 1973. 'Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations', *J Neurol Sci*, 20: 415-55.

Beyer, K. 2006. 'Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers', *Acta Neuropathol*, 112: 237-51.

Beyer, K., and A. Ariza. 2013. 'alpha-Synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration', *Mol Neurobiol*, 47: 509-24.

Biederer, T., Y. Sara, M. Mozhayeva, D. Atasoy, X. Liu, E. T. Kavalali, and T. C. Sudhof. 2002. 'SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly', *Science*, 297: 1525-31.

Bisaglia, M., E. Schievano, A. Caporale, E. Peggion, and S. Mammi. 2006. 'The 11-mer repeats of human alpha-synuclein in vesicle interactions and lipid composition discrimination: a cooperative role', *Biopolymers*, 84: 310-6.

Blondel, O., C. Collin, W. J. McCarran, S. Zhu, R. Zamostiano, I. Gozes, D. E. Brenneman, and R. D. McKay. 2000. 'A glia-derived signal regulating neuronal differentiation', *J Neurosci*, 20: 8012-20.

Bras, I. C., and T. F. Outeiro. 2021. 'Alpha-Synuclein: Mechanisms of Release and Pathology Progression in Synucleinopathies', *Cells*, 10.

Braun, A. R., E. Sevcsik, P. Chin, E. Rhoades, S. Tristram-Nagle, and J. N. Sachs. 2012. 'alpha-Synuclein induces both positive mean curvature and negative Gaussian curvature in membranes', *J Am Chem Soc*, 134: 2613-20.

Brenman, J. E., D. S. Chao, S. H. Gee, A. W. McGee, S. E. Craven, D. R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M. F. Peters, S. C. Froehner, and D. S. Bredt. 1996. 'Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains', *Cell*, 84: 757-67.

Breydo, L., J. W. Wu, and V. N. Uversky. 2012. 'Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1822: 261-85.

Brodin, L., D. Milovanovic, S. O. Rizzoli, and O. Shupliakov. 2022. 'alpha-Synuclein in the Synaptic Vesicle Liquid Phase: Active Player or Passive Bystander?', *Front Mol Biosci*, 9: 891508.

Brose, N. 1999. 'Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system', *Naturwissenschaften*, 86: 516-24.

Bugiani, M., B. C. Plug, J. H. K. Man, M. Breur, and M. S. van der Knaap. 2022. 'Heterogeneity of white matter astrocytes in the human brain', *Acta Neuropathol*, 143: 159-77.

Buosi, A. S., I. Matias, A. P. B. Araujo, C. Batista, and F. C. A. Gomes. 2018. 'Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions', *Mol Neurobiol*, 55: 751-62.

Burmann, B. M., J. A. Gerez, I. Matecko-Burmann, S. Campioni, P. Kumari, D. Ghosh, A. Mazur, E. E. Aspholm, D. Sulskis, M. Wawrzyniuk, T. Bock, A. Schmidt, S. G. D. Rudiger, R. Riek, and S. Hiller. 2020. 'Regulation of alpha-synuclein by chaperones in mammalian cells', *Nature*, 577: 127-32.

Burre, J. 2015. 'The Synaptic Function of alpha-Synuclein', *J Parkinsons Dis*, 5: 699-713.

Burre, J., M. Sharma, and T. C. Sudhof. 2014. 'alpha-Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E4274-83.

Burre, J., M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M. R. Etherton, and T. C. Sudhof. 2010. 'Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro', *Science*, 329: 1663-7.

Burre, J., S. Vivona, J. Diao, M. Sharma, A. T. Brunger, and T. C. Sudhof. 2013. 'Properties of native brain alpha-synuclein', *Nature*, 498: E4-6; discussion E6-7.

Bussell, R., Jr., and D. Eliezer. 2003. 'A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins', *J Mol Biol*, 329: 763-78.

Bussell, R., Jr., T. F. Ramlall, and D. Eliezer. 2005. 'Helix periodicity, topology, and dynamics of membrane-associated alpha-synuclein', *Protein Sci*, 14: 862-72.

Butler, B., S. Goodwin, K. Saha, J. Becker, D. Sambo, P. Davari, and H. Khoshbouei. 2015. 'Dopamine Transporter Activity Is Modulated by alpha-synuclein', *J Biol Chem*.

Carmignoto, G., L. Pasti, and T. Pozzan. 1998. 'On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ', *J Neurosci*, 18: 4637-45.

Carnazza, K. E., L. E. Komer, Y. X. Xie, A. Pineda, J. A. Briano, V. Gao, Y. Na, T. Ramlall, V. L. Buchman, D. Eliezer, M. Sharma, and J. Burre. 2022. 'Synaptic vesicle binding of alpha-synuclein is modulated by beta- and gamma-synucleins', *Cell Rep*, 39: 110675.

Cassina, P., A. Cassina, M. Pehar, R. Castellanos, M. Gandelman, A. de Leon, K. M. Robinson, R. P. Mason, J. S. Beckman, L. Barbeito, and R. Radi. 2008. 'Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants', *J Neurosci*, 28: 4115-22.

Celej, M. S., R. Sarroukh, E. Goormaghtigh, G. D. Fidelio, J. M. Ruysschaert, and V. Raussens. 2012. 'Toxic prefibrillar alpha-synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel beta-sheet structure', *Biochem J*, 443: 719-26.

Chadchankar, H., J. Ihalainen, H. Tanila, and L. Yavich. 2011. 'Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein', *Brain Res*, 1382: 37-44.

Chandra, S., X. Chen, J. Rizo, R. Jahn, and T. C. Sudhof. 2003. 'A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein', *J Biol Chem*, 278: 15313-8.

Chandra, S., G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O. M. Schluter, and T. C. Sudhof. 2005. 'Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration', *Cell*, 123: 383-96.

Chartier-Harlin, M. C., J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Levecque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer, and A. Destee. 2004. 'Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease', *Lancet*, 364: 1167-9.

Chavarria, C., R. Ivagnes, and J. M. Souza. 2022. 'Extracellular Alpha-Synuclein: Mechanisms for Glial Cell Internalization and Activation', *Biomolecules*, 12.

Chavarria, C., S. Rodriguez-Bottero, C. Quijano, P. Cassina, and J. M. Souza. 2018. 'Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons', *Biochem J*, 475: 3153-69.

Chen, L., and M. B. Feany. 2005. 'Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease', *Nat Neurosci*, 8: 657-63.

Chen, X., H. A. de Silva, M. J. Pettenati, P. N. Rao, P. St George-Hyslop, A. D. Roses, Y. Xia, K. Horsburgh, K. Ueda, and T. Saitoh. 1995. 'The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis', *Genomics*, 26: 425-7.

Cheung, Y. T., W. K. Lau, M. S. Yu, C. S. Lai, S. C. Yeung, K. F. So, and R. C. Chang. 2009. 'Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research', *Neurotoxicology*, 30: 127-35.

Chi, P., P. Greengard, and T. A. Ryan. 2001. 'Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity', *Nat Neurosci*, 4: 1187-93.

Chih, B., H. Engelman, and P. Scheiffele. 2005. 'Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins', *Science*, 307: 1324-8.

Choi, Y. K., J. H. Kim, D. K. Lee, K. S. Lee, M. H. Won, D. Jeoung, H. Lee, K. S. Ha, Y. G. Kwon, and Y. M. Kim. 2017. 'Carbon Monoxide Potentiation of L-Type Ca(2+) Channel Activity Increases HIF-1alpha-Independent VEGF Expression via an AMPKalpha/SIRT1-Mediated PGC-1alpha/ERRalpha Axis', *Antioxid Redox Signal*, 27: 21-36.

Choi, Y. K., J. H. Park, Y. Y. Baek, M. H. Won, D. Jeoung, H. Lee, K. S. Ha, Y. G. Kwon, and Y. M. Kim. 2016. 'Carbon monoxide stimulates astrocytic mitochondrial biogenesis via L-type Ca(2+) channel-mediated PGC-1alpha/ERRalpha activation', *Biochem Biophys Res Commun*, 479: 297-304.

Christian, C. A., and J. R. Huguenard. 2013. 'Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 20278-83.

Christopherson, K. S., E. M. Ullian, C. C. Stokes, C. E. Mullowney, J. W. Hell, A. Agah, J. Lawler, D. F. Mosher, P. Bornstein, and B. A. Barres. 2005. 'Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis', *Cell*, 120: 421-33.

Chu, Y., and J. H. Kordower. 2007. 'Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease?', *Neurobiol Dis*, 25: 134-49.

Chung, W. S., N. J. Allen, and C. Eroglu. 2015. 'Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a020370.

Chung, W. S., L. E. Clarke, G. X. Wang, B. K. Stafford, A. Sher, C. Chakraborty, J. Joung, L. C. Foo, A. Thompson, C. Chen, S. J. Smith, and B. A. Barres. 2013. 'Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways', *Nature*, 504: 394-400.

Clinton, L. K., M. Blurton-Jones, K. Myczek, J. Q. Trojanowski, and F. M. LaFerla. 2010. 'Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline', *J Neurosci*, 30: 7281-9.

Coley, A. A., and W. J. Gao. 2018. 'PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 82: 187-94.

Colombo, J. A., H. D. Reisin, J. J. Miguel-Hidalgo, and G. Rajkowska. 2006. 'Cerebral cortex astroglia and the brain of a genius: a propos of A. Einstein's', *Brain Res Rev*, 52: 257-63.

Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. Thery, and G. Raposo. 2013. 'Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles', *J Cell Sci*, 126: 5553-65.

Compta, Y., L. Parkkinen, S. S. O'Sullivan, J. Vandrovcova, J. L. Holton, C. Collins, T. Lashley, C. Kallis, D. R. Williams, R. de Silva, A. J. Lees, and T. Revesz. 2011. 'Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important?', *Brain*, 134: 1493-505.

Connor, B., and M. Dragunow. 1998. 'The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain', *Brain Res Brain Res Rev*, 27: 1-39.

Conway, K. A., J. C. Rochet, R. M. Bieganski, and P. T. Lansbury, Jr. 2001. 'Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct', *Science*, 294: 1346-9.

Courte, J., L. Bousset, Y. V. Boxberg, C. Villard, R. Melki, and J. M. Peyrin. 2020. 'The expression level of alpha-synuclein in different neuronal populations is the primary determinant of its prion-like seeding', *Sci Rep*, 10: 4895.

Craig, A. M., and H. Boudin. 2001. 'Molecular heterogeneity of central synapses: afferent and target regulation', *Nat Neurosci*, 4: 569-78.

Craven, S. E., A. E. El-Husseini, and D. S. Bredt. 1999. 'Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs', *Neuron*, 22: 497-509.

Davidson, W. S., A. Jonas, D. F. Clayton, and J. M. George. 1998. 'Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes', *J Biol Chem*, 273: 9443-9.

De Cat, B., and G. David. 2001. 'Developmental roles of the glypicans', *Semin Cell Dev Biol*, 12: 117-25.

Dean, C., F. G. Scholl, J. Choih, S. DeMaria, J. Berger, E. Isacoff, and P. Scheiffele. 2003. 'Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals', *Nat Neurosci*, 6: 708-16.

Deas, E., N. Cremades, P. R. Angelova, M. H. Ludtmann, Z. Yao, S. Chen, M. H. Horrocks, B. Banushi, D. Little, M. J. Devine, P. Gissen, D. Klenerman, C. M. Dobson, N. W. Wood, S. Gandhi, and A. Y. Abramov. 2016. 'Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease', *Antioxid Redox Signal*, 24: 376-91.

Delaidelli, A., M. Richner, L. Jiang, A. van der Laan, I. Bergholdt Jul Christiansen, N. Ferreira, J. R. Nyengaard, C. B. Vaegter, P. H. Jensen, I. R. Mackenzie, P. H. Sorensen, and A. Jan. 2021. 'alpha-Synuclein pathology in Parkinson disease activates homeostatic NRF2 anti-oxidant response', *Acta Neuropathol Commun*, 9: 105.

Devi, L., V. Raghavendran, B. M. Prabhu, N. G. Avadhani, and H. K. Anandatheerthavarada. 2008. 'Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain', *J Biol Chem*, 283: 9089-100.

di Domenico, A., G. Carola, C. Calatayud, M. Pons-Espinal, J. P. Munoz, Y. Richaud-Patin, I. Fernandez-Carasa, M. Gut, A. Faella, J. Parameswaran, J. Soriano, I. Ferrer, E. Tolosa, A. Zorzano, A. M. Cuervo, A. Raya, and A. Consiglio. 2019. 'Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease', *Stem Cell Reports*, 12: 213-29.

Dikiy, I., and D. Eliezer. 2014. 'N-terminal acetylation stabilizes N-terminal helicity in lipid- and micelle-bound alpha-synuclein and increases its affinity for physiological membranes', *J Biol Chem*, 289: 3652-65.

Diniz, L. P., J. C. Almeida, V. Tortelli, C. Vargas Lopes, P. Setti-Perdigao, J. Stipursky, S. A. Kahn, L. F. Romao, J. de Miranda, S. V. Alves-Leon, J. M. de Souza, N. G. Castro, R. Panizzutti, and F. C. Gomes. 2012. 'Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons', *J Biol Chem*, 287: 41432-45.

Doan, R. N., B. I. Bae, B. Cubelos, C. Chang, A. A. Hossain, S. Al-Saad, N. M. Mukaddes, O. Oner, M. Al-Saffar, S. Balkhy, G. G. Gascon, Autism Homozygosity Mapping Consortium for, M. Nieto, and C. A. Walsh. 2016. 'Mutations in Human Accelerated Regions Disrupt Cognition and Social Behavior', *Cell*, 167: 341-54 e12.

Drescher, M., G. Veldhuis, B. D. van Rooijen, S. Milikisyants, V. Subramaniam, and M. Huber. 2008. 'Antiparallel arrangement of the helices of vesicle-bound alpha-synuclein', *J Am Chem Soc*, 130: 7796-7.

Elmariah, S. B., E. J. Oh, E. G. Hughes, and R. J. Balice-Gordon. 2005. 'Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors', *J Neurosci*, 25: 3638-50.

Emsley, J. G., and J. D. Macklis. 2006. 'Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS', *Neuron Glia Biol*, 2: 175-86.

Engelender, S., and O. Isacson. 2017. 'The Threshold Theory for Parkinson's Disease', *Trends Neurosci*, 40: 4-14.

Eroglu, C., N. J. Allen, M. W. Susman, N. A. O'Rourke, C. Y. Park, E. Ozkan, C. Chakraborty, S. B. Mulinyawe, D. S. Annis, A. D. Huberman, E. M. Green, J. Lawler, R. Dolmetsch, K. C. Garcia, S. J. Smith, Z. D. Luo, A. Rosenthal, D. F. Mosher, and B. A. Barres. 2009. 'Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis', *Cell*, 139: 380-92.

Eroglu, C., and B. A. Barres. 2010. 'Regulation of synaptic connectivity by glia', *Nature*, 468: 223-31.

Evans, G. J., and M. A. Cousin. 2005. 'Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling', *Biochem Soc Trans*, 33: 1350-3.

Falcone, C. 2022. 'Evolution of astrocytes: From invertebrates to vertebrates', *Front Cell Dev Biol*, 10: 931311.

Farhy-Tselnicker, I., A. C. M. van Casteren, A. Lee, V. T. Chang, A. R. Aricescu, and N. J. Allen. 2017. 'Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 from Axons to Induce Functional Synapse Formation', *Neuron*, 96: 428-45 e13.

Farmer, W. T., T. Abrahamsson, S. Chierzi, C. Lui, C. Zaelzer, E. V. Jones, B. P. Bally, G. G. Chen, J. F. Theroux, J. Peng, C. W. Bourque, F. Charron, C. Ernst, P. J. Sjostrom, and K. K. Murai. 2016. 'Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling', *Science*, 351: 849-54.

Faure, J., G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C. Chatellard-Causse, B. Blot, J. Grange, G. Schoehn, Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G. Raposo, J. Garin, and R. Sadoul. 2006. 'Exosomes are released by cultured cortical neurones', *Mol Cell Neurosci*, 31: 642-8.

Fernandez, C. O., W. Hoyer, M. Zweckstetter, E. A. Jares-Erijman, V. Subramaniam, C. Griesinger, and T. M. Jovin. 2004. 'NMR of alpha-synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation', *EMBO J*, 23: 2039-46.

Ferrari, M. P., F. Mantelli, M. Sacchetti, M. I. Antonangeli, F. Cattani, G. D'Anniballe, F. Sinigaglia, P. A. Ruffini, and A. Lambiase. 2014. 'Safety and pharmacokinetics of escalating doses of human recombinant nerve growth factor eye drops in a double-masked, randomized clinical trial', *BioDrugs*, 28: 275-83.

Fischer, W., K. Wictorin, A. Bjorklund, L. R. Williams, S. Varon, and F. H. Gage. 1987. 'Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor', *Nature*, 329: 65-8.

Fossati, G., D. Pozzi, A. Canzi, F. Mirabella, S. Valentino, R. Morini, E. Ghirardini, F. Filipello, M. Moretti, C. Gotti, D. S. Annis, D. F. Mosher, C. Garlanda, B. Bottazzi, G. Taraboletti, A. Mantovani, M. Matteoli, and E. Menna. 2019. 'Pentraxin 3 regulates synaptic function by inducing AMPA receptor clustering via ECM remodeling and beta1-integrin', *EMBO J*, 38.

Fouke, K. E., M. E. Wegman, S. A. Weber, E. B. Brady, C. Roman-Vendrell, and J. R. Morgan. 2021. 'Synuclein Regulates Synaptic Vesicle Clustering and Docking at a Vertebrate Synapse', *Front Cell Dev Biol*, 9: 774650.

Freeman, M. R. 2010. 'Specification and morphogenesis of astrocytes', *Science*, 330: 774-8.

Fusco, G., A. De Simone, T. Gopinath, V. Vostrikov, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, and G. Veglia. 2014. 'Direct observation of the three regions in alpha-synuclein that determine its membrane-bound behaviour', *Nat Commun*, 5: 3827.

Gaidin, S. G., V. P. Zinchenko, A. I. Sergeev, I. Y. Teplov, V. N. Mal'tseva, and A. M. Kosenkov. 2020. 'Activation of alpha-2 adrenergic receptors stimulates GABA release by astrocytes', *Glia*, 68: 1114-30.

Gao, V., J. A. Briano, L. E. Komer, and J. Burre. 2023. 'Functional and Pathological Effects of alpha-Synuclein on Synaptic SNARE Complexes', *J Mol Biol*, 435: 167714.

Garcia-Reitboeck, P., O. Anichtchik, J. W. Dalley, N. Ninkina, G. K. Tofaris, V. L. Buchman, and M. G. Spillantini. 2013. 'Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra', *Exp Neurol*, 248: 541-5.

George, J. M. 2002. 'The synucleins', *Genome Biol*, 3: REVIEWS3002.

Georgieva, E. R., T. F. Ramlall, P. P. Borbat, J. H. Freed, and D. Eliezer. 2008. 'Membrane-bound alpha-synuclein forms an extended helix: long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles', *J Am Chem Soc*, 130: 12856-7.

———. 2010. 'The lipid-binding domain of wild type and mutant alpha-synuclein: compactness and interconversion between the broken and extended helix forms', *J Biol Chem*, 285: 28261-74.

Gerrow, K., and A. El-Husseini. 2006. 'Cell adhesion molecules at the synapse', *Front Biosci*, 11: 2400-19.

Gibb, W. R., and A. J. Lees. 1988. 'A comparison of clinical and pathological features of young- and old-onset Parkinson's disease', *Neurology*, 38: 1402-6.

Gilman, S., G. K. Wenning, P. A. Low, D. J. Brooks, C. J. Mathias, J. Q. Trojanowski, N. W. Wood, C. Colosimo, A. Durr, C. J. Fowler, H. Kaufmann, T. Klockgether, A. Lees, W. Poewe, N. Quinn, T. Revesz, D. Robertson, P. Sandroni, K. Seppi, and M. Vidailhet. 2008. 'Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy', *Neurology*, 71: 670-6.

Golovko, M. Y., N. J. Faergeman, N. B. Cole, P. I. Castagnet, R. L. Nussbaum, and E. J. Murphy. 2005. 'Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding', *Biochemistry*, 44: 8251-9.

Gomez-Casati, M. E., J. C. Murtie, C. Rio, K. Stankovic, M. C. Liberman, and G. Corfas. 2010. 'Nonneuronal cells regulate synapse formation in the vestibular sensory epithelium via erbB-dependent BDNF expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 17005-10.

Gorbatyuk, O. S., S. Li, F. N. Nguyen, F. P. Manfredsson, G. Kondrikova, L. F. Sullivan, C. Meyers, W. Chen, R. J. Mandel, and N. Muzyczka. 2010. 'alpha-Synuclein expression in rat substantia nigra suppresses phospholipase D2 toxicity and nigral neurodegeneration', *Mol Ther*, 18: 1758-68.

Graf, E. R., X. Zhang, S. X. Jin, M. W. Linhoff, and A. M. Craig. 2004. 'Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins', *Cell*, 119: 1013-26.

Graham, J. G., and D. R. Oppenheimer. 1969. 'Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 32: 28-34.

Greten-Harrison, B., M. Polydoro, M. Morimoto-Tomita, L. Diao, A. M. Williams, E. H. Nie, S. Makani, N. Tian, P. E. Castillo, V. L. Buchman, and S. S. Chandra. 2010. 'alphabetagamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 19573-8.

Grosso Jasutkar, H., S. E. Oh, and M. M. Mouradian. 2022. 'Therapeutics in the Pipeline Targeting alpha-Synuclein for Parkinson's Disease', *Pharmacol Rev*, 74: 207-37.

Guo, J. T., A. Q. Chen, Q. Kong, H. Zhu, C. M. Ma, and C. Qin. 2008. 'Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in alpha-synuclein stably transfected SH-SY5Y cells', *Cell Mol Neurobiol*, 28: 35-47.

Halassa, M. M., T. Fellin, H. Takano, J. H. Dong, and P. G. Haydon. 2007. 'Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte', *J Neurosci*, 27: 6473-7.

Hall, B. J., and A. Ghosh. 2008. 'Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses', *Trends Neurosci*, 31: 82-9.

Hama, H., C. Hara, K. Yamaguchi, and A. Miyawaki. 2004. 'PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes', *Neuron*, 41: 405-15.

Harada, K., T. Kamiya, and T. Tsuboi. 2015. 'Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain', *Front Neurosci*, 9: 499.

Harris, G., H. Hogberg, T. Hartung, and L. Smirnova. 2017. '3D Differentiation of LUHMES Cell Line to Study Recovery and Delayed Neurotoxic Effects', *Curr Protoc Toxicol*, 73: 11 23 1-11 23 28.

Hayakawa, K., E. Esposito, X. Wang, Y. Terasaki, Y. Liu, C. Xing, X. Ji, and E. H. Lo. 2016. 'Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke', *Nature*, 535: 551-5.

Heller, J. P., and D. A. Rusakov. 2015. 'Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment', *Glia*, 63: 2133-51.

Hennekinne, L., S. Colasse, A. Triller, and M. Renner. 2013. 'Differential control of thrombospondin over synaptic glycine and AMPA receptors in spinal cord neurons', *J Neurosci*, 33: 11432-9.

Hoffmann, C., R. Sansevrino, G. Morabito, C. Logan, R. M. Vabulas, A. Ulusoy, M. Ganzella, and D. Milovanovic. 2021. 'Synapsin Condensates Recruit alpha-Synuclein', *J Mol Biol*, 433: 166961.

Holmes, B. B., S. L. DeVos, N. Kfoury, M. Li, R. Jacks, K. Yanamandra, M. O. Ouidja, F. M. Brodsky, J. Marasa, D. P. Bagchi, P. T. Kotzbauer, T. M. Miller, D. Papy-Garcia, and M. I. Diamond. 2013. 'Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E3138-47.

Hsu, L. J., M. Mallory, Y. Xia, I. Veinbergs, M. Hashimoto, M. Yoshimoto, L. J. Thal, T. Saitoh, and E. Masliah. 1998. 'Expression pattern of synucleins (non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/alpha-synuclein) during murine brain development', *J Neurochem*, 71: 338-44.

Hudak, A., E. Kusz, I. Domonkos, K. Josvay, A. T. Kodamullil, L. Szilak, M. Hofmann-Apitius, and T. Letoha. 2019. 'Contribution of syndecans to cellular uptake and fibrillation of alpha-synuclein and tau', *Sci Rep*, 9: 16543.

Hughes, E. G., S. B. Elmariah, and R. J. Balice-Gordon. 2010. 'Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis', *Mol Cell Neurosci*, 43: 136-45.

Ichtchenko, K., Y. Hata, T. Nguyen, B. Ullrich, M. Missler, C. Moomaw, and T. C. Sudhof. 1995. 'Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins', *Cell*, 81: 435-43.

Ihse, E., H. Yamakado, X. M. van Wijk, R. Lawrence, J. D. Esko, and E. Masliah. 2017. 'Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type', *Sci Rep*, 7: 9008.

Iwai, A., E. Masliah, M. Yoshimoto, N. Ge, L. Flanagan, H. A. de Silva, A. Kittel, and T. Saitoh. 1995. 'The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system', *Neuron*, 14: 467-75.

Jakes, R., M. G. Spillantini, and M. Goedert. 1994. 'Identification of two distinct synucleins from human brain', *FEBS Lett*, 345: 27-32.

Jan, A., N. P. Goncalves, C. B. Vaegter, P. H. Jensen, and N. Ferreira. 2021. 'The Prion-Like Spreading of Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: Update on Models and Hypotheses', *Int J Mol Sci*, 22.

Jang, A., H. J. Lee, J. E. Suk, J. W. Jung, K. P. Kim, and S. J. Lee. 2010. 'Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions', *J Neurochem*, 113: 1263-74.

Janz, R., T. C. Sudhof, R. E. Hammer, V. Unni, S. A. Siegelbaum, and V. Y. Bolshakov. 1999. 'Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I', *Neuron*, 24: 687-700.

Jellinger, K. A., and A. D. Korczyn. 2018. 'Are dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia the same disease?', *BMC Med*, 16: 34.

Jung, Y. J., and W. S. Chung. 2018. 'Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains', *Biomol Ther (Seoul)*, 26: 350-57.

Kang, L., G. M. Moriarty, L. A. Woods, A. E. Ashcroft, S. E. Radford, and J. Baum. 2012. 'N-terminal acetylation of alpha-synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer', *Protein Sci*, 21: 911-7.

Keith, D., and A. El-Husseini. 2008. 'Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse', *Front Mol Neurosci*, 1: 4.

Kettenmann, H., and A. Verkhratsky. 2008. 'Neuroglia: the 150 years after', *Trends Neurosci*, 31: 653-9.

Khakh, B. S., and M. V. Sofroniew. 2015. 'Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits', *Nat Neurosci*, 18: 942-52.

Kim, C., D. H. Ho, J. E. Suk, S. You, S. Michael, J. Kang, S. Joong Lee, E. Masliah, D. Hwang, H. J. Lee, and S. J. Lee. 2013. 'Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia', *Nat Commun*, 4: 1562.

Kim, T. D., S. R. Paik, C. H. Yang, and J. Kim. 2000. 'Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro', *Protein Sci*, 9: 2489-96.

Kim, W. S., K. Kagedal, and G. M. Halliday. 2014. 'Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases', *Alzheimers Res Ther*, 6: 73.

Kim, Y., J. Park, and Y. K. Choi. 2019. 'The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review', *Antioxidants (Basel)*, 8.

Kita, Y., K. Kawakami, Y. Takahashi, and F. Murakami. 2013. 'Development of cerebellar neurons and glias revealed by in utero electroporation: Golgi-like labeling of cerebellar neurons and glias', *PLoS One*, 8: e70091.

Ko, J. S., G. Pramanik, J. W. Um, J. S. Shim, D. Lee, K. H. Kim, G. Y. Chung, G. Condomitti, H. M. Kim, H. Kim, J. de Wit, K. S. Park, K. Tabuchi, and J. Ko. 2015. 'PTPsigma functions as a presynaptic receptor for the glypican-4/LRRTM4 complex and is essential for excitatory synaptic transmission', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 1874-9.

Kornau, H. C., P. H. Seeburg, and M. B. Kennedy. 1997. 'Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins', *Curr Opin Neurobiol*, 7: 368-73.

Krumova, P., E. Meulmeester, M. Garrido, M. Tirard, H. H. Hsiao, G. Bossis, H. Urlaub, M. Zweckstetter, S. Kugler, F. Melchior, M. Bahr, and J. H. Weishaupt. 2011. 'Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity', *J Cell Biol*, 194: 49-60.

Kucukdereli, H., N. J. Allen, A. T. Lee, A. Feng, M. I. Ozlu, L. M. Conatser, C. Chakraborty, G. Workman, M. Weaver, E. H. Sage, B. A. Barres, and C. Eroglu. 2011. 'Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: E440-9.

Kwon, S. E., and E. R. Chapman. 2011. 'Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons', *Neuron*, 70: 847-54.

Lanjakornsiripan, D., B. J. Pior, D. Kawaguchi, S. Furutachi, T. Tahara, Y. Katsuyama, Y. Suzuki, Y. Fukazawa, and Y. Gotoh. 2018. 'Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers', *Nat Commun*, 9: 1623.

Lavedan, C. 1998. 'The synuclein family', *Genome Res*, 8: 871-80.

Lee, H. J., S. M. Baek, D. H. Ho, J. E. Suk, E. D. Cho, and S. J. Lee. 2011. 'Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers', *Exp Mol Med*, 43: 216-22.

Lee, H. J., J. E. Suk, E. J. Bae, J. H. Lee, S. R. Paik, and S. J. Lee. 2008. 'Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein', *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 1835-49.

Lee, S. J. 2008. 'Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease', *J Mol Neurosci*, 34: 17-22.

Leube, R. E., B. Wiedenmann, and W. W. Franke. 1989. 'Topogenesis and sorting of synaptophysin: synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cells', *Cell*, 59: 433-46.

Levi-Montalcini, R., and V. Hamburger. 1951. 'Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo', *J Exp Zool*, 116: 321-61.

Levinson, J. N., N. Chery, K. Huang, T. P. Wong, K. Gerrow, R. Kang, O. Prange, Y. T. Wang, and A. El-Husseini. 2005. 'Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity', *J Biol Chem*, 280: 17312-9.

Lewis, K. A., Y. Su, O. Jou, C. Ritchie, C. Foong, L. S. Hynan, C. L. White, 3rd, P. J. Thomas, and K. J. Hatanpaa. 2010. 'Abnormal neurites containing C-terminally truncated alpha-synuclein are present in Alzheimer's disease without conventional Lewy body pathology', *Am J Pathol*, 177: 3037-50.

Li, W. W., R. Yang, J. C. Guo, H. M. Ren, X. L. Zha, J. S. Cheng, and D. F. Cai. 2007. 'Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice', *Neuroreport*, 18: 1543-6.

Li, Y. H., N. Gao, Y. W. Ye, X. Li, S. Yu, H. Yang, K. Ueda, and P. Chan. 2011. 'Alpha-synuclein functions as a negative regulator for expression of tyrosine hydroxylase', *Acta Neurol Belg*, 111: 130-5.

Liddelow, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Munch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, and B. A. Barres. 2017. 'Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia', *Nature*, 541: 481-87.

Lively, S., I. Moxon-Emre, and L. C. Schlichter. 2011. 'SC1/hevin and reactive gliosis after transient ischemic stroke in young and aged rats', *J Neuropathol Exp Neurol*, 70: 913-29.

Lou, H., S. E. Montoya, T. N. Alerte, J. Wang, J. Wu, X. Peng, C. S. Hong, E. E. Friedrich, S. A. Mader, C. J. Pedersen, B. S. Marcus, A. L. McCormack, D. A. Di Monte, S. C. Daubner, and R. G. Perez. 2010. 'Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo', *J Biol Chem*, 285: 17648-61.

Lu, Z., and J. Kipnis. 2010. 'Thrombospondin 1--a key astrocyte-derived neurogenic factor', *FASEB J*, 24: 1925-34.

Lucke, C., D. L. Gantz, E. Klimtchuk, and J. A. Hamilton. 2006. 'Interactions between fatty acids and alpha-synuclein', *J Lipid Res*, 47: 1714-24.

Lunati, A., S. Lesage, and A. Brice. 2018. 'The genetic landscape of Parkinson's disease', *Rev Neurol (Paris)*, 174: 628-43.

Lundgaard, I., M. J. Osorio, B. T. Kress, S. Sanggaard, and M. Nedergaard. 2014. 'White matter astrocytes in health and disease', *Neuroscience*, 276: 161-73.

Luth, E. S., T. Bartels, U. Dettmer, N. C. Kim, and D. J. Selkoe. 2015. 'Purification of alpha-synuclein from human brain reveals an instability of endogenous multimers as the protein approaches purity', *Biochemistry*, 54: 279-92.

Ma, K. L., L. K. Song, Y. H. Yuan, Y. Zhang, N. Han, K. Gao, and N. H. Chen. 2014. 'The nuclear accumulation of alpha-synuclein is mediated by importin alpha and promotes neurotoxicity by accelerating the cell cycle', *Neuropharmacology*, 82: 132-42.

Manzanza, N. O., L. Sedlackova, and R. N. Kalaria. 2021. 'Alpha-Synuclein Post-translational Modifications: Implications for Pathogenesis of Lewy Body Disorders', *Front Aging Neurosci*, 13: 690293.

Maroteaux, L., J. T. Campanelli, and R. H. Scheller. 1988. 'Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal', *J Neurosci*, 8: 2804-15.

Marotta, N. P., C. A. Cherwien, T. Abeywardana, and M. R. Pratt. 2012. 'O-GlcNAc modification prevents peptide-dependent acceleration of alpha-synuclein aggregation', *Chembiochem*, 13: 2665-70.

Marotta, N. P., Y. H. Lin, Y. E. Lewis, M. R. Ambroso, B. W. Zaro, M. T. Roth, D. B. Arnold, R. Langen, and M. R. Pratt. 2015. 'O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein alpha-synuclein associated with Parkinson's disease', *Nat Chem*, 7: 913-20.

Marsili, L., G. Rizzo, and C. Colosimo. 2018. 'Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease: From James Parkinson to the Concept of Prodromal Disease', *Front Neurol*, 9: 156.

Marui, W., E. Iseki, K. Ueda, and K. Kosaka. 2000. 'Occurrence of human alpha-synuclein immunoreactive neurons with neurofibrillary tangle formation in the limbic areas of patients with Alzheimer's disease', *J Neurol Sci*, 174: 81-4.

Masaracchia, C., M. Hnida, E. Gerhardt, T. Lopes da Fonseca, A. Villar-Pique, T. Branco, M. A. Stahlberg, C. Dean, C. O. Fernandez, I. Milosevic, and T. F. Outeiro. 2018. 'Membrane binding, internalization, and sorting of alpha-synuclein in the cell', *Acta Neuropathol Commun*, 6: 79.

Mavroeidi, P., and M. Xilouri. 2021. 'Neurons and Glia Interplay in alpha-Synucleinopathies', *Int J Mol Sci*, 22.

McKeith, I. G., B. F. Boeve, D. W. Dickson, G. Halliday, J. P. Taylor, D. Weintraub, D. Aarsland, J. Galvin, J. Attems, C. G. Ballard, A. Bayston, T. G. Beach, F. Blanc, N. Bohnen, L. Bonanni, J. Bras, P. Brundin, D. Burn, A. Chen-Plotkin, J. E. Duda, O. El-Agnaf, H. Feldman, T. J. Ferman, D. Ffytche, H. Fujishiro, D. Galasko, J. G. Goldman, S. N. Gomperts, N. R. Graff-Radford, L. S. Honig, A. Iranzo, K. Kantarci, D. Kaufer, W. Kukull, V. M. Y. Lee, J. B. Leverenz, S. Lewis, C. Lippa, A. Lunde, M. Masellis, E. Masliah, P. McLean, B. Mollenhauer, T. J. Montine, E. Moreno, E. Mori, M. Murray, J. T. O'Brien, S. Orimo, R. B. Postuma, S. Ramaswamy, O. A. Ross, D. P. Salmon, A. Singleton, A. Taylor, A. Thomas, P. Tiraboschi, J. B. Toledo, J. Q. Trojanowski, D. Tsuang, Z. Walker, M. Yamada, and K. Kosaka. 2017. 'Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium', *Neurology*, 89: 88-100.

McKinnon, R. D., S. Waldron, and M. E. Kiel. 2005. 'PDGF alpha-receptor signal strength controls an RTK rheostat that integrates phosphoinositol 3'-kinase and phospholipase Cgamma pathways during oligodendrocyte maturation', *J Neurosci*, 25: 3499-508.

Meade, R. M., D. P. Fairlie, and J. M. Mason. 2019. 'Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease - lessons and emerging principles', *Mol Neurodegener*, 14: 29.

Mederos, S., C. Gonzalez-Arias, and G. Perea. 2018. 'Astrocyte-Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function', *Front Synaptic Neurosci*, 10: 45.

Mendis, D. B., G. O. Ivy, and I. R. Brown. 2000. 'Induction of SC1 mRNA encoding a brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC following lesioning of the adult rat forebrain', *Neurochem Res*, 25: 1637-44.

Middleton, E. R., and E. Rhoades. 2010. 'Effects of curvature and composition on alpha-synuclein binding to lipid vesicles', *Biophys J*, 99: 2279-88.

Mikolaenko, I., O. Pletnikova, C. H. Kawas, R. O'Brien, S. M. Resnick, B. Crain, and J. C. Troncoso. 2005. 'Alpha-synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA)', *J Neuropathol Exp Neurol*, 64: 156-62.

Miller, R. H., and M. C. Raff. 1984. 'Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct', *J Neurosci*, 4: 585-92.

Molofsky, A. V., R. Krencik, E. M. Ullian, H. H. Tsai, B. Deneen, W. D. Richardson, B. A. Barres, and D. H. Rowitch. 2012. 'Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective', *Genes Dev*, 26: 891-907.

Moore, C. S., S. L. Abdullah, A. Brown, A. Arulpragasam, and S. J. Crocker. 2011. 'How factors secreted from astrocytes impact myelin repair', *J Neurosci Res*, 89: 13-21.

Mori, F., K. Tanji, M. Yoshimoto, H. Takahashi, and K. Wakabayashi. 2002. 'Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system', *Brain Res*, 941: 118-26.

Muller, C. M., and J. Best. 1989. 'Ocular dominance plasticity in adult cat visual cortex after transplantation of cultured astrocytes', *Nature*, 342: 427-30.

Nagai, J., A. K. Rajbhandari, M. R. Gangwani, A. Hachisuka, G. Coppola, S. C. Masmanidis, M. S. Fanselow, and B. S. Khakh. 2019. 'Hyperactivity with Disrupted Attention by Activation of an Astrocyte Synaptogenic Cue', *Cell*, 177: 1280-92 e20.

Nakai, M., M. Fujita, M. Waragai, S. Sugama, J. Wei, H. Akatsu, C. Ohtaka-Maruyama, H. Okado, and M. Hashimoto. 2007. 'Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage', *Biochem Biophys Res Commun*, 358: 104-10.

Nakajo, S., K. Tsukada, K. Omata, Y. Nakamura, and K. Nakaya. 1993. 'A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation', *Eur J Biochem*, 217: 1057-63.

Nave, K. A. 2010. 'Myelination and support of axonal integrity by glia', *Nature*, 468: 244-52.

Nielsen, M. S., H. Vorum, E. Lindersson, and P. H. Jensen. 2001. 'Ca2+ binding to alpha-synuclein regulates ligand binding and oligomerization', *J Biol Chem*, 276: 22680-4.

Ninkina, N. N., M. V. Alimova-Kost, J. W. Paterson, L. Delaney, B. B. Cohen, S. Imreh, N. V. Gnuchev, A. M. Davies, and V. L. Buchman. 1998. 'Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene', *Hum Mol Genet*, 7: 1417-24.

Nonaka, T., T. Iwatsubo, and M. Hasegawa. 2005. 'Ubiquitination of alpha-synuclein', *Biochemistry*, 44: 361-8.

Nuber, S., M. Rajsombath, G. Minakaki, J. Winkler, C. P. Muller, M. Ericsson, B. Caldarone, U. Dettmer, and D. J. Selkoe. 2018. 'Abrogating Native alpha-Synuclein Tetramers in Mice Causes a L-DOPA-Responsive Motor Syndrome Closely Resembling Parkinson's Disease', *Neuron*, 100: 75-90 e5.

Nuscher, B., F. Kamp, T. Mehnert, S. Odoy, C. Haass, P. J. Kahle, and K. Beyer. 2004. 'Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study', *J Biol Chem*, 279: 21966-75.

Oaks, A. W., M. Frankfurt, D. I. Finkelstein, and A. Sidhu. 2013. 'Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function', *PLoS One*, 8: e60378.

Oberheim, N. A., S. A. Goldman, and M. Nedergaard. 2012. 'Heterogeneity of astrocytic form and function', *Methods Mol Biol*, 814: 23-45.

Oberheim, N. A., T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann, B. R. Ransom, S. A. Goldman, and M. Nedergaard. 2009. 'Uniquely hominid features of adult human astrocytes', *J Neurosci*, 29: 3276-87.

Oberheim, N. A., X. Wang, S. Goldman, and M. Nedergaard. 2006. 'Astrocytic complexity distinguishes the human brain', *Trends Neurosci*, 29: 547-53.

Ono, K., H. Takebayashi, K. Ikeda, M. Furusho, T. Nishizawa, K. Watanabe, and K. Ikenaka. 2008. 'Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium', *Dev Biol*, 320: 456-68.

Ostrerova, N., L. Petrucelli, M. Farrer, N. Mehta, P. Choi, J. Hardy, and B. Wolozin. 1999. 'alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins', *J Neurosci*, 19: 5782-91.

Outeiro, T. F., D. J. Koss, D. Erskine, L. Walker, M. Kurzawa-Akanbi, D. Burn, P. Donaghy, C. Morris, J. P. Taylor, A. Thomas, J. Attems, and I. McKeith. 2019. 'Dementia with Lewy bodies: an update and outlook', *Mol Neurodegener*, 14: 5.

Paciotti, S., G. Bellomo, L. Gatticchi, and L. Parnetti. 2018. 'Are We Ready for Detecting alpha-Synuclein Prone to Aggregation in Patients? The Case of "Protein-Misfolding Cyclic Amplification" and "Real-Time Quaking-Induced Conversion" as Diagnostic Tools', *Front Neurol*, 9: 415.

Paleologou, K. E., A. Oueslati, G. Shakked, C. C. Rospigliosi, H. Y. Kim, G. R. Lamberto, C. O. Fernandez, A. Schmid, F. Chegini, W. P. Gai, D. Chiappe, M. Moniatte, B. L. Schneider, P. Aebischer, D. Eliezer, M. Zweckstetter, E. Masliah, and H. A. Lashuel. 2010. 'Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions', *J Neurosci*, 30: 3184-98.

Papp, M. I., J. E. Kahn, and P. L. Lantos. 1989. 'Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome)', *J Neurol Sci*, 94: 79-100.

Pasanen, P., L. Myllykangas, M. Siitonen, A. Raunio, S. Kaakkola, J. Lyytinen, P. J. Tienari, M. Poyhonen, and A. Paetau. 2014. 'Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology', *Neurobiol Aging*, 35: 2180 e1-5.

Payton, J. E., R. J. Perrin, W. S. Woods, and J. M. George. 2004. 'Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein', *J Mol Biol*, 337: 1001-9.

Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque. 2009. 'Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information', *Trends Neurosci*, 32: 421-31.

Perrin, R. J., W. S. Woods, D. F. Clayton, and J. M. George. 2000. 'Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis', *J Biol Chem*, 275: 34393-8.

Petersen, K., O. F. Olesen, and J. D. Mikkelsen. 1999. 'Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex', *Neuroscience*, 91: 651-9.

Pfrieger, F. W., and B. A. Barres. 1997. 'Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro', *Science*, 277: 1684-7.

Pierce, S. E., T. Tyson, A. Booms, J. Prahl, and G. A. Coetzee. 2018. 'Parkinson's disease genetic risk in a midbrain neuronal cell line', *Neurobiol Dis*, 114: 53-64.

Prange, O., T. P. Wong, K. Gerrow, Y. T. Wang, and A. El-Husseini. 2004. 'A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13915-20.

Puro, D. G., J. J. Hwang, O. J. Kwon, and H. Chin. 1996. 'Characterization of an L-type calcium channel expressed by human retinal Muller (glial) cells', *Brain Res Mol Brain Res*, 37: 41-8.

Qi, Y., J. K. Wang, M. McMillian, and D. M. Chikaraishi. 1997. 'Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation', *J Neurosci*, 17: 1217-25.

Raff, M. C., E. R. Abney, J. Cohen, R. Lindsay, and M. Noble. 1983. 'Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics', *J Neurosci*, 3: 1289-300.

Rao, A., E. Kim, M. Sheng, and A. M. Craig. 1998. 'Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture', *J Neurosci*, 18: 1217-29.

Rappley, I., A. D. Gitler, P. E. Selvy, M. J. LaVoie, B. D. Levy, H. A. Brown, S. Lindquist, and D. J. Selkoe. 2009. 'Evidence that alpha-synuclein does not inhibit phospholipase D', *Biochemistry*, 48: 1077-83.

Rappley, I., D. S. Myers, S. B. Milne, P. T. Ivanova, M. J. Lavoie, H. A. Brown, and D. J. Selkoe. 2009. 'Lipidomic profiling in mouse brain reveals differences between ages and genders, with smaller changes associated with alpha-synuclein genotype', *J Neurochem*, 111: 15-25.

Regan, M. R., Y. H. Huang, Y. S. Kim, M. I. Dykes-Hoberg, L. Jin, A. M. Watkins, D. E. Bergles, and J. D. Rothstein. 2007. 'Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS', *J Neurosci*, 27: 6607-19.

Reyes, J. F., C. Sackmann, A. Hoffmann, P. Svenningsson, J. Winkler, M. Ingelsson, and M. Hallbeck. 2019. 'Binding of alpha-synuclein oligomers to Cx32 facilitates protein uptake and transfer in neurons and oligodendrocytes', *Acta Neuropathol*, 138: 23-47.

Risher, W. C., and C. Eroglu. 2012. 'Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system', *Matrix Biol*, 31: 170-7.

Risher, W. C., N. Kim, S. Koh, J. E. Choi, P. Mitev, E. F. Spence, L. J. Pilaz, D. Wang, G. Feng, D. L. Silver, S. H. Soderling, H. H. Yin, and C. Eroglu. 2018. 'Thrombospondin receptor alpha2delta-1 promotes synaptogenesis and spinogenesis via postsynaptic Rac1', *J Cell Biol*, 217: 3747-65.

Rizzoli, S. O., and W. J. Betz. 2005. 'Synaptic vesicle pools', *Nat Rev Neurosci*, 6: 57-69.

Rostami, J., S. Holmqvist, V. Lindstrom, J. Sigvardson, G. T. Westermark, M. Ingelsson, J. Bergstrom, L. Roybon, and A. Erlandsson. 2017. 'Human Astrocytes Transfer Aggregated Alpha-Synuclein via Tunneling Nanotubes', *J Neurosci*, 37: 11835-53.

Rott, R., R. Szargel, V. Shani, H. Hamza, M. Savyon, F. Abd Elghani, R. Bandopadhyay, and S. Engelender. 2017. 'SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate alpha-synuclein degradation and pathological aggregation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 13176-81.

Sanes, J. R., and J. W. Lichtman. 1999. 'Development of the vertebrate neuromuscular junction', *Annu Rev Neurosci*, 22: 389-442.

Santos, J., I. Pallares, and S. Ventura. 2022. 'Is a cure for Parkinson's disease hiding inside us?', *Trends Biochem Sci*, 47: 641-44.

Sara, Y., T. Biederer, D. Atasoy, A. Chubykin, M. G. Mozhayeva, T. C. Sudhof, and E. T. Kavalali. 2005. 'Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly', *J Neurosci*, 25: 260-70.

Scheiffele, P., J. Fan, J. Choih, R. Fetter, and T. Serafini. 2000. 'Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons', *Cell*, 101: 657-69.

Schikorski, T., and C. F. Stevens. 1997. 'Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses', *J Neurosci*, 17: 5858-67.

Schipper, H. M., A. Liberman, and E. G. Stopa. 1998. 'Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease', *Exp Neurol*, 150: 60-8.

Schmidt, S., D. M. Vogt Weisenhorn, and W. Wurst. 2022. 'Chapter 5 - "Parkinson's disease - A role of non-enzymatic posttranslational modifications in disease onset and progression?"', *Mol Aspects Med*, 86: 101096.

Scholz, D., D. Poltl, A. Genewsky, M. Weng, T. Waldmann, S. Schildknecht, and M. Leist. 2011. 'Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line', *J Neurochem*, 119: 957-71.

Sengul, B., E. Dursun, A. Verkhratsky, and D. Gezen-Ak. 2020. 'Overexpression of alpha-Synuclein Reorganises Growth Factor Profile of Human Astrocytes', *Mol Neurobiol*.

———. 2021. 'Overexpression of alpha-Synuclein Reorganises Growth Factor Profile of Human Astrocytes', *Mol Neurobiol*, 58: 184-203.

Shan, L., T. Zhang, K. Fan, W. Cai, and H. Liu. 2021. 'Astrocyte-Neuron Signaling in Synaptogenesis', *Front Cell Dev Biol*, 9: 680301.

Sharma, M., and J. Burre. 2023. 'alpha-Synuclein in synaptic function and dysfunction', *Trends Neurosci*, 46: 153-66.

Shy, G. M., and G. A. Drager. 1960. 'A neurological syndrome associated with orthostatic hypotension: a clinical-pathologic study', *Arch Neurol*, 2: 511-27.

Singh, S. K., J. A. Stogsdill, N. S. Pulimood, H. Dingsdale, Y. H. Kim, L. J. Pilaz, I. H. Kim, A. C. Manhaes, W. S. Rodrigues, Jr., A. Pamukcu, E. Enustun, Z. Ertuz, P. Scheiffele, S. H. Soderling, D. L. Silver, R. R. Ji, A. E. Medina, and C. Eroglu. 2016. 'Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1alpha and NL1 via Hevin', *Cell*, 164: 183-96.

Smith, B. R., M. B. Santos, M. S. Marshall, L. Cantuti-Castelvetri, A. Lopez-Rosas, G. Li, R. van Breemen, K. I. Claycomb, J. I. Gallea, M. S. Celej, S. J. Crocker, M. I. Givogri, and E. R. Bongarzone. 2014. 'Neuronal inclusions of alpha-synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease', *J Pathol*, 232: 509-21.

Sofroniew, M. V. 2009. 'Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation', *Trends Neurosci*, 32: 638-47.

Sofroniew, M. V., C. L. Howe, and W. C. Mobley. 2001. 'Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair', *Annu Rev Neurosci*, 24: 1217-81.

Sofroniew, M. V., and H. V. Vinters. 2010. 'Astrocytes: biology and pathology', *Acta Neuropathol*, 119: 7-35.

Soldner, F., Y. Stelzer, C. S. Shivalila, B. J. Abraham, J. C. Latourelle, M. I. Barrasa, J. Goldmann, R. H. Myers, R. A. Young, and R. Jaenisch. 2016. 'Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression', *Nature*, 533: 95-9.

Sosunov, A. A., X. Wu, N. M. Tsankova, E. Guilfoyle, G. M. McKhann, 2nd, and J. E. Goldman. 2014. 'Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain', *J Neurosci*, 34: 2285-98.

Spacek, J. 1985. 'Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study', *Anat Embryol (Berl)*, 173: 129-35.

Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert. 1998. 'alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6469-73.

Spillantini, M. G., A. Divane, and M. Goedert. 1995. 'Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35', *Genomics*, 27: 379-81.

Stefanova, N., L. Fellner, M. Reindl, E. Masliah, W. Poewe, and G. K. Wenning. 2011. 'Toll-like receptor 4 promotes alpha-synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons', *Am J Pathol*, 179: 954-63.

Striessnig, J., N. J. Ortner, and A. Pinggera. 2015. 'Pharmacology of L-type Calcium Channels: Novel Drugs for Old Targets?', *Curr Mol Pharmacol*, 8: 110-22.

Su, R., and T. Zhou. 2021. 'Alpha-Synuclein Induced Immune Cells Activation and Associated Therapy in Parkinson's Disease', *Front Aging Neurosci*, 13: 769506.

Sudhof, T. C. 2017. 'Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits', *Cell*, 171: 745-69.

Sun, J., L. Wang, H. Bao, S. Premi, U. Das, E. R. Chapman, and S. Roy. 2019. 'Functional cooperation of alpha-synuclein and VAMP2 in synaptic vesicle recycling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 11113-15.

Surguchov, A., B. McMahan, E. Masliah, and I. Surgucheva. 2001. 'Synucleins in ocular tissues', *J Neurosci Res*, 65: 68-77.

Suzuki, G., S. Imura, M. Hosokawa, R. Katsumata, T. Nonaka, S. I. Hisanaga, Y. Saeki, and M. Hasegawa. 2020. 'alpha-synuclein strains that cause distinct pathologies differentially inhibit proteasome', *Elife*, 9.

Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, and R. Jahn. 2006. 'Molecular anatomy of a trafficking organelle', *Cell*, 127: 831-46.

Takano, T., N. Oberheim, M. L. Cotrina, and M. Nedergaard. 2009. 'Astrocytes and ischemic injury', *Stroke*, 40: S8-12.

Takouda, J., S. Katada, and K. Nakashima. 2017. 'Emerging mechanisms underlying astrogenesis in the developing mammalian brain', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 93: 386-98.

Tao-Cheng, J. H. 2006. 'Activity-related redistribution of presynaptic proteins at the active zone', *Neuroscience*, 141: 1217-24.

Tasdemir-Yilmaz, O. E., and M. R. Freeman. 2014. 'Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons', *Genes Dev*, 28: 20-33.

Thayanidhi, N., J. R. Helm, D. C. Nycz, M. Bentley, Y. Liang, and J. C. Hay. 2010. 'Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs', *Mol Biol Cell*, 21: 1850-63.

Toledo, J. B., N. J. Cairns, X. Da, K. Chen, D. Carter, A. Fleisher, E. Householder, N. Ayutyanont, A. Roontiva, R. J. Bauer, P. Eisen, L. M. Shaw, C. Davatzikos, M. W. Weiner, E. M. Reiman, J. C. Morris, J. Q. Trojanowski, and Initiative Alzheimer's Disease Neuroimaging. 2013. 'Clinical and multimodal biomarker correlates of ADNI neuropathological findings', *Acta Neuropathol Commun*, 1: 65.

Tong, Z. B., H. Hogberg, D. Kuo, S. Sakamuru, M. Xia, L. Smirnova, T. Hartung, and D. Gerhold. 2017. 'Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening', *J Appl Toxicol*, 37: 167-80.

Toni, M., and C. Cioni. 2015. 'Fish Synucleins: An Update', *Mar Drugs*, 13: 6665-86.

Totterdell, S., D. Hanger, and G. E. Meredith. 2004. 'The ultrastructural distribution of alpha-synuclein-like protein in normal mouse brain', *Brain Res*, 1004: 61-72.

Tousi, B. 2017. 'Diagnosis and Management of Cognitive and Behavioral Changes in Dementia With Lewy Bodies', *Curr Treat Options Neurol*, 19: 42.

Trojanowski, J. Q. 2002. '"Emerging Alzheimer's disease therapies: focusing on the future"', *Neurobiol Aging*, 23: 985-90.

Trompetero, A., A. Gordillo, M. C. Del Pilar, V. M. Cristina, and R. H. Bustos Cruz. 2018. 'Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Review of Current Treatment Adopting a Nanotechnology Approach', *Curr Pharm Des*, 24: 22-45.

Trotter, J. H., J. Hao, S. Maxeiner, T. Tsetsenis, Z. Liu, X. Zhuang, and T. C. Sudhof. 2019. 'Synaptic neurexin-1 assembles into dynamically regulated active zone nanoclusters', *J Cell Biol*, 218: 2677-98.

Tsunemi, T., Y. Ishiguro, A. Yoroisaka, C. Valdez, K. Miyamoto, K. Ishikawa, S. Saiki, W. Akamatsu, N. Hattori, and D. Krainc. 2020. 'Astrocytes Protect Human Dopaminergic Neurons from alpha-Synuclein Accumulation and Propagation', *J Neurosci*, 40: 8618-28.

Tucker, R. P., J. C. Adams, and J. Lawler. 1995. 'Thrombospondin-4 is expressed by early osteogenic tissues in the chick embryo', *Dev Dyn*, 203: 477-90.

Tushaus, J., E. S. Kataka, J. Zaucha, D. Frishman, S. A. Muller, and S. F. Lichtenthaler. 2021. 'Neuronal Differentiation of LUHMES Cells Induces Substantial Changes of the Proteome', *Proteomics*, 21: e2000174.

Twohig, D., and H. M. Nielsen. 2019. 'alpha-synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease', *Mol Neurodegener*, 14: 23.

Ueda, K., H. Fukushima, E. Masliah, Y. Xia, A. Iwai, M. Yoshimoto, D. A. Otero, J. Kondo, Y. Ihara, and T. Saitoh. 1993. 'Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 11282-6.

Ullian, E. M., S. K. Sapperstein, K. S. Christopherson, and B. A. Barres. 2001. 'Control of synapse number by glia', *Science*, 291: 657-61.

Uversky, V. N. 2003. 'A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders', *J Biomol Struct Dyn*, 21: 211-34.

Uversky, V. N., M. Cooper E, K. S. Bower, J. Li, and A. L. Fink. 2002. 'Accelerated alpha-synuclein fibrillation in crowded milieu', *FEBS Lett*, 515: 99-103.

Varkey, J., J. M. Isas, N. Mizuno, M. B. Jensen, V. K. Bhatia, C. C. Jao, J. Petrlova, J. C. Voss, D. G. Stamou, A. C. Steven, and R. Langen. 2010. 'Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins', *J Biol Chem*, 285: 32486-93.

Verkhratsky, A., and M. Nedergaard. 2018. 'Physiology of Astroglia', *Physiol Rev*, 98: 239-389.

Vidovic, M., and M. G. Rikalovic. 2022. 'Alpha-Synuclein Aggregation Pathway in Parkinson's Disease: Current Status and Novel Therapeutic Approaches', *Cells*, 11.

Volterra, A., and J. Meldolesi. 2005. 'Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues', *Nat Rev Neurosci*, 6: 626-40.

Wang, B., W. Guo, and Y. Huang. 2012. 'Thrombospondins and synaptogenesis', *Neural Regen Res*, 7: 1737-43.

Wang, B., R. Underwood, A. Kamath, C. Britain, M. B. McFerrin, P. J. McLean, L. A. Volpicelli-Daley, R. H. Whitaker, W. J. Placzek, K. Becker, J. Ma, and T. A. Yacoubian. 2018. '14-3-3 Proteins Reduce Cell-to-Cell Transfer and Propagation of Pathogenic alpha-Synuclein', *J Neurosci*, 38: 8211-32.

Wang, L., U. Das, D. A. Scott, Y. Tang, P. J. McLean, and S. Roy. 2014. 'alpha-synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling', *Curr Biol*, 24: 2319-26.

Wang, W., I. Perovic, J. Chittuluru, A. Kaganovich, L. T. Nguyen, J. Liao, J. R. Auclair, D. Johnson, A. Landeru, A. K. Simorellis, S. Ju, M. R. Cookson, F. J. Asturias, J. N. Agar, B. N. Webb, C. Kang, D. Ringe, G. A. Petsko, T. C. Pochapsky, and Q. Q. Hoang. 2011. 'A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17797-802.

Wang, X., S. Yu, F. Li, and T. Feng. 2015. 'Detection of alpha-synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease', *Neurosci Lett*, 599: 115-9.

Weber, B., and L. F. Barros. 2015. 'The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.

Wenning, G. K., F. Geser, F. Krismer, K. Seppi, S. Duerr, S. Boesch, M. Kollensperger, G. Goebel, K. P. Pfeiffer, P. Barone, M. T. Pellecchia, N. P. Quinn, V. Koukouni, C. J. Fowler, A. Schrag, C. J. Mathias, N. Giladi, T. Gurevich, E. Dupont, K. Ostergaard, C. F. Nilsson, H. Widner, W. Oertel, K. M. Eggert, A. Albanese, F. del Sorbo, E. Tolosa, A. Cardozo, G. Deuschl, H. Hellriegel, T. Klockgether, R. Dodel, C. Sampaio, M. Coelho, R. Djaldetti, E. Melamed, T. Gasser, C. Kamm, G. Meco, C. Colosimo, O. Rascol, W. G. Meissner, F. Tison, W. Poewe, and Group European Multiple System Atrophy Study. 2013. 'The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study', *Lancet Neurol*, 12: 264-74.

Wersinger, C., M. Rusnak, and A. Sidhu. 2006. 'Modulation of the trafficking of the human serotonin transporter by human alpha-synuclein', *Eur J Neurosci*, 24: 55-64.

Wiedenmann, B., and W. W. Franke. 1985. 'Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles', *Cell*, 41: 1017-28.

Wilson, D. A., A. R. Best, and R. M. Sullivan. 2004. 'Plasticity in the olfactory system: lessons for the neurobiology of memory', *Neuroscientist*, 10: 513-24.

Withers, G. S., J. M. George, G. A. Banker, and D. F. Clayton. 1997. 'Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons', *Brain Res Dev Brain Res*, 99: 87-94.

Woerman, A. L., J. C. Watts, A. Aoyagi, K. Giles, L. T. Middleton, and S. B. Prusiner. 2018. 'alpha-Synuclein: Multiple System Atrophy Prions', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.

Xu, J., N. Xiao, and J. Xia. 2010. 'Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1', *Nat Neurosci*, 13: 22-4.

Yamagata, K. 2021. 'Astrocyte-induced synapse formation and ischemic stroke', *J Neurosci Res*, 99: 1401-13.

Yan, Q., and E. H. Sage. 1999. 'SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions', *J Histochem Cytochem*, 47: 1495-506.

Yang, Y., and R. Jackson. 2019. 'Astrocyte identity: evolutionary perspectives on astrocyte functions and heterogeneity', *Curr Opin Neurobiol*, 56: 40-46.

Ysselstein, D., M. Joshi, V. Mishra, A. M. Griggs, J. M. Asiago, G. P. McCabe, L. A. Stanciu, C. B. Post, and J. C. Rochet. 2015. 'Effects of impaired membrane interactions on alpha-synuclein aggregation and neurotoxicity', *Neurobiol Dis*, 79: 150-63.

Yu, S., X. Li, G. Liu, J. Han, C. Zhang, Y. Li, S. Xu, C. Liu, Y. Gao, H. Yang, K. Ueda, and P. Chan. 2007. 'Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody', *Neuroscience*, 145: 539-55.

Zarranz, J. J., J. Alegre, J. C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atares, V. Llorens, E. Gomez Tortosa, T. del Ser, D. G.

Munoz, and J. G. de Yebenes. 2004. 'The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia', *Ann Neurol*, 55: 164-73.

Zhang, D., A. Kanthasamy, V. Anantharam, and A. Kanthasamy. 2011. 'Effects of manganese on tyrosine hydroxylase (TH) activity and TH-phosphorylation in a dopaminergic neural cell line', *Toxicol Appl Pharmacol*, 254: 65-71.

Zhang, H., L. A. Etherington, A. S. Hafner, D. Belelli, F. Coussen, P. Delagrange, F. Chaouloff, M. Spedding, J. J. Lambert, D. Choquet, and L. Groc. 2013. 'Regulation of AMPA receptor surface trafficking and synaptic plasticity by a cognitive enhancer and antidepressant molecule', *Mol Psychiatry*, 18: 471-84.

Zhang, H., A. Kouadio, D. Cartledge, and A. K. Godwin. 2011. 'Role of gamma-synuclein in microtubule regulation', *Exp Cell Res*, 317: 1330-9.

Zhang, J., X. Li, and J. D. Li. 2019. 'The Roles of Post-translational Modifications on alpha-Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases', *Front Neurosci*, 13: 381.

Zhang, S., Y. Q. Liu, C. Jia, Y. J. Lim, G. Feng, E. Xu, H. Long, Y. Kimura, Y. Tao, C. Zhao, C. Wang, Z. Liu, J. J. Hu, M. R. Ma, Z. Liu, L. Jiang, D. Li, R. Wang, V. L. Dawson, T. M. Dawson, Y. M. Li, X. Mao, and C. Liu. 2021. 'Mechanistic basis for receptor-mediated pathological alpha-synuclein fibril cell-to-cell transmission in Parkinson's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.

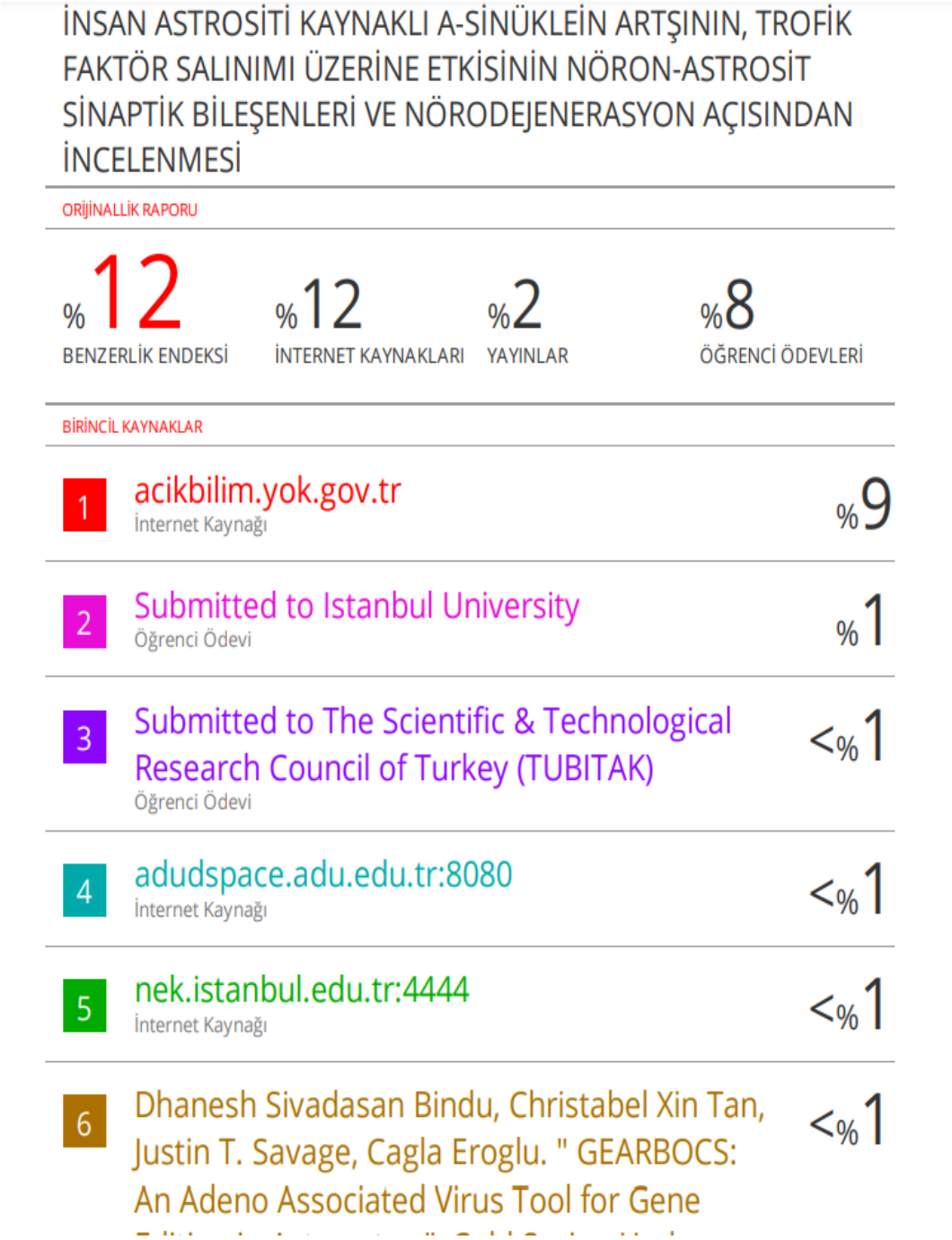
Zhang, X. M., M. Yin, and M. H. Zhang. 2014. 'Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells', *Acta Pharmacol Sin*, 35: 945-56.

Zhang, Y., K. Chen, S. A. Sloan, M. L. Bennett, A. R. Scholze, S. O'Keeffe, H. P. Phatnani, P. Guarnieri, C. Caneda, N. Ruderisch, S. Deng, S. A. Liddelow, C. Zhang, R. Daneman, T. Maniatis, B. A. Barres, and J. Q. Wu. 2014. 'An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex', *J Neurosci*, 34: 11929-47.

Zhu, X., D. E. Bergles, and A. Nishiyama. 2008. 'NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes', *Development*, 135: 145-57.

# EKLER

# İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



İNSAN ASTROSİTİ KAYNAKLI A-SİNÜKLEİN ARTŞININ, TROFİK FAKTÖR SALINIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN NÖRON-ASTROSİT SİNAPTİK BİLEŞENLERİ VE NÖRODEJENERASYON AÇISINDAN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

| %12 | %12 | %2 | %8 |
|---|---|---|---|
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | acikbilim.yok.gov.tr<br>İnternet Kaynağı | %9 |
| 2 | Submitted to Istanbul University<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 3 | Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 4 | adudspace.adu.edu.tr:8080<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 5 | nek.istanbul.edu.tr:4444<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | Dhanesh Sivadasan Bindu, Christabel Xin Tan, Justin T. Savage, Cagla Eroglu. " GEARBOCS: An Adeno Associated Virus Tool for Gene | <%1 |