



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ALFA SİNÜKLEİN İLE İNDÜKLENEN İN-VİTRO PARKİNSON
MODELİNDE HİSTON ASETİLASYONUNUN MİKROGLİAL
ANTİJEN SUNUMU ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Caner GÜNAYDIN

Danışman

Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

SAMSUN
2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI



**ALFA SİNÜKLEİN İLE İNDÜKLENEN İN-VİTRO PARKİNSON
MODELİNDE HİSTON ASETİLASYONUNUN MİKROGLİAL
ANTİJEN SUNUMU ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Caner GÜNAYDIN

Danışman

Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

SAMSUN
2021

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.19.018 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım doktora sanatta yeterlilik tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynaklarda gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. Bölüm 9. Maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

09/03/2021

Caner GÜNAYDIN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Alfa Sinüklein ile İndüklenen İn-vitro Parkinson Modelinde Histon asetilasyonunun Mikroglial Antijen Sunumu Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 19.10.2020 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı: %5

Tek kaynak oranı: %1 çıkmıştır.

18/02/ 2021

S. Sırrı BİLGE

ÖZET

ALFA SİNÜKLEİN İLE İNDÜKLENEN İN-VİTRO PARKİNSON MODELİNDE HİSTON ASETİLASYONUNUN MİKROGLİAL ANTİJEN SUNUMU ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Caner GÜNAYDIN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı,

Doktora Tezi, Nisan/2021

Danışman: Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

Parkinson hastalığı (PH), çeşitli genetik ve epigenetik faktörlerden etkilenen kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. Epigenetik faktörler bağlamında, histon asetilasyonu, Parkinson hastalığının ilerlemesi ile ilişkili mekanizmalardan biridir. Bu çalışmanın amacı, α -sinüklein ile mikroglial hücreleri indükledikten sonra farmakolojik ajanlar ile histon asetilasyon artışının antijen sunumuna etkilerini araştırmaktır. In vitro Parkinson hastalığı modeli BV-2 mikroglial hücre hattına α -sinüklein uygulaması ile oluşturuldu. Histon asetilasyonunu arttırmak için BV-2 hücrelerine α -sinüklein varlığında CUDC-907 ve TMP-195 uygulandı. Antijen sunumu majör doku uygunluk kompleksi-II (MHC-II) ve sınıf-II majör doku uygunluk kompleksi aktivatörü (CIITA) ekspresyon seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirildi. Deney sonuçları, α -sinüklein'in MHC-II ekspresyonunu anlamlı olarak artırdığını ve bu etkinin α -sinüklein'in 6 saat uygulamasında en şiddetli olduğunu gösterdi. CUDC-907 ve TMP-195'in α -sinüklein ile birlikte uygulanmasında MHC-II seviyelerinin anlamlı olarak arttığı ve bu artışın CUDC-907'de daha şiddetli olduğu görüldü. Buna ek olarak α -sinüklein uygulamasına bağlı CIITA ekspresyonunun MHC-II'ye benzer şekilde kontrole kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı görüldü. Bu artışın MHC-II ekspresyonunda olduğu gibi CUDC-907 ve TMP-195 uygulamasıyla arttığı ve bu artışın CUDC-907'de daha şiddetli olduğu görüldü. MHC-II ve CIITA ekspresyonundaki bu değişiklikler histon asetilasyonun α -sinüklein veya CUDC-907 ve TMP-195 gibi histon deasetilaz inhibitörleriyle (HDAi) seviyelerinin artması sonucu mikroglial hücrelerin antijen sunum özelliklerinin artırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar mikroglial antijen sunumunun Parkinson hastalığı patolojisinde önemli role sahip olduğunu ve α -sinüklein'in bu mekanizmada rol aldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: α -sinüklein, BV-2 mikroglia, histon asetilasyonu, Parkinson hastalığı.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THE HISTONE ACETYLATION ON MICROGLIAL ANTIGEN PRESENTATION IN THE ALPHA SYNUCLEIN- INDUCED IN VITRO MODEL OF THE PARKINSON'S DISEASE

Caner GÜNAYDIN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Pharmacology

PhD, January/2021

Supervisor: Prof. S. Sırrı BİLGE

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder that is affected by several genetic and epigenetic factors. In the context of epigenetic factors, histone acetylation is one of the most associated mechanisms with the progression of Parkinson's disease. The main aim of this study to investigate the effects of the increase of histone acetylation with pharmacological agents on antigen presentation, after the inducing microglial cells with α -synuclein. In vitro Parkinson's disease model was created with α -synuclein application to BV-2 microglial cell line. BV-2 cells were co-treated with CUDC-907 and TMP-195 for increasing histone acetylation in the presence of α -synuclein. Antigen representation was evaluated with determining expression levels of major histocompatibility complex-II (MHC-II) and class-II major histocompatibility complex (CIITA). The experimental results showed that α -synuclein significantly increased MHC-II expression, and this effect was most severe at 6 hours administration of α -synuclein. When CUDC-907 and TMP-195 were administered together with α -synuclein, it was observed that MHC-II levels increased significantly and that increase was more severe in CUDC-907. In addition, CIITA expression levels were significantly increased with α -synuclein administration compared to control which were consistent with MHC-II expression levels. It was observed that increase in the CIITA expression levels was intensified with the administration of CUDC-907 and TMP-195 with α -synuclein, and that in line with MHC-II expression results and that increase was more severe in CUDC-907. These changes in MHC-II and CIITA expression indicate that histone acetylation increases the antigen presentation properties of microglial cells as a result of α -synuclein or histone deacetylase inhibitor (HDAi) administration. Our results show that microglial antigen presentation has an important role in the pathology of Parkinson's disease and α -synuclein plays a primary role in this mechanism.

Key words: Alpha synuclein, BV-2 microglia, histone acetylation, Parkinson's disease.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Parkinson hastalığı dünyada Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığı tremor, rijidite, akinezi ile karakterize, hastaları ve toplumları sosyal ve ekonomik olarak etkileyen günümüzde ancak semptomatik tedavinin sağlanabildiği bir hastalıktır. Mevcut tedavilerde görülen yan etkiler ve ilaca karşı oluşan direnç yeni tedavi ihtiyaçlarının temelini oluşturmaktadır. Ayrıca son yıllarda hastalığın temel patolojisine neden olduğu düşünülen α -sinüklein birikimi öne çıkarak tedavi arayışlarını bunu yöne kaydırmıştır. Parkinson hastalığının ve α -sinüklein birikiminin patofizyolojik mekanizmalarının aydınlatılması için birçok deneysel yöntem kullanılmaktadır. Ancak hastalığın epidemiyolojisinde ve etyolojisinde bulunan birçok risk faktörü hastalığın özellikle deney hayvanlarında taklit edilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak patolojinin temel mekanizmasının başarılı bir şekilde taklit edilebildiği in vitro yöntemlerin varlığı olası mekanizmaların araştırılmasının önünü açmıştır. Epigenetik ve genetik etkenlerin hastalığın patolojisinde oynadığı rol göz önüne alındığında hücrel modellerde bu etkilerin araştırılmasının yeni tedavi hedefleri arayışları için temel oluşturacağı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında bu tezde aşağıdaki soruların cevapları aranmıştır;

- Mikroglial hücreler fibril formdaki α -sinüklein'e karşı antijen sunumundan sorumlu proteinleri sentezliyor mu?
- Mikroglial hücrelerin fibril formdaki α -sinüklein ile karşılaşması antijen sunumundan sorumlu genetik elementleri etkiliyor mu?
- Mikroglial hücrelerin fibril formdaki α -sinüklein ile karşılaşması farmakolojik ajanlarla oluşturulan histon asetilasyonunun artırılmasından etkileniyor mu?

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Parkinson hastalığının temel bir mekanizması aydınlatılmıştır. Ayrıca bu artış histon asetilasyonunun farmakolojik ajanlarla artırılması durumunda şiddetlenmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda epigenetik bir modifikasyon olan histon asetilasyonunun hastalığın temel mekanizmalarından olan antijen sunumunu artırdığını göstermektedir. Bu tezden elde ettiğimiz sonuçlar yeni tedavi arayışları için olası hedeflerin kazanılmasına katkı sunabilir.

Çalışmalarım ve eğitimim boyunca değerli bilgi, yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilime ve akademik hayata karşı bakış açısı kazandırarak her zaman destek sağlayan danışman hocam sayın Prof. Dr. S.Sırrı BİLGE'ye, tez çalışmamdaki değerli bilgi ve katkıları için sayın Doç. Dr. Bahattin AVCI hocama, çalışmam için gerekli laboratuvar imkanlarının sağlanması ve çalışma materyallerinin toplanmasında önemli katkılar sağlayan OMÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Nurten KARA'ya, Groningen Üniversitesi Moleküler Biyokimya Anabilim Dalının değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Arjan Kortholt'a, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Nihan Cankara'ya ve başta eşim Ece Günaydın olmak üzere, her zaman yanımda olup beni destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Parkinson hastalığı.....	3
2.1.1. Tanım ve tarihçe.....	3
2.1.2. Epidemiyolojisi.....	4
2.1.3. Etiyolojisi ve risk faktörleri.....	4
2.1.4. Patolojisi.....	8
2.1.5. Mikroglialar ve mikroglial aktivasyon.....	9
2.1.6. Otoimmünite.....	11
2.1.7. Epigenetik.....	15
2.1.8. Parkinson hastalığında histon asetilasyonu.....	18
3. MATERYAL ve METOT.....	22
3.1 Gereçler.....	22
3.1.1 Kullanılan malzemeler.....	22
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	23
3.2. Yöntemler.....	24
3.2.1 Hücre Kültürü.....	24
3.2.2 Hücrelerin pasajlanması ve α -sinüklein fibrillerinin oluşturulması.....	25
3.2.3 Sitotoksosite testleri.....	25
3.2.4 İmmünofloresans analizler.....	26
3.2.5 Total RNA izolasyon yöntemi.....	27
3.2.6 İzole edilen RNA'lerden cDNA elde edilmesi.....	29
3.2.7 Eş zamanlı PZR (qRT-PZR) Yöntemi.....	30
3.2.8 CHITA ifade düzeylerinin ölçümü.....	30
3.2.9 İstatistiksel analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1 Sitotoksosite testlerinin sonuçları.....	34

4.2 MHC-II ekspresyonunun immünofloresans yöntem ile gösterilmesi	37
4.3. CIITA ekspresyonunun eş zamanlı-PZR reaksiyonuyla belirlenmesi	38
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	48



SİMGELER VE KISALTMALAR

6-OHDA	: Hidroksidopamin
ATP13A2	: Katyon taşıyan ATPaz 13A2
BSA	: Sığır serum albümini
CARM1	: Ko-aktivatör ilişkili metil transferaz-1
CCL2	: Kemokin ligand-2
CD4	: Cluster of differentiation 4
CIITA	: Sınıf II majör doku uygunluk kompleksi aktivatörü
CXCL1	: Kemokin ligand-1
CXCL10	: Kemokin ligand-10
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DJ-1	: Parkinsonizm ile ilişkili deglikaz
DMEM/F12	: Dulbecco's modified eagle/Ham's F12 medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNAJC13	: Reseptör bağımlı endositoz 8 (RME-8)
DNAJC6	: HSP40 oksilin
dPBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
EIF4G1	: Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4 gama 1
FBS	: Fetal sığır serumu
FBX07	: F-kutu protein 7
Foxp3	: Forkhead box P3
FRA2	: Fos-ilişkili antijen-2
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GIGYF2	: GRB10 etkileşen GYF protein 2
GWAS	: Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları
HAT	: Histon asetil transferaz
HDA	: Histon deasetilaz
HDai	: Histon deasetilaz inhibitörü
HLA-II	: İnsan lökosit antijen sınıf-II
HTRA2	: HtrA serin peptidaz 2
IFN-γ	: İnterferon- γ
IL-10	: İnterlökin-10
IL-17	: İnterlökin-17
IL-1α	: İnterlökin-1 α

IL-6	: İnterlökin-6
LPS	: Lipopolisakkarit
LRRK2	: Lösün-zengin tekrarlayan kinaz 2
MHC-II	: Major doku uygunluk kompleksi
MIP-1	: Makrofaj inflamatuvar protein-1
MIP-1α	: Makrofaj inflamatuvar protein-1 α
MIP-2	: Makrofaj inflamatuvar protein-2
MPP+	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)2,5difeniltetrazolyumbromür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	: Nükleer faktör kappa-B
OD	: Otozomal dominant
OR	: Otozomal resesif
PARK	: Parkinson hastalığına neden olduğu düşünülen genler
PET	: Poziton emisyon tomografi
PGC-1α	: Peroksizom proliferatör aktive reseptör-gama-koaktivatör-1 α
PH	: Parkinson hastalığı
PINK1	: PTEN-indüklenmiş varsayılan kinaz 1
PKCδ	: Protein kinaz C-delta
PLGA2G6	: Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 enzim
PRKN	: Parkin RBR E3 ubikuitin protein ligaz
qRT-PZR	: Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA pol-II	: RNA polimeraz II
SAHA	: Suberil anilid hidroksamik asit
SNCA	: α -sinüklein kodlayan gen
SNP	: Tek nokta polimorfizimi
SNPc	: Substantia nigra pars compacta
SYNJ1	: Sinaptojanin 1
TNF	: Tümör nekroz faktör
TOM20	: Mitochondrial import receptor subunit TOM20
TSA	: Trikostatin A
UCHL1	: Ubikuitin C-terminal hidrolaz L1
VPS13C	: Vaküoler protein sıralayıcı-ilişkili protein 13C
VPS35	: Vaküoler protein sıralayıcı-ilişkili protein 35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. α -sinüklein'in enterik sistemden santral sinir sistemine dağılım hipotezi.	11
Şekil 2.2. Mikroglial gözlem ve aktivasyonunun nöronlar ile etkileşimi ve T-lenfositlere sunumunun mekanizması.....	13
Şekil 2.3. Gen ifadesinin histon asetilasyonu ve metilasyonu ile düzenlenmesi.	16
Şekil 2.4. CIITA ve MHC-II ekspresyonunun interferon- γ (IFN- γ) ile uyarılması ve aktivasyonu sonucu membrana transportu	21
Şekil 3.1. α -sinüklein ile aktive edilmiş BV-2 mikroglial hücreler.....	24
Şekil 3.2. Reaksiyon sonrası elde edilen temsili amplifikasyon grafiği.	32
Şekil 4.1. α -sinükleinin farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi.	34
Şekil 4.2. CUDC-907'nin farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi.	35
Şekil 4.3. TMP-195 farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulandıktan sonra hücre canlılığı üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.4. 10 nM CUDC-907'nin 125, 250 ve 500 nM α -sinüklein birlikte uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.5. 100 nM TMP-195'in 125, 250 ve 500 nM α -sinüklein birlikte uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi.	37
Şekil 4.6. Tüm deney gruplarının floresans yoğunluğunun karşılaştırılması	38
Şekil 4.7. α -sinüklein, CUDC-907 ve TMP-195'in ayrı olarak ve birlikte uygulanmasının CIITA ekspresyonu üzerine etkisi	39

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Parkinson hastalığında rol alan PARK ile isimlendirilmiş genler	6
Tablo 2.2. Günümüze kadar tanımlanmış ilaç ve çevresel etkenlerin neden olduğu epigenetik modifikasyonlar.	19
Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması.....	27
Tablo 3.2. cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon PZR reaksiyon karışımı	29
Tablo 3.3. Ters transkripsiyon PZR programı.....	30
Tablo 3.4. qRT-PZR reaksiyon karışımı.	32
Tablo 3.5. CIITA düzeylerinin tayin edildiği program	32



1. GİRİŞ

Parkinson Hastalığı (PH) nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en sık görülen ikinci ve Avrupa ülkelerinde yaklaşık 1000 kişiden birinde görülen progresif bir santral sinir sistemi hastalığıdır. Lewy cisimcikleri ve özellikle substantia nigra pars kompakta (SNpc) bölgesinde pigmente nöronların kaybı PH'nin kardinal patolojik özellikleri olarak tanımlanmıştır. 1912 yılında Friedrich Lewy tarafından intranöronal inklüzyonlar olarak adlandırılan Lewy cisimcikleri daha sonraki yıllarda detaylı bir şekilde araştırılmış ve içeriğinin çoğunluğunun bir presinaptik protein olan α -sinüklein'den oluştuğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Her ne kadar risk faktörleriyle birlikte hastalığın kalıtsal veya mutasyon kaynaklı mekanizmaları tanımlanmaya çalışılmış olsa da hastalığın temel fizyopatolojisi ve nedeni açıklanamamıştır. Özellikle 2000'li yılların başından itibaren ortaya atılan "otoimmün ve prion-benzeri" hipotezler ile PH'nin sadece motor semptomların kontrolünden sorumlu beyin bölgelerindeki nöron kaybı sebebiyle oluşmadığı ileri sürülmüş ve bu kompleks hastalığın tedavisinde hücresel düzeyde yeni hedeflerin araştırılmasına neden olmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar PH'de α -sinüklein proteinin fizyopatolojiden sorumlu olduğunu ileri sürmektedir. α -sinüklein özellikle santral sinir sisteminde nörotransmitter salınımından sorumlu bir protein olmasına karşın prelinik araştırmalar fibril form α -sinükleinin nöronlar arasında yayılabildiğini göstermiştir. Parkinson hastalarında yapılan post-mortem analizler sonucunda patolojik α -sinükleinin nöronlar arası yayılması, çoğalması ve anatomik bölgelere göre topografik bir düzen göstermesi patolojinin ana öncülü olarak bu mekanizmanın aktivasyonunu düşündürmektedir. Yakın zamanda yapılan araştırmalar ve PH'de toksik forma dönüşen α -sinüklein fibrillerinin in vivo ve in vitro olarak uygulanabilir formlarının yaygınlaşması, α -sinükleinin yayılımından sorumlu temel mekanizmaların araştırılmasına ayrıca birçok protein ve yapının yayılımından sorumlu mekanizma olarak öne sürülmesine neden olmuştur.

PH'de α -sinükleinin nöronlarda çok fazla miktarlarda sentezlenmesinden dolayı mikroglyal aktivasyona sebep olduğu bilinmektedir. Ortaya çıkan bu mikroglyal aktivasyonun nöronlar üzerinde oluşturduğu geri dönüşümsüz inflamatuvar etkiler hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Bu aktivasyon sonucu mikroglyal hücrelerin immün cevaptan sorumlu T-lenfositleri aktive ederek otoimmün etki ile patolojiyi

kötüleştirmektedir. PH'nin son yıllarda ön plana çıkan epigenetik mekanizmalarla ilişkisi bilindiğinden bu mekanizmaların antijen sunumu dolayısıyla periferik ve santral T-lenfosit aktivasyonu ile olan etkileşiminin araştırılması ve olası etkilerin tanımlanması gerekliliği doğmuştur. Özellikle histon asetilasyonunun immün sistem üzerine etkileri bilindiğinden histon asetilasyonunu etkileyen farmakolojik ajanların mikroglyal hücrelerde antijen sunumunu olumlu etkileyeceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada PH tedavisinde yeni bir ilaç hedefi olabilecek histon asetilasyonunun, α -sinüklein ile mikroglyal hücrelerde indüklenen in vitro PH modelindeki olası etkileri ve farklı sınıf histon deasetilazların inhibisyonunun mikroglyalar üzerindeki antijen sunma fonksiyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

“Parkinson hastalığı (PH) tremor, rijidite, bradikinezi ve postural instabilite ile karakterize kompleks, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlanmış ve sonrasında Jean-Martin Charcot tarafından karakterize edilmiştir (Goetz, 2011). 1800’lü yılların ortasında Jean-Martin Charcot tremor ve diğer semptomları ayrıntılı olarak inceleyerek PH’yi multiple skleroz ve daha sonra kendi tanımladığı Parkinson-plus hastalığından ayırmıştır (Charcot, 1892).

PH tarihçesine bakıldığında, yaklaşık olarak milattan önce 10’uncu yüzyılda Hint ve antik Çin kaynaklarında benzer nörolojik tanımlamaların varlığı görülmektedir (Manyam, 1990; Zhang, Dong, and Roman, 2006). Bu kaynaklarda PH’nın klinik tablosu şu şekilde anlatılmıştır:

“İstemsiz titreyen hareket, azalmış kas gücü, desteklenmeyen hatta farkında olmayan hareketler, göğüs hizasını ileriye doğru bükme yatkınlığı, duyarın ve zihnin hasar almadığı halde sürekli olarak koşma ve yürüme hareketinin birbirini seyretmesi.”

Sylvius de la Boë 1690 yılında dinlenme halindeki tremorun, Sauvages 1763 yılında festinasyonun hastaların klinik seyri içerisindeki semptomlardan olduğunu söylemiştir (De la Boe, 1690; FB, 1763). Daha sonra 1817 yılında James Parkinson hastalarda görülen semptomları çizimler halinde resmetmiş ve hastalığı titreyen felç (Shaking Palsy) olarak adlandırmıştır (Parkinson, 2002). Jean-Martin Charcot 50 yıl sonra hastalığı daha ayrıntılı olarak tanımlamış ve bradikineziyi hastalığın kardinal bir semptomu olduğunu söylemiştir. Ayrıca Charcot, titremeli felç isminin hastalığın tanımlanması için kullanılmasını reddederek “Parkinson hastalığı” olarak tanımlanması gerektiğini söylemiştir. İlerleyen yıllarda William Gowers hastalığın demografik özelliklerini tanımlamıştır. Modern tıbbın ve nörolojik hastalıkların araştırmasının geliştirilmesiyle Babinski 1921 yılında motor dalgalanmaları, Foix ve Nicolesco 1925 yılında mezensefalonda ortaya çıkan patolojiyi araştırmıştır (Babinski, Jarkowski, and Plichet, 1921; Foix and Nicolesco, 1925). 1953 yılında Greenfield ve Bosanquet PH sonucu ortaya çıkan beyin sapı lezyonlarını tanımlamıştır (Greenfield and Bosanquet,

1953). 1967 yılında Hoehn ve Yahr daha sonraki yıllarda uluslararası kabul edilecek olan sınıflandırmayı tanımlamıştır. Günümüze kadar gelen bu sistemde hastalığın unilateral (Sınıf I), bilateral (II ve V) ve postural reflekslerin bozulması (Sınıf III) olarak ayrılmasını sağlayarak hastalığın klinik önemi için dönüm noktasını vurgulamıştır (Hoehn and Yahr, 1967).

2.1.2. Epidemiyolojisi

PH Alzheimer hastalığının ardından dünyada en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (Tysnes and Storstein, 2017). Dünyada 65-69 yaş aralığında %0.5-1 ve 80 yaş ve sonrasında ise %1-3 sıklığında görülmektedir (Ascherio and Schwarzschild, 2016). 2030 yılına kadar prevelans ve insidansın %30'dan daha fazla artacağı öngörülmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar ise her bin kişiden 2 kişide görüldüğünü ortaya çıkarmıştır. Yaşam boyu PH riskine bakıldığında 40 yaş sonrası erkeklerde %2 ve kadınlarda %1-3 sıklık oranına sahip olduğu görülmektedir (Ascherio and Schwarzschild, 2016). Ülkeler ve kıtalar arasında hem prevelans hem de mortalite açısından dağılım sıklığı incelendiğinde Afrika kıtasında Avrupa ve Amerika'ya kıyaslandığında da daha az oranda görüldüğü bilinmektedir (Okubadejo, Bower, Rocca, and Maraganore, 2006; Winkler et al., 2010). Asya kıtasında ise insidansın Avrupa ve Amerikaya benzer rakamlara sahip olduğu görülmektedir (Zhang et al., 2005). Fakat genetik mutasyonlar haricinde ırk ve etnisiteye bağlı olarak sabit bir prevelans görülmemektedir (Van Den Eeden et al., 2003). Her ne kadar mevcut araştırmalar erkek:kadın insidans oranınının 1:3 veya 0:2 olduğunu gösterse, çevresel etkiler diğer faktörler nedeniyle bu oranın 0:95 e düştüğü görülmektedir (Mayeux et al., 1995; Tan et al., 2004).

2.1.3. Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

PH'nin tam olarak mekanizması bilinmese de genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (Lees, Hardy and Revesz, 2009). PH'de en önemli risk faktörü yaş olarak kabul edilmektedir, fakat çevresel faktörler gibi birçok ek mekanizma son yıllarda tanımlanmıştır (Kalia and Lang, 2015).

Çevresel faktörler göz önüne alındığında özellikle sigaranın PH ile ilişkisi birçok grup tarafından araştırılmıştır (Hernan et al., 2001; Ma, Liu, Neumann and Gao, 2017). Birçok epidemiyolojik rapor büyük kohortlu çalışmalarla uyum göstererek sigara kullanımının PH görülme ihtimalini azalttığını göstermiştir (Hernan, Takkouche, Caamano-Isorna and Gestal-Otero, 2002; Ritz et al., 2007). Fakat daha sonra yapılan çalışmalar sigaranın miktarı ve günlük tüketimini göz önünde bulunarak değişebileceğini göstermiştir (Breckenridge, Berry, Chang, Sielken, and Mandel, 2016). Her ne kadar azalan riskin nedeni tam olarak aydınlatılmamış olsa da dopaminerjik nöronlarda bulunan nikotik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Bordia et al., 2015). Ayrıca Parkinson hastalarında görülen azalmış dopamin miktarları nedeniyle bu hastaların özellikle sigara gibi keyif verici maddelere bağımlılığının azaldığı bu fikri güçlendirmektedir (Srinivasan et al., 2016). Bu hipotez aynı zamanda Parkinson hastalarının sigarayı kontrol grubuna kıyaslandığında daha kolay bırakabildiğinin gösterilmesiyle desteklenmiştir (Ritz, Lee, Lassen and Arah, 2014).

Birçok çalışma sigara gibi kafeininde PH'nin görülmesinde riski azalttığını göstermiştir (Ross et al., 2000). Aynı zamanda deneysel çalışmalarda kafeinin koruyucu etkisinin gösterilmesinin ardından bu fikir, büyük iki prospektif epidemiyolojik ve çoklu retrospektif çalışmalarla desteklenmiştir (Ascherio et al., 2001; Benedetti et al., 2000; J. F. Chen et al., 2001). Fakat bu sonuçlar sigara ile olan ilişkide olduğu gibi temel mekanizmaların aydınlatılarak desteklenmesi gerekmektedir.

1983 yılında 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)'nin insanda nigrostriatal dejenerasyona neden olduğu MPTP ile kontamine olan enjektörlerle uyuşturucu kullanan kişilerde görülmesiyle keşfedilmiştir (Langston, Ballard, Tetud, and Irwin, 1983). MPTP bir nörotoksin ve mitokondriyel kompleks I inhibitörü olan 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+)'a metabolize olarak substantia nigradaki dopaminerjik hücrelerde selektif olarak hasar ortaya çıkardığı anlaşılmıştır (Xu et al., 2006). MPTP'nin bu etkisinin görülmesinden sonra PH'nin çevresel toksinlerle ortaya çıkabileceği fikri yaygınlaşmış ve çevresel kirliliğin en önemli nedenleri arasında gösterilen pestisitlerle olan ilişkisi araştırılmıştır. Her ne kadar birçok çalışma pestisit

maruziyeti ile PH ilişkisini araştırmış olsa da sadece bir vaka çalışmasında pestisit maruziyetiyle artan PH ilişkisi gösterilmiştir ([Tahmini risk oranı (OR)] 2.2)(Elbaz et al., 2009). Daha sonra yapılan çalışmalar tarım, kuyudan çıkartılan suların tüketimi, kaynak yapan kişilerin maruz kaldığı eriyik metaller, ağır metal (demir, bakır, kurşun, alüminyum ve çinko) maruziyetinin farklı etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır (Tanner et al., 2011).

Genetik faktörlere bakıldığında PH'nin genellikle idiyopatik olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Hastaların yalnızca %10-15'inde aile öyküsü ve sadece %5'inde monojenik kalıtım görülmektedir (Deng, Wang and Jankovic, 2018). Ayrıca bireylerin PH riski tam olarak aydınlatılmayan polijenik risk faktörlerinin ürünü olabileceği düşünülmektedir. PH'ye neden olduğu düşünülen genler "PARK" kısaltmasıyla tanımlanmıştır. Günümüzde 23 adet PARK geni PH ile ilişkilendirilmiş ve bu genlerin otozomal baskın (SNCA, LRRK2, VPS32) veya otozomal çekinik (PRKN, PINK1 ve DJ-1) olduğu gösterilmiştir (Schulte and Gasser, 2011). İlişkilendirilen bu genler Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Bu risk faktörleri içerisinde en önemli olarak gösterilenler GBA1 (glukoserebrozidazların hidrolizinden sorumlu β -glukoserebrozidazı kodlayan gen), HLA-DQB1 (majör antijen sunumu kompleksi, sınıf II'yi kodlayan gen) ve MAPT (tau proteinini kodlayan gen) olarak kabul edilmektedir (Nalls et al., 2014; Sidransky and Lopez, 2012; Simon-Sanchez et al., 2009).

Tablo 2.1. Parkinson hastalığında rol alan PARK ile isimlendirilmiş genler (Kouli, Torsney, and Kuan, 2018)

PARK	GEN	Kalıtım	Tanım
PARK1	SNCA (Polymeropoulos et al., 1997)	O _D	α -sinüklein
PARK4	SNCA (Puschmann et al., 2009)	O _D	α -sinüklein
PARK2	PRKN (Kitada et al., 1998)	O _R	Parkin RBR E3 ubikuitin protein ligaz
PARK5	UCHL1 (Nishikawa et al., 2003)	O _D	Ubukuitin C-terminal hidrolaz L1
PARK6	PINK1 (Valente et al., 2004)	O _R	PTEN-indüklenmiş varsayılan kinaz 1
PARK7	DJ-1 (Bonifati et al., 2003)	O _R	Parkinsonizm ile ilişkili deglikaz
PARK8	LRRK2 (Zimprich et al., 2004)	O _D	Lösün-zengin tekrarlayan kinaz 2
PARK9	ATP13A2 (Ramirez et al., 2006)	O _R	Katyon taşıyan ATPaz 13A2
PARK11	GIGYF2 (Lautier et al., 2008)	O _D	GRB10 etkileşen GYF protein 2
PARK13	HTRA2 (Strauss et al., 2005)	O _R	HtrA serin peptidaz 2
PARK14	PLGA2G6 (Paisan-Ruiz et al., 2009)	O _R	Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 enzim
PARK15	FBX07 (Di Fonzo et al., 2009)	O _R	F-kutu protein 7
PARK17	VPS35 (Wider et al., 2008)	O _D	Vaküoler protein sıralayıcı-ilişkili protein 35
PARK18	EIF4G1 (Chartier-Harlin et al., 2011)	O _D	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4 gama 1
PARK19	DNAJC6 (Olgıati et al., 2016)	O _R	HSP40 oksilin
PARK20	SYNJ1 (Quadri et al., 2013)	O _R	Sinaptojanin 1
PARK21	DNAJC13 (Vilarino-Guell et al., 2014)	O _D	Reseptör bağımlı endositoz 8 (RME-8)
PARK23	VPS13C (Lesage et al., 2016)	O _R	Vaküoler protein sıralayıcı-ilişkili protein 13C

2.1.4. Patolojisi

Birçok mekanizma PH patolojisinin altında yatan temel neden olarak tanımlanmış olsa da bu mekanizmalar hastalığın gelişmesinde temel neden olan α -sinüklein agregasyonu etrafında çerçevelenmiştir. PH patolojisi SNPC'de hücre içi α -sinüklein inklüzyonlarının neden olduğu dopaminerjik nöron kaybı ve buna bağlı olarak adaptif ve doğal bağışıklığın rol oynadığı kompleks bir yapıdan oluşmaktadır.

Mitokondriyel disfonksiyonun, idiyopatik ve ailesel PH'nın patolojisinde rol oynadığı kabul edilmektedir (Moon and Paek, 2015). Yapılan post-mortem analizlerde mitokondriyel kompleks-1'in eksikliği gösterilmiştir (Bindoff, Birch-Machin, Cartlidge, Parker and Turnbull, 1991). Ayrıca MPTP'nin keşfedilmesinden sonra mitokondriyel kompleks-1 inhibitörlerinin bu alanda yapılan araştırmaların önünü açması PH'de kompleks-1 inhibisyonunun rolünün aydınlatılmasını kolaylaştırmıştır (Langston et al., 1999). Daha sonra yapılan çalışmalar MPTP'nin okside olduktan sonra dopaminerjik nöronlarla alınmasının ardından mitokondriyel kompleks-1 işlevinin bozulması sonucu dopaminerjik nöronların enerji depleksiyonuna bağlı olarak ölümünü göstermiştir (Tanner et al., 2011). Genetik risk faktörlerinden olan ve mitokondriyel enerji regülasyonundan sorumlu olan PINK1 ve PARKIN'in (PARK2 ve PARK6) ailesel PH'ye neden olduğunun ortaya çıkarılması mitokondriyel fonksiyonunun hastalığın patolojisindeki rolünü göstermektedir (Pickrell and Youle, 2015). Ayrıca α -sinükleinin mitokondriyel fonksiyonu bozması veya mitokondriyel fonksiyonun bozulmasının ardından agregasyonunun artması bu iki temel mekanizmanın ortak noktalarını göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar α -sinükleinin mitokondriyel bir reseptör olan TOM20 ile etkileşerek oksidatif strese ve reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olduğunun göstermiştir (Di Maio et al., 2016).

Hücre içerisinde proteinlerin katlanmasından ve işlevsiz proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumlu iki temel mekanizma olan ubiquitin-proteazom ve otofajilizom yollarının PH'de rolü genetik faktörler ve deneysel araştırmalarla gösterilmiştir (McKinnon and Tabrizi, 2014). Özellikle proteinlerin katlanmasından sorumlu şaperon proteinleri yardımıyla otofajinin işlevsiz ve anormal proteinlerin temel hücresel yıkım mekanizmalarından biri olduğu anlaşılmıştır. Ardından otofajinin PH'de

α -sinüklein ile olan etkileşimin araştırılmasını ve bu dengenin bozulduğunun ortaya çıkartılmasını sağlamıştır (McNaught and Jenner, 2001). Özellikle monomerik α -sinükleinin her iki yol ile hücreden uzaklaştırılırken fibril formunun bu mekanizmalarla uzaklaştırılmayarak agregate olduğunun gösterilmesi fibril formdaki α -sinükleinin patolojiden olası sorumlu bir mekanizmayı daha etkilediğini göstermiştir.

α -sinüklein küçük (14 kDa), çözünebilir, Lewy cisimciklerini oluşturan, monomer formda katlanmamış şekilde tersiyer yapıya sahip ve agregasyona karşı dirençli bir proteindir. Negatif yüklü lipidler ve fosfolipidlerle etkileşerek α -heliks yapısına N-terminal ucu doğrultusunda katlanır. PH'de α -sinüklein β -yaprak konformasyonundan zengin amiloid benzeri yapılara agregate olmaya yatkındır. Sonuç olarak 5-10 nm boyutlarında uzun filamentler halinde lewy cisimciklerinin yapısını oluştururlar (Burre et al., 2013). Bu konformasyonel değişim için birçok mekanizma araştırılmış ve serin 129'dan fosforilasyon, ubikitinasyon, C-ucu kesimi ön plana çıkmıştır (Fujiwara et al., 2002). Fakat Parkinson hastalarının post-mortem beyinlerinde α -sinükleinin katlanmamış monomeri, çözülebilir oligomer, protofibriller ve yüksek moleküler ağırlıklı çözünmeyen fibriller gibi farklı formlarına rastlanmıştır. Ayrıca mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte monomer α -sinüklein'in agregasyona yatkın forma transforme olabildiğini ve ara formlar oluşturduktan sonra (protofibriller) fibrillere dönüştüğü gösterilmiştir (Caughey and Lansbury, 2003). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar çözünmeyen α -sinüklein fibril formunun nörotoksik olduğunu göstermiştir (Barrett and Timothy Greenamyre, 2015). Ayrıca oligomerik formun anormal protein agregasyonunu hızlandırarak beyin çerisinde yayılım mekanizmasını taklit ettiği gösterilmiştir (Baba et al., 1998). Özellikle nigral agregatlarda α -sinüklein'e karşı immünoreaktivite ve artmış mikroglial hücrelerin varlığı PH patolojisinde nöroinflamasyonun önemli rolünü hatırlatmaktadır (Yamada, McGeer, and McGeer, 1992).

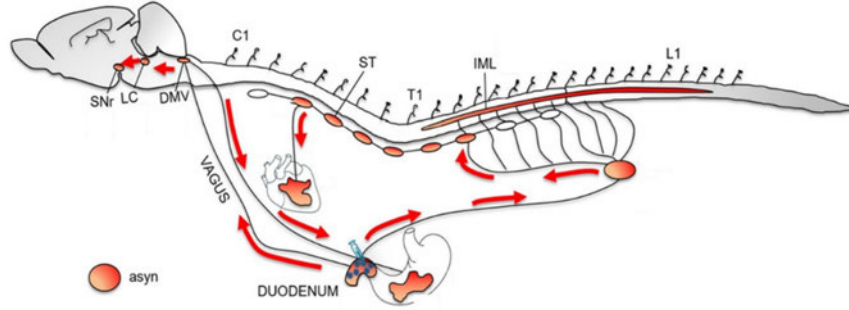
2.1.5. Mikroglialar ve Mikroglial Aktivasyon

Mikroglia santral sinir sistemine özgü eritromyeloid prekürsörlerde ve fetal karaciğerde üretilen, erken beyin gelişiminde santrale göç ederek yetişkin mikroglia olan makrofaj benzeri hücrelerdir. Özellikle nörodejeneratif hastalıklardaki rolü

saptanmasını sağlamıştır(Hamza et al., 2010). Özellikle antijen sunumundan sorumlu immün ilişkili genlerin bu genetik noktalarda bulunması daha sonra yapılan çalışmaların önünü açmıştır. PH'de genetik bir risk faktörü olarak kabul edilen ve yapılan genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmalarıyla tanımlanan HLA bölgesinin aynı zamanda otoimmün hastalıklarla direkt olarak ilişkisinin olması PH'nın immün terapilerle tedavi edilip edilemeyeceği sorularını ortaya çıkarmıştır (Simon-Sanchez et al., 2011). Birçok çalışma HLA sınıf II'deki polimorfizmleri incelemiş ve bu genin PH ile direkt olarak ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (International Parkinson Disease Genomics et al., 2011). Mikroglial aktivasyonla birlikte antijen sunumunun PH'de temel patolojilerden biri olduğu fikri güçlenmiştir. Periferal ve santral immün hücrelerdeki değişikliklerin hastalıktaki rolü genetik ve moleküler düzeyde araştırılmıştır.

2.1.6. Otoimmünite

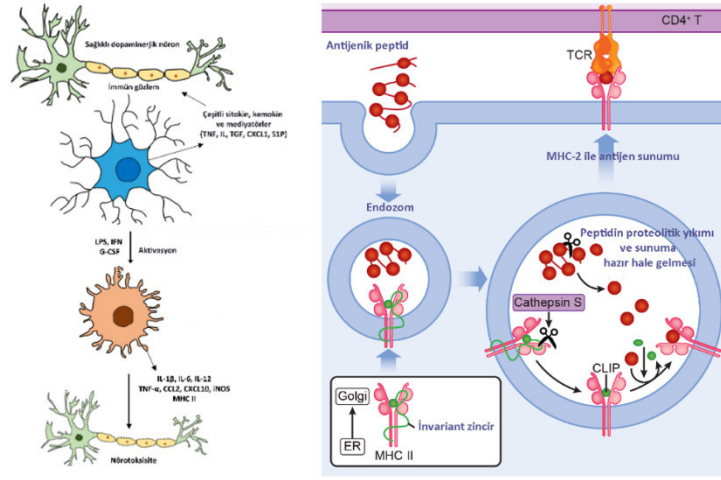
PH'yi tanımlamada monogenik nedenlerin yetersizliği ve kompleks genetik etkenlerin rolünün olmasının yanı sıra risk faktörlerin etkilerinin gösterilmesi, çevresel etkenlerin hastalığın patolojisini modifiye ettiği fikrini ortaya çıkarmıştır. Özellikle inflamasyon ve risk faktörleri arasındaki güçlü bağlantının varlığı ve immünojenetik ilişkinin çevresel etkenlerle nasıl etkileştiğine dair mekanizmalar yeni aydınlatılmaya başlanmıştır. 2003 yılında Braak ve arkadaşları Parkinson hastalarının post-mortem beyin dokularını α -sinüklein için immünoişaretleme ile incelendiğinde, dokuları patolojinin seviyesi olarak düşündüğü temel sınıflara ayırmıştır (Braak et al., 2003). Bu sınıflandırmayı ise α -sinüklein'in yayılımına göre yapmıştır. PH'nin yabancı bir etkenle gastrointestinal sistem veya burun boşluğu yoluyla başlayarak vagus veya olfaktör sinirler vasıtasıyla santrale doğru yayılım gösteren ve son seviyesinde neokorteksi etkileyen bir prion benzeri hastalık olabileceği fikrini öne sürmüştür (Del Tredici and Braak, 2016)(Şekil 2.1).



Şekil 2.1. α -sinüklein'in enterik sistemden santral sinir sistemine dağılım hipotezinin gösterilmesi (Van Den Berge et al., 2019).

Parkinson hastalarının post-mortem beyin dokularında mikrogliozisin yanında yüksek miktarda T hücre infiltrasyonunun gösterilmesi ve hatta bu T hücrelerin periferik kaynaklı olduğunun gösterilmesinin ardından otoimmün hipotez önem kazanmıştır (Lionnet et al., 2018). T hücrelerin doğası gereği otoreaktif olmaları ve herhangi bir hastalık kaynaklı değişen proteinlere karşı proinflamatuvar yanıt oluşturmaları otoimmün hipotezi güçlendirmektedir. Özellikle enterik sinir sisteminde de aynı α -sinüklein'e karşı T hücre otoimmün reaktivitesinin varlığı bu fikri desteklemektedir. Parkinson hastalığının erken safhalarında intestinal geçirgenliğin ve lenfosit aktivasyonunun varlığı gösterilmiştir (Scheperjans et al., 2015). Bu nedenle α -sinüklein'e karşı santral ve periferik T hücre cevabının oluşumu ve sürekliliği PH patolojisinde immünojenetik hipotez doğrultusunda otoimmünitenin önemli rolünü göstermektedir. Otoimmün hipotezin ve α -sinüklein'e karşı oluşan cevabın temel nedeninin hücrel ve humoral bağışıklık aktivasyonu olduğunun gösterilmesinin ardından α -sinükleinle karşılaşan bağışıklık sistemi hücrelerinin antijen sunumu kabiliyetleri araştırılmış ve MHC-II'nin bu hipotez doğrultusundaki rolü gösterilmiştir. Örneğin HLA-DRA geninde rs3129882 tek nokta polimorfizminin (SNP) artmış MHC-II ekspresyonuna neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu polimorfizmin çevresel pteroidlerle PH riskinde anlamlı artışa neden olduğunun gösterilmesi bu hipotezi destekleyerek bu etkileşimin rolünü ve olası tedavi arayışlarında düşünülmesi gerektiğini göstermektedir (Kannarkat et al., 2015). 2012 yılında Depboylu ve arkadaşları T lenfositlerin dejenere olan dopaminerjik nöronlar ve MHC-II ekprese eden mikrogliolar ile temas halinde olduğunu göstermişlerdir (Depboylu et al., 2012). Daha sonra yapılan

çalışmalarda α -sinüklein'in fibril formunun yanı sıra hücre içerisinde oksidatif strese veya modifikasyonlara bağlı patolojik formlarda olmasının farklı cevaplar oluşturabildiği gösterilmiştir. Özellikle α -sinükleinin nitratlanmış formunun immün cevap oluşturması ve dopaminerjik nöronların ölümüne bağlı ortaya çıkan nöromelanin pigmentlerinin antijenik cevaba yol açması bu fikri desteklemektedir (Oberlander et al., 2011). Ayrıca post-mortem analizlerde gösterilen striatal bölgede ve substantia nigrada immüoglobulin kümelenmeleri otoimmün hipotezi güçlendirmektedir (Garretti, Agalliu, Lindestam Arlehamn, Sette, and Sulzer, 2019). Bu bilgiler ışığında santral sinir sisteminin immünolojik yanıtından sorumlu olan glial hücrelerden mikrogliaların, yapısal olarak MHC-II eksprese etmemesine rağmen, insanlarda yaşlanmaya bağlı ve birçok santral sinir sistemi patolojisinde up-regüle olduğu bilindiğinden immün sistemin rolü öne çıkmaktadır (Imamura et al., 2003). Ayrıca MHC-II pozitif mikrogliaların farklı beyin bölgelerinde aktivite göstererek uzantılarını α -sinüklein'in pozitif lewy cisimciği bulunan dejenere olmuş nöronlara kadar ulaştırması mikrogliaların ve periferik immün hücrelerin rolünün önemini daha da artırmaktadır (şekil 2.2).



şekil 2.2. Mikroglial gözlem ve aktivasyonunun nöronlar ile etkileşimi ve T-lenfositlere sunumunun mekanizması (Subramaniam and Federoff, 2017)

Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar α -sinükleinin bağışıklık sistemi hücrelerini aktiveleştirme mekanizmalarını araştırmıştır. Fibril formdaki α -sinükleinin makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde fagosite edildiği ve ekstrasellüler boşluktaki anormal α -sinükleinin veziküllerle hücre içerisinde alınarak patolojiye karşı oluşan immün cevabı

oluşturduğu ileri sürülmüştür (Hughes et al., 2019). Fibril formdaki α -sinükleinin kimyasal çekici olduğunun anlaşılmasından sonra, T ve B lenfositleriyle olan olası etkileşimleri ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve farelerde α -sinükleinin ile aktive olmuş T hücrelerinin adoptif transferinin sağlıklı farelerde patolojiyi oluşturduğu gösterilmiştir (Reynolds et al., 2010). Ayrıca CD4^{-/-} farelerde MPTP ile oluşturulan Parkinson modelinde α -sinükleine karşı oluşan yanıtın gözlemlenmemesi bu hücrelerin patolojideki asıl rolünü göstermiştir (Brochard et al., 2009). Bu bilgilerin yanı sıra T hücrelerinin inflamatuvar mediyatörlerin salınımından sorumlu olduğunun bilinmesi dopaminerjik nöron kaybını hızlandıran nöroinflamatuvar yanıtın ana bileşeni olmasından dolayı, α -sinükleinin'e karşı oluşan bu cevabın azaltılmasının deney hayvanlarında görülen PH patolojisini hafiflettiği daha önce yapılan çalışmalarla uyusmaktadır.

PH'de başlayan mikrogliazinin α -sinükleine karşı oluşan immün cevaptaki rolünün araştırılması önemli hale gelmiştir. Her ne kadar α -sinükleinin ile mikroglial etkileşimin şiddeti ve rolü tam olarak aydınlatılmış olmasa da yapılan araştırmalar, birçok mekanizmanın patolojinin başlangıcı için önemli rol oynadığını göstermektedir (Fellner et al., 2013; Wang et al., 2015). Özellikle mikroglial hücrelerin agrage olan α -sinükleini yüksek miktarlarda fagosite edebilme kapasitelerinin bilinmesi aslında bu hücrelerin hastalığın patolojisinde antijen sunumu haricinde patolojiye karşı savaşan hücreler olduğu fikrini de desteklemektedir. Fakat α -sinükleininin bir süre sonra yüksek miktarlarda ortaya çıkması ve mikroglial kapasitenin aşılmasının bu hücreler için öldürücü etkilere sahip olması hastalığın başlangıç safhalarında mikroglial cevabın daha kritik olduğunu göstermektedir (Koller, Brooks, Golde, Giasson and Chakrabarty, 2017). Mikroglialların antijen sunumu için MHC-II molekülerini kullandığı bilinmektedir (Martin et al., 2016). Ayrıca MHC-II proteinlerin yapısı gereği eksojen faktörlere karşı yanıt oluşturduğu bilindiğinden α -sinükleine karşı mikroglial MHC-II sunumunun temel mekanizmaları ve bu mekanizmaların modülasyonları araştırılmıştır. Yapılan in vitro çalışmalarda α -sinükleininin mikrogliallarda MHC-II kompleksini aktive ettiği gösterilmiştir. Genetik olarak MHC-II kompleksinin silinmesinin α -sinükleinin ile indüklenen aktivasyonun, antijen sunumunun, IGg depoziyonunun ve dopaminerjik nöronların dejenerasyonunun ortadan kalkmasına neden olduğu görülmüştür (Orr, Rowe, Mizuno, Mori and Halliday, 2005). Bu nedenle otoimmün ve nöroinflamatuvar

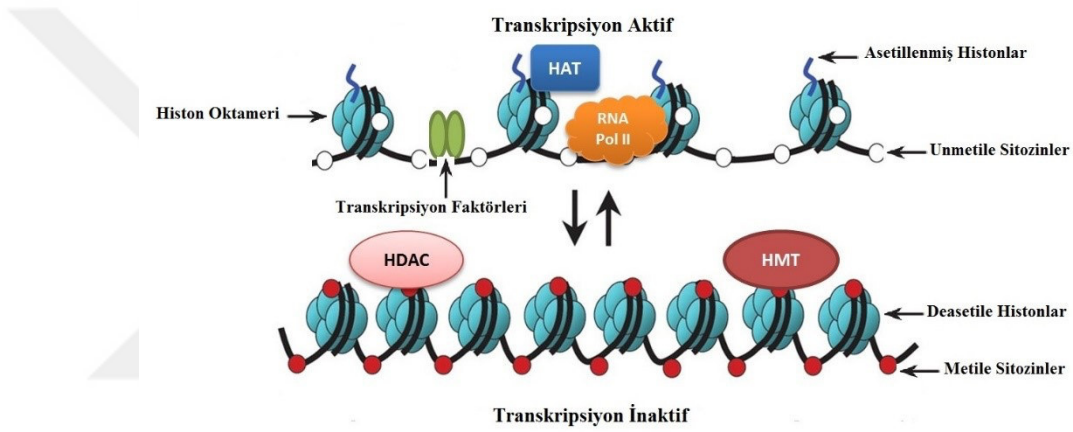
mekanizmalardan hareketle, α -sinüklein ile indüklenen MHC-II kompleks aktivitesinin CD4+ T lenfositlerinin aktivasyonuna, inflamatuvar sitokin salınımından sorumlu kaskadın başlamasına neden olduğu ve bu kaskadın modifikasyonun hastalıkta tedavi hedefi olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

2.1.7. Epigenetik

Epigenetik modülasyon prenatal dönemde başlayan, hayat boyu devam eden, yaşam tarzına, çevresel etkenlere ve genetik yapıyla birlikte PH'de risk faktörlerine neden olduğu düşünülen önemli bir etkidir. Çevresel etkilerin genom düzeyindeki farklılıklara neden olabildiğinin gösterilmesinin ardından epigenetik mekanizmaların PH'nin patolojisindeki rolü önem kazanmıştır. Özellikle PH'nin her ne kadar klinik semptomları dopaminerjik nöronların %70'inin kaybı sonrası belirginleşmeye başlasa da patolojinin yaklaşık 20 yıl önce başladığı hipotezi epigenetik bir süreç olarak düşünülmesi fikrini desteklemektedir (Ammal Kaidery, Tarannum a -nd Thomas, 2013).

Histon modifikasyonları epigenetik mekanizmaların temelini oluşturmaktadır. Histon yapısı temel olarak H2A, H2B, H3, H4 ve bağlayıcı H1 ile birlikte 147 baz sayılı DNA'yı 1.65 kez saran bir kompleksten oluşmaktadır. Herbir histon proteini DNA'dan uzanan N-terminal ucuna sahiptir ve bu sayede post-translasyonel modifikasyona olanak sağlayan linear bir aminoasit dizisi oluşturmaktadır (Luger, 2003). Bu dinamik histon yapısı kromatin remodeling ve sonuç olarak gen regülasyonunu sağlamaktadır. Her ne kadar histon modifikasyonları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, nitrozilasyondan oluştuğu düşünülse de gün geçtikçe yeni modifikasyonlar literatüre girmektedir. Bunların arasından asetilasyon and Roth, 2001). Histon deasetilasyon inhibitörleri gen ekspresyonunun epigenetik modülasyonu yoluyla etki gösteren ve sistemik immün aktivasyon sonucu ortaya çıkan inflamatuvar cevabı baskılayan yeni nesil ajanlardır (Bose et al, 2014). Her ne kadar histon deasetilaz inhibitörleri in vitro ve in vivo çalışmalarda nöroprotektif ve anti-inflamatuvar etkileri ile öne çıksa da histon asetilasyonunun tümör hücrelerine karşı oluşan immün cevabı artırarak antiproliferatif etki göstermesi, bu ajanların etkilerinin ve etki mekanizmalarının daha derin araştırılmasına olan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Kromatin şekillenme dinamikleri transkripsiyonel aktivasyon ve gen ekspresyonu için hayati önem arz etmektedir. Bu

dinamiklerin açıklanmasında histon asetilasyonu diğer mekanizmalara göre daha detaylı olarak araştırılmıştır. Histon asetilasyonu, asetil-koenzim A'da bulunan asetil gruplarının histon kuyruklarının lizin kuyruklarına transfer edilmesi ve bu sayede nükleozomlar üzerinde elektrostatik itme kuvvetlerinin oluşmasını sağlayarak kromatin gevşemesiyle sonuçlanır. Bunun sonucunda ise transkriptör regülatör faktörlerin bağlanmasına ve RNA pol-II aktivasyonuna neden olur. Gen transkripsiyonunun baskılayıcısı olan birçok molekül promotör bölgelere bağlanarak kromatin sıkışmasına ve gen susturulmasına neden olur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Gen ifadesinin histon asetilasyonu ve metilasyonu ile düzenlenmesi

Histon asetilasyonu histon asetiltransferazlar (HAT) tarafından gen ifadesinin aktivasyonu ve histon deasetilazlar (HDA) tarafından gen ifadesinin represyonu olmak üzere iki temel mekanizma ile regüle edilmektedir. HAT'lar histon kuyruğuna asetil koenzim A'da bulunan asetil grubunun lizin rezidüsüne transfer edilmesinden sorumlu kısıtlı sayıda enzim grubundan oluşmaktadır. Fakat günümüzde 18 adet farklı histon deasetilaz tanımlanmıştır. 4 farklı sınıfa ayrılan bu enzimler kofaktörleri ve hücrel fonksiyonları açısından farklılıklar göstermektedir. Sınıf I (HDA 1,2,3 ve 8), sınıf II (HDA 4,5,6,7,9 ve 10), sınıf III (sirtuinler 1,2,3,4,5,6,7) ve sınıf IV (HDA 11)'den oluşmaktadır. Sınıf III'te bulunan HDA'lar ise aktif bölgeleri için NAD⁺'ye ihtiyaç duyarken diğer tüm sınıflar aynı bölgede aktivasyon için çinkoya bağımlıdır (Dokmanovic, Clarke, and Marks, 2007). Hücrel ve dokusal dağılım olarak farklılık gösteren bu enzimlerden HDA2'nin çoğunlukla nöronlarda, HDA1'in ise glial hücrelerde olduğu gösterilmiştir (MacDonald and Roskams, 2008). CUDC-907

(fimepinostat) HDA (1, 2, 3, 6, 10, 11) inhibitörü olan aynı zamanda fosfoinositid 3 kinaz (PI3K) enziminide inhibe ettiği bilinen bir histon deasetilaz inhibitörüdür. Çalışmamızda kullanmayı planladığımız diğer bir inhibitör olan TMP-195'in ise HDA 4, 5, 7, 9 sınıflarını inhibe ettiğinden sınıf IIa spesifik histon deasetilaz inhibitörü olarak adlandırılmaktadır. Özellikle diğer sınıfların etkileri ve dağılımları araştırılıyor olsa da her geçen gün literatüre bu modifikasyonlar ve fizyolojik etkileri hakkındaki bilgiler eklenmektedir. Fakat PH ve epigenetik ilişkinin sporadik ve ailesel formlardaki rolleri hakkındaki bilgiler halen kısıtlıdır. Varolan bilgiler ışığında ailesel PH'de rol oynayan SNCA diğer genler arasında öne çıkmaktadır (Satake et al., 2009). Bu genin primer ürünü ve PH'nin patolojisinin temel elemanı olan α -sinükleinin epigenetik olarak etkileştiğinin bilinmesi bu yönde yapılan araştırmaların önünü açmıştır. Fakat daha sonra yapılan araştırmalar α -sinükleinin kendisinin histon modifikasyonlarına neden olabildiğini ve hatta nükleer ve sitoplazmik formlarının farklı etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Nükleer hedefli α -sinükleinin SH-SY5Y hücrelerinde toksisiteye neden olması ve HDA inhibitörleriyle bu toksisitesinin engellenmesi HDA'ların terapötik amaçlı kullanılabilmesi hakkında ilk bulguları sağlamıştır (Kontopoulos, Parvin, and Feany, 2006). Ayrıca oksidatif stresin α -sinükleinin nükleer transportuna ve bir promotör element olan peroksizom proliferatör aktive reseptör gama koaktivatör-1 α (PGC-1 α)'ya bağlanarak histon deasetilasyonuna neden olması PGC-1 α 'nın azalmasına ve dolayısıyla oksidatif stres kaynaklı hücre hasarının artmasına neden olmaktadır (Siddiqui et al., 2012). Bunlara ek olarak, histon deasetilaz inhibitörleri Treg hücrelerinin proliferasyon ve baskılayıcı aktivitelerini arttırdığı bilinmektedir (Liu vd., 2010). Özellikle post-mortem analizlerde PGC-1 α 'nın anlamlı derecede azaldığının gösterilmesi α -sinükleinin, PH'nda deasetilasyonla hücre ölümüne neden olduğu fikrini güçlendirmektedir. Ayrıca son yapılan çalışmalarda HAT/p300'ün prion-benzeri bölgeler içerdiği ve kolay bir şekilde modifiye olabildiğini göstermiştir (Kirilyuk et al., 2012). Bu bölge birçok katlanma problemi olan ve hücre içerisinde akümüle olabilen bölgeyle etkileşerek agregasyona neden olmaktadır. HAT/p300'ün vitro modellerde α -sinükleinin agregasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kirilyuk et al., 2012). Buna ek olarak insan α -sinükleinin fizyolojik koşullarda dopaminerjik hücrelerde izoform bağımlı olarak oksidatif strese önemli rol oynayan bir kinaz olan protein kinaz C-

delta'nın (PKC δ) transkripsiyonel supresyonunu sağladığı bilinmektedir (Jin et al., 2011). Azalmış PKC δ transkripsiyonu yapısal NF- κ B aktivitesinin baskılanmasıyla sağlanır. Azalan NF- κ B sayesinde p65 asetilasyonu α -sinüklein ile indüklenen p300 seviyelerini ve α -sinükleinin HAT aktivitesini azaltarak dopaminerjik nöronları apoptozdan korumaktadır. Bu bilgiler α -sinükleinin potensiyel olarak histon modifikasyonlarıyla hastalığın patolojisinde önemli rol oynadığı göstermektedir. Epigenetik mekanizmaların α -sinüklein ile etkileşmelerinin araştırmalarından biri olan Yan Xiao ve arkadaşlarının çalışmasında, Treg hücrelerinin işlevini düzgün sürdürebilmesi için Forkhead box P3 (Foxp3) içeren kısımlarında bulunan lizin bölgelerinin asetilasyona uğraması gerektiği gösterilmiştir (Xiao vd., 2010). Buna ek olarak, 2006 yılında Kontopoulos ve arkadaşları ise α -sinükleinin histonlarla olan ilişkisini incelemiş ve α -sinükleinin histon deasetilasyonunu inhibe ettiğini göstererek “üçlü hipotezi” desteklemiştir (Kontopoulos vd., 2006). 2018 yılında Harrison ve arkadaşları, α -sinükleinin histon proteinlerinin asetilasyon bölgelerini maskelediğini ve histon asetiltransferaz enzim aktivitesini engelleyerek dinamik gen regülasyonunu engellediğini göstermiştir (Harrison vd., 2018). Ayrıca in vitro dejenere olmuş dopaminerjik nöronların histon hipoasetilasyonu gösterirken aktive olan mikrogliaların histon hiperasetilasyon gösterdiğini bildirmiştir.

2.1.8. Parkinson hastalığında histon asetilasyonu

Histon asetilasyonundan sorumlu her iki enzimin de (HAT ve HDA) PH patolojisinde rol aldığı görülmektedir. PH deneysel modellerinde kullanılan parakuat ve rotenonun HDA aktivasyonunu azaltarak histon asetilasyonunu artırdığı, diletrin ise HAT aktivitesini artırdığının gösterilmesi histon asetilasyonunun PH da farklı sonuçlara neden olduğunu düşündürmektedir (Van Maele-Fabry, Hoet, Vilain, and Lison, 2012). Ayrıca parakuatla in vivo olarak indüklenen α -sinükleinin histon hipoasetilasyonuna neden olması histon asetilasyonunun karışık mekanizmasına bir soru daha eklemektedir (Song, Kanthasamy, Anantharam, Sun, and Kanthasamy, 2010; Song, Kanthasamy, Jin, Anantharam, and Kanthasamy, 2011). Tüm bu zıtlıklar deneysel modellerde hem HAT inhibitörlerinin hem de HDA inhibitörlerinin nöroprotektif etkiler göstermesiyle desteklenmektedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda histon asetilasyonunun idiyopatik

ve genetik farklılıkları ve bu farklılıkların histon düzeyinde etkileri araştırılmış ve her sınıfta bulunan enzim için farklı etkiler ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Tablo 2.2).

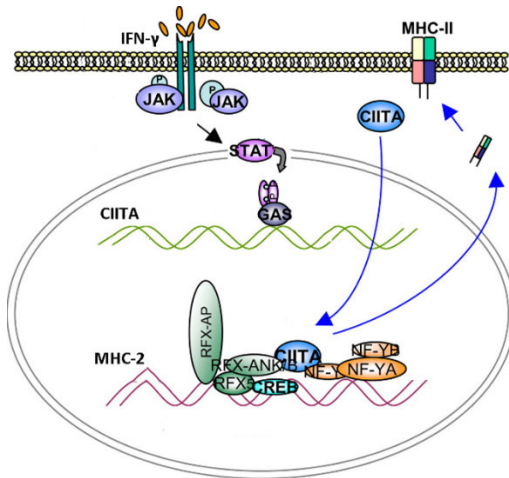
Tablo 2.2. Günümüze kadar tanımlanmış ilaç ve çevresel etkenlerin neden olduğu epigenetik modifikasyonlar

Kimyasal	Epigenetik modifikasyon	Referans
Toksinler		
MPTP	Demetilasyon	(Nicholas et al., 2008)
Parakuat	H3 hiperasetilasyon	(Song et al., 2010; Song et al., 2011)
Rotenon	Bilinmeyen mekanizma fakat HDA inhibitörü toksisiteyi inhibe ediyor	(St Laurent, O'Brien, and Ahmad, 2013)
Dieldrin	H3, H4 hiperasetilasyon	(Song et al., 2010)
İlaç		
Levodopa	H4K5, K8, K12, K16 deasetilasyon	(Nicholas et al., 2008)
HATi		
Anakardik asit	Deasetilasyon	(Song et al., 2010)
HDAi		
Valproik asit	H3 hiperasetilasyonu/Promotör aktivasyonu/Di-trimetilasyon	(H. Chen, Dzitoyeva, and Manev, 2012; P. S. Chen et al., 2007; Kidd and Schneider, 2011; Marinova et al., 2009; Peng et al., 2005)
Suberil anilid hidroksamik asit (SAHA)	Hiperasetilasyon/Promotör aktivasyonu/Di-trimetilasyon	(H. Chen et al., 2012; Marinova et al., 2009)
Sodyum butirat	Hiperasetilasyon/Promotör aktivasyonu	(H. Chen et al., 2012; Kidd and Schneider, 2011; Leng, Marinova, Reis-Fernandes, Nau, and Chuang, 2010; Marinova, Leng, Leeds, and Chuang, 2011; Marinova et al., 2009)
AGK2	Hiperasetilasyon	(St Laurent et al., 2013)
MS-275	Promotör aktivasyonu/Di-trimetilasyon	(Leng et al., 2010; Marinova et al., 2011; Marinova et al., 2009)
Fenil butirat	Promotör aktivasyonu	(Roy et al., 2012; Zhou et al., 2011)
Urokortin	Hiperasetilasyon	(Huang et al., 2011)

PH'nin immünojenetik ve nöroinflamatuvar mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda hastalığın erken safhalarında başlayan mikrogliozis ve mikrogliyal davranışın bu epigenetik modifikasyonlardan nasıl etkilendiği ayrıca araştırılmıştır. Ancak HAT ve HDA kaynaklı etkilerin karışık ve zıt yönlü olması nedeniyle glial fenotip ve davranış üzerindeki sonuçları tam olarak aydınlatılmamıştır. Yapılan birçok çalışma hastalığın patolojisinde önemli rol oynayan bir başka glial hücre olan astrositlerin mikroglialarla birlikte PH'de ortaya çıkan bu karışık immün cevaptaki rollerini araştırmıştır. Faraco ve arkadaşları yaptığı çalışmada fare glial hücrelerde HDA alt tiplerini ve LPS ile indüklenen kültürlerde histon asetilasyonun rolünü araştırmıştır (Faraco et al., 2009). Araştırmada kullandığı SAHA ve ITF2357 ile histon asetilasyonunu sitotoksositeye neden olmadan dramatik düzeylerde arttığını ve deksametazonla indüklenen immünoşüpresif etkinin güçlendiğini ortaya çıkarmıştır. Fakat ortaya çıkan anti-inflamatuvar ve immünoşüpresif bu etkinin HDA ile indüklenen immünoşüpresan proteinlerin transkripsiyon artmasından dolayı değil, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanarak aktive olmasından kaynaklı olduğunu göstermiştir. Her iki HDA inhibitörünün de lipopolisakkarit (LPS)'e maruz kalmış mikrogliyal hücrelerde NF-kB bağımlı I κ B α 'nin yeniden sentezini bozarak DNA'ya c-FOS, c-JUN ve fosilişkili antijen-2 (FRA2)'nin bağlanma aktivitesini bozduğunu kanıtlamıştır. Çalışma sonucunda fare glial hücrelerinin bazal HDA aktivitesine sahip olduğunu ve bu aktivitenin inhibisyonunun nöroinflamatuvar cevabı transkripsiyon düzeyinde etkileyerek baskıladığını söylemiştir. 2018 yılında Harrison ve arkadaşları PH'de histon asetilasyonunu araştırmış ve mikrogliyal aktivasyondan sorumlu histon deasetilazları tanımlamaya çalışmıştır (Harrison, Smith, and Dexter, 2018). α -sinükleinin birikiminden sonra histon proteinlerinin asetilasyon bölgelerini maskeleyerek HAT ve HDA'ların dinamik denge halini bozduğunu söylemiştir. Ayrıca daha önceden yapılan araştırmalarda HDA'ların nöroprotektif etkilerinden yola çıkarak, post-mortem SNPC örneklerini araştırmış ve histon asetilasyonunun hastalığı seviyesi ve derecesine bağlı olarak değiştiğini söylemiştir. Ayrıca deneysel modellerde bir ubiquitin-proteozom inhibitörü olan laktastatine ile oluşturulan Parkinson benzeri patolojide histon hipoasetilasyonunun varlığından bahsetmiş fakat sınıflandırmanın ve histon deasetilazların alt tiplerinin önemini vurgulamıştır. Yaptıkları çalışmada histon

asetilasyonunun Braak derecelendirmesine göre korelasyon gösterip göstermediğini aydınlatmaya çalışmış ve histon asetilasyon seviyelerinin dejenere olan dopaminerjik nöronlar ve aktive olmuş mikroglialarla patolojinin tersine etki ettiğini söylemiştir. Mikroglial aktivasyonun anlamlı şekilde histon asetilasyonunu artırdığını ve bu etkinin HLA-DP α 1 ekspresyonu ile korelasyona sahip olduğunu göstermiştir. Her ne kadar mikroglia ve astrositlerde daha yoğun bulunan alttürler aydınlatılmış olsa da her bir enzimin veya enzim sınıfının α -sinüklein nedeniyle ortaya çıkan mikroglial MHC-II üzerinde nasıl rol oynadığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Özellikle sınıf-2 majör doku uygunluk kompleksi transaktivatörü (CIITA)'nin MHC-II ekspresyonunun kontrolünde temel mekanizmalardan biri olması bu mekanizmaların derinden araştırılmasını gerektirmektedir. MHC-II gen regülasyonu normalde transkripsiyonel seviyelerde gerçekleşirken DNA'ya bağlanmadan etki gösteren CIITA MHC-II ekspresyonunu regüle ettiği bilinmektedir (Şekil 2.4) (Wright and Ting, 2006). MHC-II genlerinin transkripsiyonun CIITA tarafından kontrol edilmesi ve CIITA'nın epigenetik modifikasyonlarla çeşitli hücresel yanıtlar oluşturabilmesi histon asetilasyonunun MHC-II ekspresyonu üzerinde dolaylı etkilere sahip olma fikrini oluşturmaktadır. Mikroglial hücrelerde normalde düşük düzeyde MHC II protein ekspresyonu gözlemlenirken, inflamatuvar, immün ve nörodejeneratif durumlarda bu ekspresyonun potent bir şekilde arttığı bilinmektedir (Wojtera et al., 2012).



Şekil 2.4. CIITA ve MHC-II ekspresyonunun interferon- γ (IFN- γ) ile uyarılması ve aktivasyonu sonucu membrana transportu (Tang et al., 2008)

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Gereçler

3.1.1 Kullanılan Malzemeler

- Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12, Gibco, 12-634-028)
- Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 11550356)
- Penisilin/streptomisin (10003927)
- Tripsin-EDTA (Gibco, 25200072)
- Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, D8418, CAS: 67-68-5)
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT, M5655, CAS: 298-93-1)
- Sigma steril enjektör filtresi 0.22 µm, metanol (Sigma, 34860)
- Etanol (Sigma, 32205, CAS: 64-17-5)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (dPBS, Gibco, 14190144)
- 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Scientific, 62248, CAS: 28718-90-3)
- Prolong Gold® Antifade Reagent (Thermo Scientific, P36934)
- Ibidi® 12-well slide (ibidi, 81201)
- CUDC-907 (adooQ, A11153, CAS: 1339928-25-4)
- TMP-195 (adooQ, A14326, CAS: 1314891-22-9)
- α-sinüklein (rPeptide, S-1001-1)
- MHC-II rekombinant primer antikor (abcam, ab25333)

- Alexa-flour 488 sekonder antikor (abcam, ab150077)
- Nucleospin® RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, 740955.50)
- Taqman® universal master mix with UNG (Applied biosystems, 4440044)
- iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-rad, #1708891)
- GAPDH için qRT-PZR primer probu (Thermo scientific, Mm99999915_g1, 4331182)
- CIITA için qRT-PZR primer probu (Thermo scientific, Mm00482914_m1, 4331182).

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

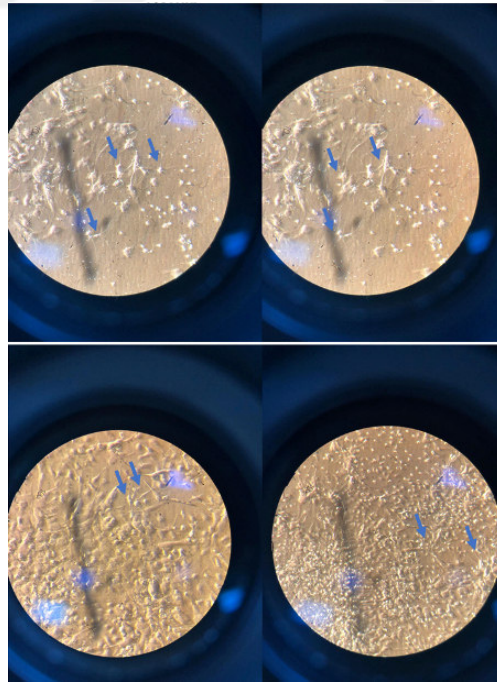
- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- Isı bloğu (VWR, ABD)
- Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- Santrifüj (Nüve NF048, Türkiye)
- DNA sayacı: Nano-drop (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- Isı döngü cihazı: Thermal Cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD)
- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- CO₂'li inkübatör (Thermo scientific, ABD)
- Laminar akımlı sınıf II kabin (Nüve, Türkiye)
- Kantitatif eş zamanlı PZR cihazı: Agilent Stratagene Mx3000P (Agilent, ABD)
- Faz kontrast-floresans mikroskop (Olympus B51, Japan)
- Sonikasyon cihazı (NÜVE, Türkiye)
- Sıvı azot tankı (International cryogenics, ABD)
- Ultrasonutucu (NÜVE, Türkiye)
- Hücre sayma cihazı (Bio-rad TC20, ABD)
- Su banyosu (Mettler, ABD)

- Mikroplaka alkalayıcı (Heidolph Titramax 1000, Almanya)
- Invert mikroskop (Zeiss Axiovert, Almanya)
- Mikroplaka okuyucu (TECAN, İsviçre)
- Mikropipet seti (Eppendorf, Almanya)

3.2. Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü

BV-2 hücre hattı yeni doğan farelerden izole edilerek raf/myc-immortalize edilmiş ve primer mikroglialar yerine araştırmalarda en çok kullanılan hücre hatlarından biridir (Henn et al., 2009). İn vitro ortamda α -sinüklein ile oluşturulacak olan PH modeli için kullanılan BV-2 hücre hattı bağış yoluyla temin edilmiştir. Mikroglial hücrelerin kültürü ve α -sinüklein varlığında aktivasyonu deneyler öncesi α -sinüklein uygulamasıyla denenmiştir (Şekil 3.1). Deneyler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan steril hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 α -sinüklein ile aktive edilmiş BV-2 mikroglial hücreler. Mavi oklar aktive olmaya başlayan mikrogliaların ameoib şekillere bürünmeye başladığı zaman aralığındaki görünümünü belirtmektedir (Görüntüler α -sinüklein uygulamasını takiben herhangi bir zamanda kontrol amaçlı alınmıştır)

3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması ve α -sinüklein Fibrillerinin Oluşturulması

Hücreler çözüldükten sonra 25 ve 75 cm²'lik flasklarda çoğaltılarak uygun sayı ve konfluansa gelene kadar, %10 fetal sıgır serumu, %1 penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12 vasatında, %5 karbondioksit (CO₂) ve 37°C inkübatörde bekletildi. Hücrelerin konfluansı %80 ve üzerine ulaştığında tripsin/EDTA yardımıyla pasajlanarak uygun plaka ve petrilere ekildi. α -sinüklein'in toksik formu olan fibriler formu literatürde bulunan metodlar yardımıyla steril PBS'te sulandırıldıktan sonra monomer şeklinin 7 gün boyunca 37°C'de çalkalayıcıda 1000 rpm'de inkübe edilmesiyle elde edildi (Lee et al., 2010). Daha sonra kullanılacak olan fibriller 1 dakika sonikasyona maruz bırakılarak çözünmeyen partiküllerin çözünmesi sağlandı. Daha sonra kullanılacak olan fibriller formadaki α -sinüklein deneylerin gerçekleştirilmesine kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.3 Sitotoksisite Testleri

Hücre canlılığının ölçülmesi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolyumbromür (MTT) testi yardımıyla yapıldı. MTT normal şartlarda sulu çözeltileri sarı renkli olan fakat mitokondriyel redüktaz aktivitesi sonucunda suda çözünmeyen mor renkli formazan'a dönüşür. Bu sayede canlı hücrelerde görülen mitokondriyel redüktaz aktivitesi sayesinde oluşan mor renk kolorometrik prensip ile kantitatif olarak ölçülür. Bu test sonucunda elde edilen verilerde hücre canlılığının %70'in altına düştüğü durumda araştırılan ajan sitotoksik olarak kabul edilir. BV-2 hücreleri uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin/EDTA çözeltisi yardımıyla kaldırdı. Kaldırma işlemi ışık mikroskopu kullanılarak doğrulandıktan sonra taze hücre besiyeri eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan çözelti 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pellet 1 ml besiyeri içerisinde çözüldü. Hücre sayımı hücre sayım cihazıyla yapıldıktan sonra, her kuyucuğa 100 μ l'de 104 96 kuyucuklu plakalara ekim yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra kuyucuklardan vasat uzaklaştırılarak hücreler farklı zaman ve konsantrasyon dahilinde taşıyıcı (%0,1 DMSO), CUDC-907 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM), TMP-195 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM), α -sinüklein (62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 nM) uygulanarak deney grupları oluşturuldu. α -sinüklein'in uygulanacak olan

konsantrasyonları moleküler ağırlığının (14.4 kDA) mg/mmol cinsine çevrilmesinden hareketle hesaplandı. Belirlenen süre sonunda hücrelerden vasat uzaklaştırıldı ve MTT hücre vasatında 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilerek her bir kuyucuğa eklendi. Daha sonra plakalar karanlık ortamda 37°C’de 3 saat inkübe edildi ve süre sonunda vasat aspire edilerek uzaklaştırıldı. Plaka tabanında oluşan çözünmemiş kristallerin üzerine 100 µl DMSO eklenerek karışım homojen bir kıvama gelen kadar pipetaj yoluyla karıştırıldı. Oluşan homojen karışımın 570 nm’deki absorbansları kuyucuk okuyucu cihazında belirlendi.

3.2.4 İmmüno Floresans Analizler

BV-2 hücreleri uygun konfluansa ulaştıktan sonra tripsin/EDTA çözeltisiyle muamele edilerek kaldırıldı. Kaldırılan hücreler, immüno sitokimyasal analizler için 12-kuyucuklu mini çember lamaların (ibidi®) üzerine ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, canlılık analizlerinden elde edilen sonuçlardan hareketle, hücrelere CUDC-907 (10 nM), TMP-195 (100 nM) ve α -sinüklein (125, 250, 500 nM) uygulandı. Uygulama yapılan deney grupları tablo 3.1’teki gibi dizayn edildi. MHC-II’nin membran spesifik ekspresyonunun gözlemlenmesi için MHC-II’nin rekombinant antikoruyla immüno floresans yöntemiyle araştırılması tercih edilmiştir. İmmüno floresans analizleri standart protokoller doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- 1- İlaç uygulamasını takiben çember lamlardan vasat uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuk 3 kez 5’er dakika dPBS solüsyonuyla yıkandı.
- 2- Yıkamayı takiben kuyucuklara -20°C’de bekletilen metanol eklenerek 20 dakika boyunca -20°C’de fiksasyon için bekletildi.
- 3- Fikse edilen hücreler 3 kez 5’er dakika dPBS solüsyonuyla yıkanarak metanolün tamamen uzaklaştırılması ve hücrelerin rehidrete olmaları sağlandı.
- 4- Hücreler bloklama tamponu (%1 BSA+ 22.52 mg glisin+%0.1 Tween-20) kullanılarak non-spesifik bağlanmanın önlenmesi için 30 dakika boyunca bloklandı.
- 5- Bloklama işlemini takiben 3 kez 5’er dakika dPBS ile yıkama basamağı tekrarlandı.

- 6- Hücreler bloklama solüsyonunda dilüe edilen MHC-II rekombinant primer antikor ile gece boyu +4°C’de inkübe edildi.
- 7- İnkübasyonu takiben primer antikor geri alınarak, hücreler 3 kez 5’er dakika dPBS ile yıkandı.
- 8- Ortamdan dPBS aspire edildikten sonra uygun dalga boyunda görüntüleme işleminin yapılabilmesi için Alexa-flour-488 sekonder antikor ile 1 saat boyunca inkübe edildi.
- 9- Yıkama işleminin tekrarlanmasından sonra çekirdek işaretlemesi için her bir kuyucuğa DAPI boya solüsyonu uygulandı.
- 10- Tekrar yıkama yapılarak DAPI solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve lam yapıştırma sıvısı yardımıyla lamelle kapatılarak en fazla 30 dakika içerisinde floresans mikroskop (Olympus, Japan) altında incelendi.
- 11- Lamlardan elde edilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarılarak ImageJ programıyla incelendi. Her bir hücredeki floresans yoğunluğu kontrol grubuna göre normalize edildi.

Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Kimyasal adı	α -sinüklein	CUDC-907	TMP-195
Grup adı			
α-sinüklein 125 (n=6)	125 nM		
α-sinüklein 250 (n=6)	250 nM	-	-
α-sinüklein 500 (n=6)	500 nM	-	-
α-sinüklein 250+ CUDC-907 (n=6)	250 nM	10 nM	-
α-sinüklein 500+ CUDC-907 (n=6)	500 nM	10 nM	-
α-sinüklein 250+ TMP-195 (n=6)	250 nM	-	100 nM
α-sinüklein 500+ TMP-195 (n=6)	500 nM	-	100 nM

3.2.5 Total RNA izolasyon yöntemi

QRT-PZR analizlerinde kullanılacak olan RNA’lar, hücrelere α -sinüklein, CUDC-907 ve TMP-195 uygulandıktan sonra, Nucleospin® RNA izolasyon kiti ile hücrelerden izole edildi. İlaç uygulamasını takiben flasklardan kaldırılan hücreler 1000

rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek ortamdan serum ve tripsin gibi aktif moleküllerden arındırıldı. Hücre pelleti dPBS'te çözülerek homojenize edildi ve RNA izolasyon kitinin kullanma kılavuzu doğrultusunda aşağıdaki işlemlerden geçirildi;

- 1- Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2- Santrifüj tüpündeki hücre pelleti "350 µl Nucleospin® Buffer RA1 ve 3.5 µl β-merkaptotanol" ile parçalanarak kuvvetli şekilde vorteks edildi.
- 3- Oluşan lizat "NucleoSpin® Filter" kullanarak 11000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek kolleksiyon tüpüne (2 mL) aktarıldı.
- 4- "NucleoSpin® Filter" uzaklaştırıldı örneğe 350 µl %70'lik etanol çözeltisi eklendi ve pipetaj yoluyla homojenize edildi.
- 5- Süspansiyon "NucleoSpin® RNA Column" içinde 11000g'de 30 saniye santrifüj edilerek kolona yüklendi. Kolon yeni kolleksiyon tüpüne yerleştirildi.
- 6- Kolona 350 µl "NucleoSpin® Filter MDB" yüklenerek 11000g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 7- DNaz reaksiyon karışımı 1.5 mL mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı. Her bir izolasyon için 10 µl sulandırılmış rDNaz ve 90 µl rDNaz için reaksiyon tamponu eklendi. Karışım hafif sallanarak homojenize edildi.
- 8- 95 µl DNaz reaksiyon karışımı direk olarak kolonun merkezine eklenerek 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon için bekletildi.
- 9- 200 µl "NucleoSpin® RAW2 Buffer" kolona eklenerek 11000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve kolon yeni kolleksiyon tüpüne yerleştirildi.
- 10- İkinci yıkama işlemi için 600 µL "NucleoSpin® RA3 Buffer" kolona eklenerek 11000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve kolleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak kolon yeni bir kolleksiyon tüpüne yerleştirildi.
- 11- Üçüncü yıkama işlemi için 250 µl "NucleoSpin® RA3 Buffer" kolona eklenerek 11000 g'de 2 dakika santrifüj edildi, sonra membranın tamamen kuruması sağlandı. Kolleksiyon tüpü atılarak steril nükleaz olmayan kolleksiyon tüpü yerleştirildi.
- 12- İzole edilen RNA 60 µL RNaz içermeyen su ile 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek elüe edildi.

- 13- İzole edilen RNA miktarı nanodrop yardımıyla ölçüldü. A260/A280 oranı 1.9-2.1 aralığında olmayan örnekler analizler için kullanılmadı.
- 14- RNA örneği, sonraki işlemlere kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.2.6 İzole edilen RNA'lardan cDNA elde edilmesi

cDNA sentez kiti kullanılarak izole edilen RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA'nın oluşturulması için uygulanan ters transkripsiyon PZR reaksiyon protokolü ve içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için kullanılan ters transkripsiyon PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (μl)
5x iScript Reaction mix	4 μl
iScript Reverse transcriptase	1 μl
Nükleaz içermeyen su	13 μl
RNA numunesi	2 μl (500 ng)
Toplam hacim	20 μl

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi için aşağıdaki protokol takip izlendi

- 1- İzole edilen örnekler buz üzerinde çözüldü.
- 2- Kit içeriğinde bulunan tüm kimyasallar vorteks ile karıştırıldı.
- 3- Kitin içerisinde bulunan karışım hazırlanarak RNA karışımına eklendi. Kit içeriğinden revers transkriptaz enzime en son olarak eklendi. Tüpler ters-düz edilerek iyice karıştırılması sağlandı.
- 4- Örnekler buz üzerinde 5 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Tablo 3.3'deki PZR programı ile reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA örnekleri eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yapılana kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

Tablo 3.3. Ters transkripsiyon PZR programı.

Aşama	Süre	Sıcaklık (°C)
Priming	5 dakika	25
Reverse transcription	20 dakika	46
RT inactivation	1 dakika	95
Hold	∞	4

3.2.7 Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR) Yöntemi

Eş zamanlı PZR yöntemi, nükleik asitlerin çoğalmasıyla oluşan ürünlerin çeşitli problemlerle verdiği sinyalin kantitatif olarak ölçülebildiği bir yöntemdir. Alınan floresans yoğunluğu ile PZR ürünü arasında doğrudan korelasyon bulunduğu ve ayrıca oluşturulan sıcaklık döngüleri ile sinyalin oluşumu aynı anda aynı reaksiyonda gerçekleştiği için güvenli ve kullanışlı bir yöntemdir. Yapılan çalışmada spesifik dizilere bağlanan ve yüksek verimliliğe sahip prob sistemi olan iki-işaretli TaqMan® prob lar kullanıldı. Bu yöntemde prob lar bağlandıktan sonra PZR primerleri diziy e bağlanır ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşir. Bu uzama işlemi esansında Taq polimerazın 5'-ekzonükleaz özelliği sayesinde, proba bağlı florofor kesilerek floresans ışım a gerçekleşir. Araştırılacak olan CIITA transkriptinin incelenmesi için transkript boyutu ve özellikleri göz önünde bulundurularak qRT-PZR yöntemi tercih edilmiştir.

3.2.8 CIITA İfade Düzeylerinin Ölçümü

CIITA'nın qRT-PZR'u için "TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG" ve "TaqMan® CIITA primer prob (Mm00482914_m1, 4331182) kullanıldı. Ekspresyon seviyelerinin normalizasyonu için endojen kontrol olarak "TaqMan® GAPDH primer prob (Mm99999915_g1, 4331182)" kullanıldı. TaqMan® prob lar ve örneklerden elde edilen cDNA kullanılarak qRT-PZR analiz işlemi aşağıda gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

1- Örneklerden elde edilen cDNA'lar, TaqMan® CIITA ve GAPDH primer problemler buz üzerinde çözüldü.

2- "TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG" hafifçe vorteks edildi.

3- Yapılacak olan her bir assay için reaksiyon sayıları üçer tekrarlı olmak üzere hesaplandı.

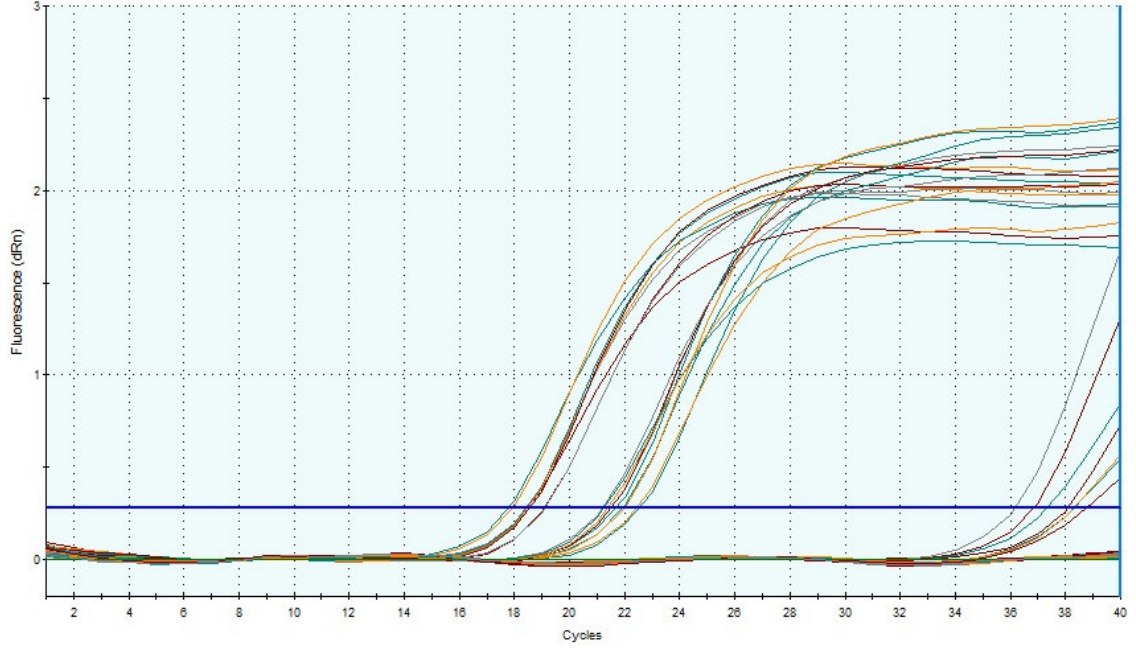
4- Örneklerden elde edilen cDNA'lar her biri için bir CIITA assay, bir endojen kontrol GAPDH assay ve bir kalıp içermeyen kontrol olacak şekilde tasarlandı.

5- qRT-PZR reaksiyonu Tablo 3.4'de gösterildiği gibi içerik ve miktar olarak hazırlandı. Her bir assay farklı steril 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüplerinde toplamda 20µl hacimde olacak şekilde hazırlanarak reaksiyondan önce hafifçe karıştırıldı.

6- Oluşturulan qRT-PZR karışımı ve örneklerden elde edilen cDNA örnekleri, üçer tekrarlı olacak şekilde kullanılan qRT-PZR cihazına uygun 96-kuyucuklu plakalar içersine mikropipetler yardımıyla aktarıldı ve plaka eş zamanlı PZR cihazına yerleştirildi.

7- qRT-PZR programı Tablo 3.5'de gösterilen şekilde ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.

8- qRT-PZR reaksiyonunun tamamlanmasından sonra rölatif CIITA ekspresyon düzeyleri CIITA CT değerlerinin, endojen kontrol olan GAPDH CT değerine normalize edildiği $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Reaksiyon sonrası elde edilen temsili amplifikasyon grafiği

Tablo 3.4. qRT-PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Bir reaksiyon için hacim (µl)
cDNA	2 µl
TaqMan® primer prob	1 µl
TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG	10 µl
Nükleaz içermeyen su	7 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.5. CIITA düzeylerinin tayin edildiği program

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
UNG inkübasyonu	50	2 dakika
Enzim aktivasyonu	95	10 dakika
Denatürasyon	95	15 saniye (40 Döngü)
Bağlanma/Uzama	60	5 dakika (40 Döngü)

3.2.9 İstatistiksel Analiz

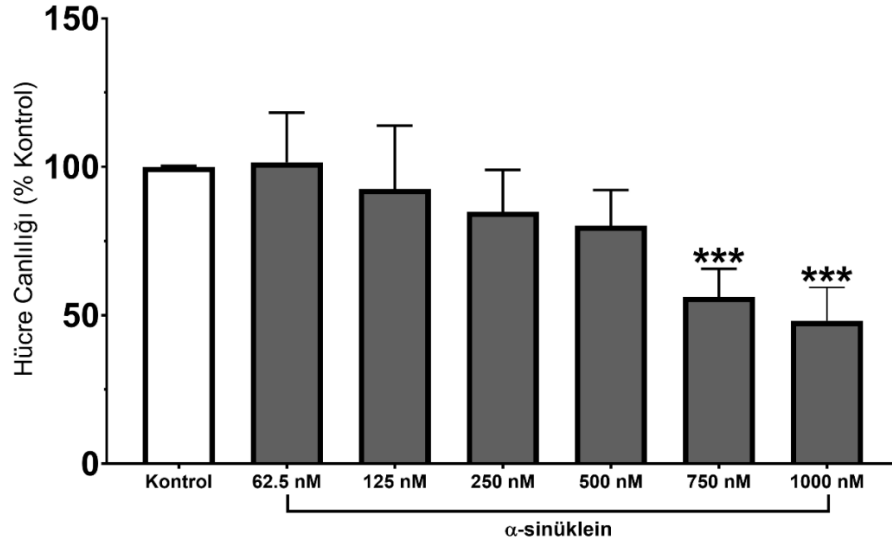
Deneyler sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS (v21.0 Illionis, US) programıyla analiz edildi. Çoklu grup karşılaştırmaları veri dağılımının normalliği incelendikten sonra one-way ANOVA veya Kruskal-wallis testi ile kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar Mann Whitney U veya Tukey-Tamhane testleri ile yapıldı. Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. P değeri 0.05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



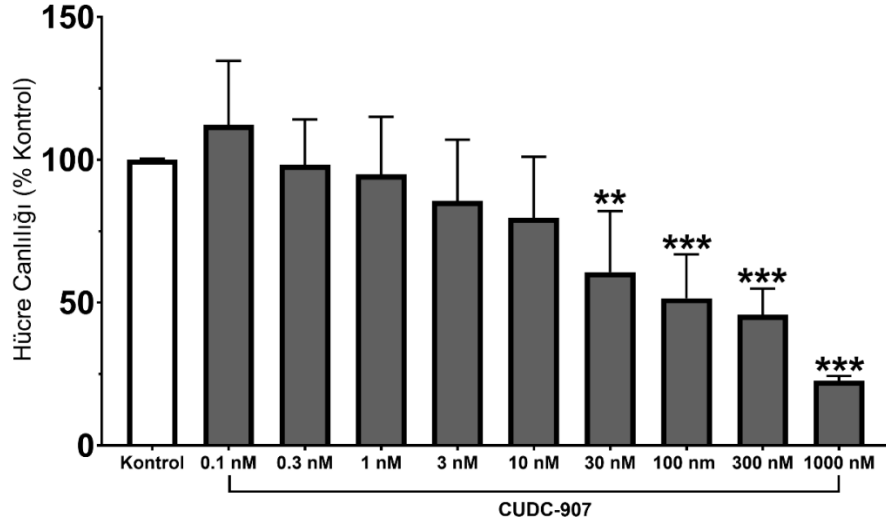
4. BULGULAR

4.1 Sitotoksikite Testlerinin Sonuçları

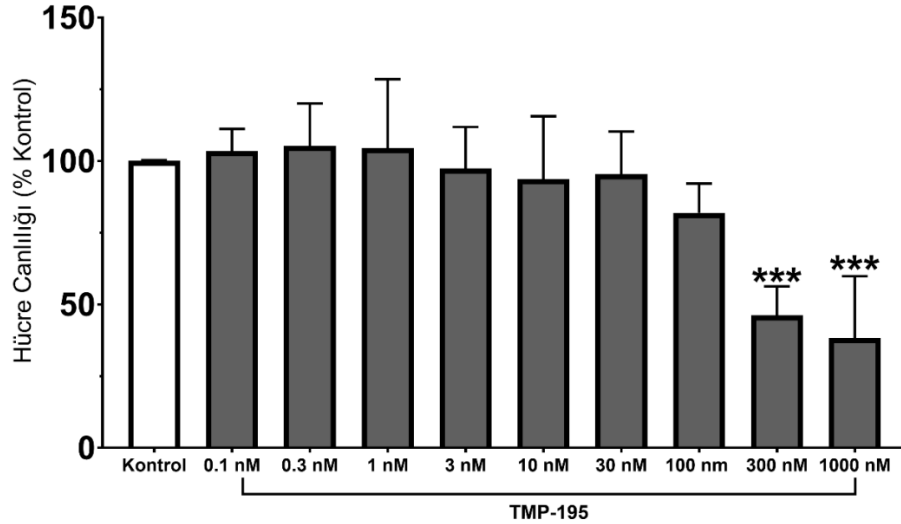
α -sinüklein 62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 nM konsantrasyonlarında, CUDC-907 ve TMP-195 logaritmik artan konsantrasyonlarda (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM) 6 ve 12 saat hücre hatlarına uygulanarak MTT yöntemiyle sitotoksik olmayan konsantrasyonları belirlendi. α -sinüklein 500 nM'ı aşan dozlarda BV-2 hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdi. α -sinüklein 750 ve 1000 nM dozlarında BV-2 hücre hatlarında anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttı (Şekil 4.1). CUDC-907'nin 10 nM'ı aşan dozlarda BV-2 hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdi. CUDC-907 30, 100, 300, 1000 nM dozlarında BV-2 hücre hatlarına uygulandığında hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azaldı (Şekil 4.2). TMP-195'in 300 nM'ı aşan dozlarda BV-2 hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. 300 ve 1000 nM dozlarında uygulanan TMP-195, BV-2 hücre hattında canlılığı anlamlı bir şekilde azalttı (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. α -sinükleinin farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi. BV-2 mikroglia hücrelerine artan konsantrasyonlarda α -sinüklein uygulamasından sonra hücre canlılığını gösteren MTT grafiği. Mikroglial hücrelere 6 saat boyunca 62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 nM konsantrasyonlarında α -sinüklein uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise %0.1 DMSO uygulanmıştır. Grafiğin oluşturduğu veriler altı adet bağımsız deney sonucundan hareketle ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=6, ***p<0.001 kontrol grubu ile kıyaslandığında)

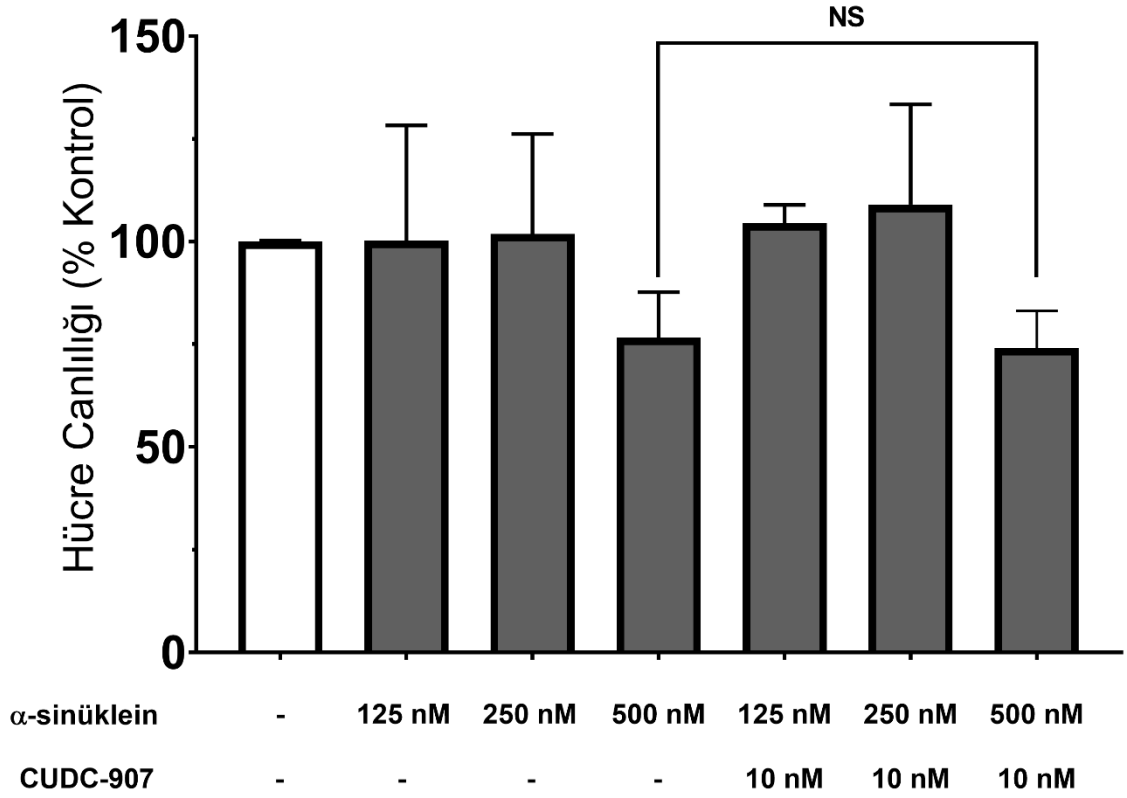


Şekil 4.2. CUDC-907'nin farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi. BV-2 mikroglia hücrelerine artan konsantrasyonlarda CUDC-907 uygulamasından sonra hücre canlılığını gösteren MTT grafiği. Mikroglial hücrelere 6 saat boyunca 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM konsantrasyonlarında CUDC-907 uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise %0.1 DMSO uygulanmıştır. Grafiğin oluşturduğu veriler altı adet bağımsız deney sonucundan hareketle ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=6, ***p<0.001, ** p<0.01 kontrol grubuyla kıyaslandığında)

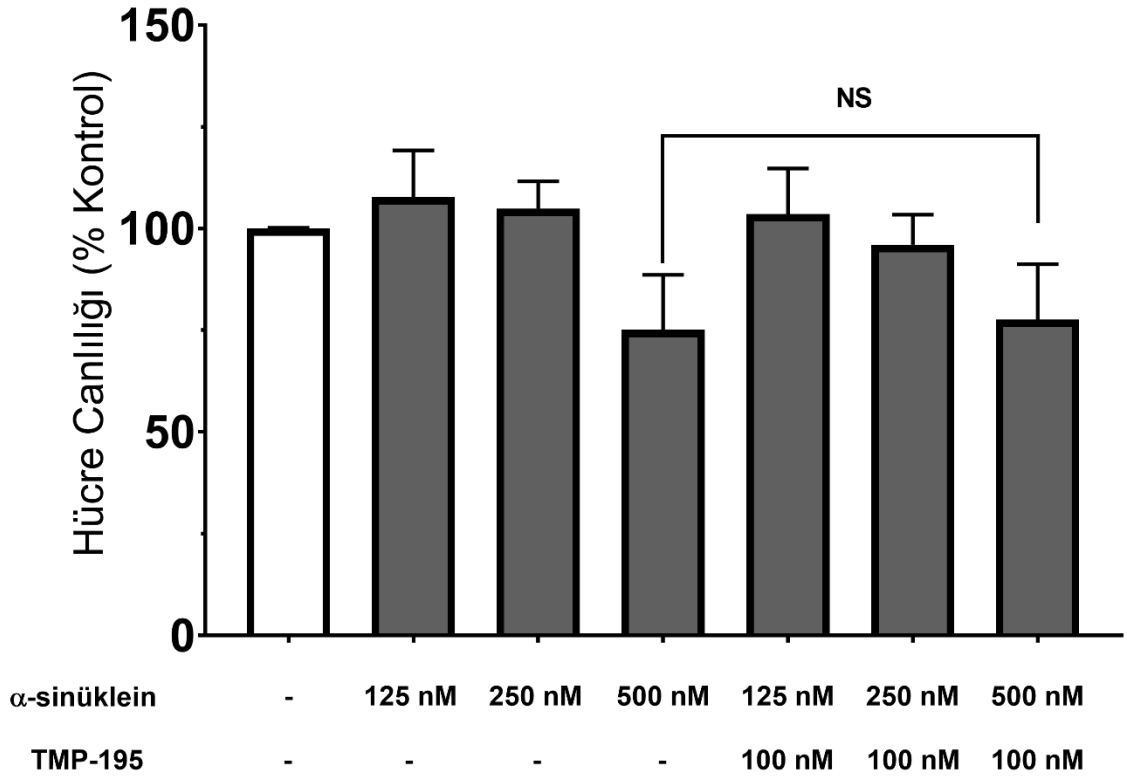


Şekil 4.3. TMP-195 farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulandıktan sonra hücre canlılığı üzerine etkisi. TMP-195 farklı konsantrasyonlarda BV-2 hücrelerine uygulandıktan sonra hücre canlılığı üzerine etkisi. Kontrol grubuna ise %0.1 DMSO uygulanmıştır. Grafiğin oluşturduğu veriler altı adet bağımsız deney sonucundan hareketle ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=6, ***p<0.001 kontrol grubu ile kıyaslandığında)

BV-2 mikroglial hücrelerine 62.5, 125, 250, 500 α -sinüklein uygulandığında hücre canlılığında anlamlı bir azalma olmadı (Şekil 6). CUDC-907 ve TMP-195 birlikte α -sinüklein uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmış ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda α -sinüklein ile birlikte sitotoksik olmayan konsantrasyondaki CUDC-907 ve TMP-195 uygulamasının hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.4 ve 4.5).



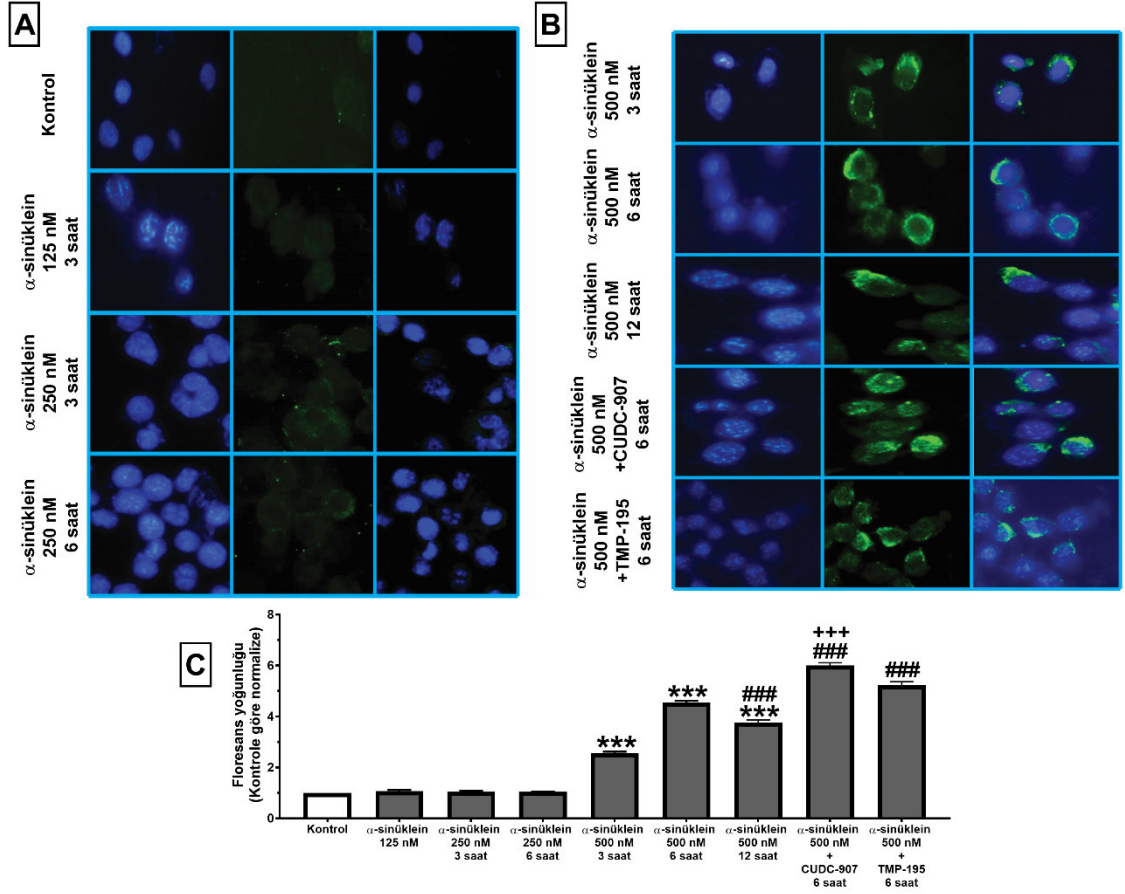
Şekil 4.4. 10 nM CUDC-907'nin 125, 250 ve 500 nM α -sinüklein birlikte uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi. Grafiğin oluşturduğu veriler altı adet bağımsız deney sonucundan hareketle ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=6)



Şekil 4.5. 100 nM TMP-195'in 125, 250 ve 500 nM α -sinüklein birlikte uygulanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi. Grafiğin oluşturduğu veriler altı adet bağımsız deney sonucundan hareketle ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=6)

4.2 MHC-II Ekspresyonunun İmmünofloresans Yöntem İle Gösterilmesi

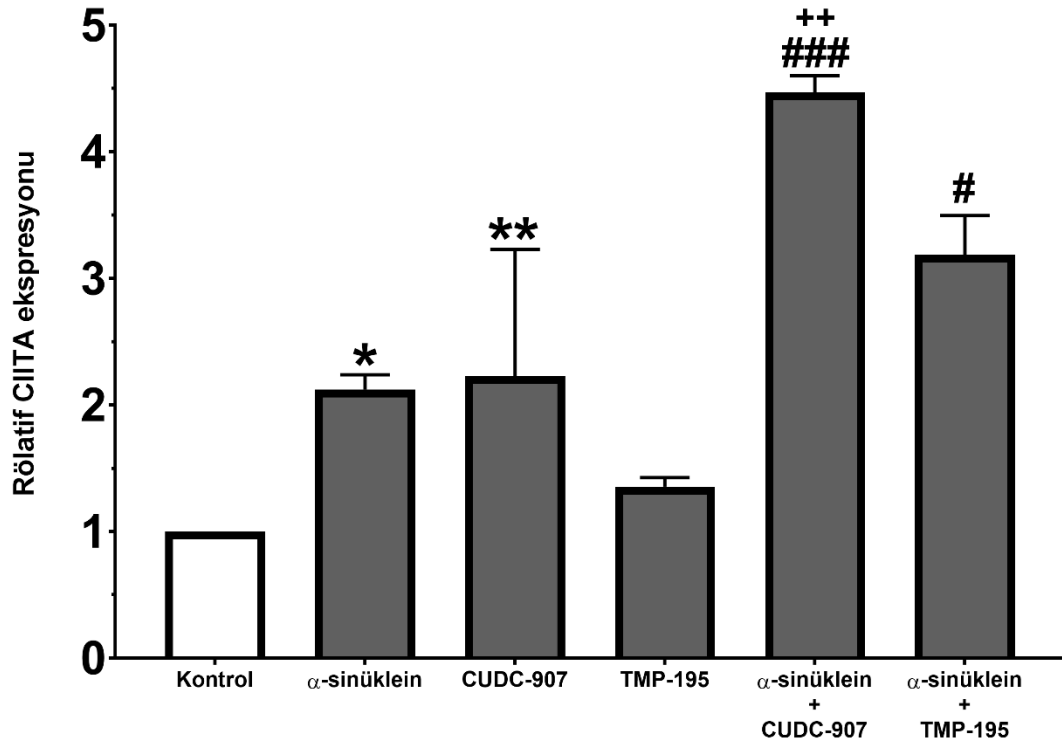
BV-2 hücre hatlarına 3, 6, 9 ve 12 saat boyunca sırasıyla 125, 250 ve 500 nM α -sinüklein uygulandı. 125 ve 250 nM dozlarında α -sinüklein uygulamasının MHC-II ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 4.6A, C). Ancak α -sinüklein uygulamasını takiben α -sinüklein'in 500 nM dozunda MHC-II ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını ve bu etkinin 6 saatte en şiddetli olduğu, 12 saat uygulamasında anlamlı olarak azaldı (Şekil 4.6A,C). 10 nM CUDC-907 ve 100 nM TMP-195'in 500 nM α -sinüklein ile birlikte 6 saat uygulanmasında ise MHC-II ekspresyonunun anlamlı olarak arttı (Şekil 4.6B,C). Ayrıca bu artışın CUDC-907'de TMP-195'e kıyasla anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterildi (Şekil 4.6B,C).



Şekil 4.6. Tüm deney gruplarının floresans yoğunluğunun karşılaştırılması. 125, 250 ve 500 nM α-sinüklein'in 3,6 ve 12 saat uygulanmasının MHC-II ekspresyonuna etkisi (A).500 nM α-sinüklein ve CUDC-907 (10 nM), TMP-195'in (100 nm) 6 saat uygulanmasının MHC-II ekspresyonuna etkisi (B). (n=5, ***p<0.001 kontrol grubu ile kıyaslandığında, ###p<0.001 α-sinüklein 500 nM 6 saat grubuyla kıyaslandığında, +++p<0.001 α-sinüklein 500 nM 6 saat+TMP-195 grubuyla kıyaslandığında)

4.3. CIITA Ekspresyonunun Eş Zamanlı-PZR Reaksiyonuyla Belirlenmesi

Sitotoksiste ve immünofloresans deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda α-sinüklein, CUDC-907 ve TMP-195 uygulamasından CIITA ekspresyonunu eş zamanlı-PZR reaksiyonuyla analiz edildi (Şekil 4.7). 500 nM α-sinüklein'nin 6 saat boyunca uygulamasının CIITA ekspresyonunda kontrole göre 2.12 kat artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 4.7). TMP-195'in tek başına uygulaması CIITA ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olmadı fakat CUDC-907'un tek başına uygulamasının CIITA ekspresyonunu 2.22 kat artırdığı gözlemlendi (Şekil 4.7). Fakat, CUDC-907 ve TMP-195'in α-sinüklein ile birlikte uygulanması CIITA'nın ekspresyonun sırasıyla 4.47 ve 3.18 kat artmasına neden olduğu görüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. α-sinüklein, CUDC-907 ve TMP-195'in ayrı olarak ve birlikte uygulanmasının CIITA ekspresyonu üzerine etkisi. (n=3, **p<0.01 kontrol *p<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ###<0.001, #<0.05 α-sinüklein ile karşılaştırıldığında, ++p<0.01 α-sinüklein+TMP-195 ile karşılaştırıldığında)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, PH'nın patolojisinden sorumlu olduğu düşünülen nöronlar için toksik bir protein olan α -sinüklein uygulanan mikrogliyal hücre kültüründe histon deasetilaz inhibitörleri olan CUDC-907 ve TMP-195'in antijen sunumu üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Deney sonuçlarımız, 6 saat boyunca α -sinüklein'e maruz kalan mikrogliyal hücre kültüründe MHC-II ve CIITA ekspresyonunun indüklendiğini göstermektedir. Ayrıca iki farklı grup histon deasetilaz enzimini inhibe eden CUDC-907 ve TMP-195'in, α -sinüklein uygulaması ile artan MHC-II ve CIITA ekspresyonunu daha çok artırdığını ve bu artışın CUDC-907'de daha olduğunu göstermektedir. CUDC-907 ve TMP-195'in bu etkisi patolojik formdaki α -sinüklein ile artan antijen sunumunun histon asetilasyonunun artmasıyla daha belirginleşmesi dolayısıyla T hücre cevabı oluşmasından sorumlu MHC-II'nin artarak nörodejenerasyonun şiddetlenmesi olarak yorumlanabilir. Hipotetik olarak artan histon asetilasyonunun literatürde bulunan bilgilere paralel olarak antijen sunumunda rol oynayan gen (CIITA) ve proteinin (MHC-II) artmasıyla otoimmün yanıt oluşmasına neden olduğu düşünülebilir.

Özellikle PH'de temel nedenlerden biri olarak kabul edilen α -sinüklein'in otoimmün cevabı oluştururken prion-benzeri özelliklerinin olduğunun gösterilmesinin ardından α -sinüklein'e karşı ortaya çıkan otoimmünitenin başlangıç yerinin araştırılmasına ve birçok yeni hipotez ortaya atılmasına neden olmuştur (Jiang, Li, Xu, Gao, and Chen, 2018). Özellikle daha önceden "immün-ayrıcıklı" olarak kabul edilen santral sinir sisteminin periferal immün hücrelerle etkileşebildiğinin ve bu etkileşimin birçok nörodejeneratif hastalıkta rol oynadığının gösterilmesinin ardından periferal immünite ve santral etkileşimin önemi artmıştır (Su and Federoff, 2014). α -sinüklein'in Parkinson hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde arttığının ortaya çıkması ve Parkinson hastalarından alınan kanlarda CD4, CD8 T-lenfositlerin sayılarının artmış olması otoimmün hipotez doğrultusunda yapılan araştırmaların artmasına sebep olmuştur (Brochard et al., 2009). PH ile ilgili otoimmün hipotez üzerine yapılan ilk araştırmalar 1978 yılında Abramsky ve Litvin tarafından yapılmış ve striatal dopamin reseptörlerine karşı oluşan immün cevabın hastalıkla ilişkili olabileceği fikri ortaya atılmıştır (Abramsky and Litvin, 1978). Daha sonrasında 1988 yılında McGeer ve arkadaşları post-mortem analizlerde mikrogliyal HLA-DR-pozitif olduğunu ve bu

mikrogliaların dopamin nöronların temel yapısını oluşturan serbest melaninin fagositozundan sorumlu olduğunu göstermişlerdir (McGeer, Itagaki, Boyes, and McGeer, 1988). 1994 yılında Fiszer ve 2003 yılında Lampe Parkinson hastalarından alınan kan örneklerinde MHC-II ekspresyonu gösteren monositlerin kontrol grubuna kıyasla arttığını göstermiştir (Fiszer, Mix, Fredrikson, Kostulas, and Link, 1994). Daha sonra 2011 yılında Nalls ve arkadaşları tarafından yapılan genom çaplı ilişkilendirme çalışması HLA-DR veya HLA-DQ ekspresyonunun ve artmış MHC-II'nin PH için risk faktörü olabileceğini göstermiştir (International Parkinson Disease Genomics et al., 2011). Reynolds 2007, 2009 ve 2010 yıllarında yaptığı çalışmalarda, farelerde MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde Treg hücrelerinin mikroglial fonksiyonu kontrol ederek serbest oksijen radikallerini ve NF- κ B aktivasyonunu baskıladığını böylece mikroglial kontrolü sağladığını göstermiştir (Reynolds, Banerjee, Liu, Gendelman, and Mosley, 2007; Reynolds et al., 2010; Reynolds, Stone, Mosley, and Gendelman, 2009) Artmış MHC ekspresyonu ile T lenfosit cevabının santral ve periferik ayrımının yapılmasıyla periferik T lenfositlerin ve santral mikrogliaların anti ve pro-inflamatuar cevapta farklı rol aldıkları gösterilmiştir. BV-2 hücrelerinin oligomer ve monomer α -sinüklein'e kıyasla fibriler formu daha seçici fagositte ettiği gösterilmiştir (Hoffmann et al., 2016). Mikroglial hücrelerin agregre ve fibril formdaki α -sinüklein'i direkt olarak internalize ederek MHC-II, iNOS, NF- κ B ve pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin salınımına neden olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Thome, Harms, Volpicelli-Daley, and Standaert, 2016). Ayrıca yapılan bu çalışmalarda BV-2 hücre hattının LPS ve α -sinüklein gibi patojen etkenlere karşı gösterdiği immün aktivasyonun araştırılması için kullanılabileceği ifade edilmiştir (Henn et al., 2009). Bu nedenle biz de tez çalışmamızda fibriler formun etkisini araştırmayı tercih ettik.

Otoimmün ve prion benzeri hipotezlerin ortak noktası olan ve özellikle PH'nin oluşmasında rol oynadığı düşünülen epigenetik etkiler hem bu hipotezlerin eksik yanlarının aydınlatılmasında hem de yeni tedavi umutları için önemli hale gelmiştir. Günümüzde PH'nin oluşmasında risk faktörü olarak kabul edilen çevresel pestisit ve kimyasal maruziyetin epigenetik modifikasyonlara sebep olması ve deneysel modellerde bu ajanların α -sinüklein inklüzyonlarına neden olması bu hastalıkta üç farklı (otoimmün-

prion benzeri yayılım-epigenetik) mekanizmanın rol aldığını düşündürmektedir. Her ne kadar histonlar metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, ubikütinasyon, sumolasyon, nitrozilasyon gibi birçok modifikasyona uğrasalar da mevcut bilgi ve araştırma yöntemleriyle metilasyon ve asetilasyon araştırmaları ön plana çıkmaktadır. Özellikle asetilasyon çalışmalarıyla ilgili bilgi birikiminin fazla olması ve günümüzde histon deasetilasyon inhibitörlerinin klinikte ve klinik öncesi araştırmalarda kullanılıyor olması bu ajanların etkilerinin araştırılabilmesini kolaylaştırmaktadır. Birçok deneysel çalışma HDA inhibisyonunun immün hücre aktivasyonunu etkilediği ve bu etkinin HDA inhibitörlerinin nöroprotektif etkisinden sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Fakat HDAl (histon deasetilaz inhibitörü)-bağımlı immünosüpresyonun temel mekanizmasının tam olarak aydınlatılmamış olması ve nöroimmün aktivitede bazen artış ve bazen de azalmaya sebep olması daha spesifik araştırmaların yapılmasına neden olmuştur. Her ne kadar 2007 yılında Broide ve arkadaşları yaptığı çalışmadan HDA izoformlarının astrosit veya mikroglialarda olmadığını iddia etse de daha sonra yapılan çalışmalarda mikroglial hücrelerin yaşam döngüleri ve fonksiyonları için HDA izoformlarının gerekli olduğunu göstermiştir (Broide et al., 2007; Datta et al., 2018). Bu ajanlardan vorinostat ve aktif metaboliti ITF2357, histon asetilasyonunu sitotoksik etki göstermeden dramatik olarak artırdığı bilinen bileşiklerden biridir (Dietz and Casaccia, 2010). Her iki molekülün de glial hücre kültürlerinde LPS ile indüklenen pro-inflamatuvar mediyatör ekspresyonunu azalttığı ve aynı zamanda deksametazon ile indüklenen immünosüpresif yanıtı güçlendirdiği bilinmektedir. 2018 yılında Ellmeier ve Seiser HDAl'lerinin sitokin ekspresyon profilini değiştirdiğini ileri sürmüştür (Ellmeier and Seiser, 2018). Ayrıca Harms ve arkadaşları 2017 yılında yaptığı çalışmada monomerik ve kısa zincirli α -sinüklein'in, fibril α -sinüklein zincirlerinden farklılıklarını mikroglialar üzerinde araştırmış ve α -sinüklein'in primer mikroglialarda MHC-II up-regülasyonunu anlamlı bir şekilde indüklediğini DQ-ovalbumin kullanarak göstermiştir (Harms et al., 2017). Aynı çalışmada, Parkinson hastalarının beyin-omurilik sıvısı ve serumlarında bulunan inflamatuvar mediyatörler ve kemokinleri incelemiş ve α -sinüklein uygulanan mikrogliaların interlökin-6 (IL-6), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), interlökin-1 α (IL-1 α), interlökin-17 (IL-17), kemokin ligand-10 (CXCL10), kemokin ligand-1 (CXCL1), kemokin ligand-2 (CCL2), makrofaj inflamatuvar protein-1 (MIP-1),

makrofaj inflamatuvar protein 1 α (MIP-1 α), makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) ve tümör nekroz faktör (TNF) salıverilmesinde anlamlı artışa sebep olduğu gösterilerek mikrogliaların bu mediyatörlerin salıverilmesi üzerine olan direkt etkisi ortaya çıkarılmıştır (Harms et al., 2017).

PH'de MHC-II hipotezinin açıklanmasında genel olarak üç fikir öne sürülmektedir. 1) Mikrogliaların sayısının artarak MHC-II ekspresyonunda ortaya çıkan ve dolayısıyla oluşan CD4 cevabındaki artış, 2) MHC-II eksprese eden periferel mononükleer hücrelerin hastalığın başlamasını takiben santrale göçlerinin artması 3) Mikrogliaların MHC-II ekspresyonunu takiben pro-inflamatuvar karaktere bürünerek hücre ölümünü ve apoptozunu etkileyen mediyatörleri salıvermesi. MHC-II'nin immün yanıt için önemli rol oynayarak T ve B lenfositlere antijen sunması otoimmünite ile PH arasındaki ilişkisiyi güçlendirmektedir. Dolayısıyla hastalığın başlangıç safhalarında MHC-II yanıtının hücre ölümüyle ilişkisinin araştırılması bu hücrelerin rolünü ve tedavi alternatiflerini genişletmesi olasıdır. Mikroglialardaki MHC-II moleküllerinin santral sinir sistemi hastalıklarındaki rolü ve patolojik durumlardaki etkileri birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Imamura et al., 2003). Mackenzie, MHC-II pozitif mikrogliaların farklı beyin bölgelerinde bulunan Lewy cisimcikleriyle etkileştiğini ve genellikle dejenere nöronlarda bu ilişkinin korelasyonunu göstermiştir (Mackenzie, 2000). Hücre içerisinde MHC-II proteinlerinin endozomal veya lizozomal kompartmanlara hareket ederek invariant zincir sayesinde lizozomal enzimlerle antijen kazanarak bu antijenleri CD4 hücrelerine sunmak üzerine hücre membranına göç ettiği bilinmektedir (Dani et al., 2004). Ancak, mikroglial hücrelerin antijen yanıttan sorumlu MHC-II ekspresyonu ve bu ekspresyonla oluşturulan cevabın oto-immün, α -sinüklein ve histon asetilasyonu üçgeninden nasıl etkilendiğine dair literatürde bulunan bilgiler kısıtlıdır. α -sinüklein'in hücre içine girişi ve yayılımında birçok mekanizmanın rol aldığı ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalardan biri olan TLR2 reseptörünün patolojinin ve yayılımının varlığı için gerekliliğinin aydınlatılması immün cevap ile olan ilişkinin derinlemesine incelenmesine neden olmuştur (Kim et al., 2013). TLR2'nin MHC-II ile olabilecek olası ilişkileri incelenmiş ancak α -sinüklein ile bağlantısı hakkındaki bilgiler kısıtlıdır. Ancak, glioma hücrelerinde TLR2'nin indüklenmesinin MHC-II'nin ekspresyonundan sorumlu CIITA'yı baskıladığı gösterilmiş ve bu mekanizmanın kanser

hücrelerinin immün cevaptan kaçınmak için kullanıldığı öne sürülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada TLR2 aktivasyonunun MAPK/ERK1/2 sinyalini tetikleyerek CIITA promotörlerinde H3 asetilasyonunun azalmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (J. Qian et al., 2018). Her ne kadar bu fikir α -sinüklein sonrası TLR2 sinyal yolağının aktifleşmesiyle CIITA ekspresyonunda azalma hipotezini ortaya çıkarsa da α -sinüklein'in yalnızca bazı oligomer konformasyonlarının TLR2 için ligand olduğu düşünülmüştür. Bu sayede α -sinüklein'in hücre çekirdeğinde histon asetilaz gibi davranarak CIITA'nın promotör bölgesinde artırdığı asetilasyon sonucu ortaya çıkan ekspresyon artışını açıklamaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada ilk kez in vitro α -sinüklein ile indüklenen BV-2 mikroglyal hücrelerin MHC-II ekspresyonunun histon asetilasyonundan nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda α -sinüklein ile ortaya çıkan MHC-II cevabının doz ve uygulama süresiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. MHC-II'nin α -sinüklein'in 125, 250 nM dozlarında uygulanmasında herhangi bir etki görülmezken, 500 nM dozunda ekspresyonu tespit edilmiş ve bu etkinin en şiddetli olarak altıncı saatte olduğu görülmüştür. Bu nedenle MHC-II ekspresyonunun HDAl'lerden nasıl etkilendiğinin ortaya çıkartılması için altı saat uygulama takvimi tercih edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda α -sinüklein'in en potent etki süreleri farklı hücre hatları da dahil olmak üzere 4-6 saat olarak gösterilmiştir (Harms et al., 2013).

HAT veya HDA'lar ile oluşturulan protein asetilasyonu dengesinin bozulması gen ekspresyonu, otofaji ve hücre ölümü gibi birçok hücreyel olayı etkilediğinden aslında her iki enzim de PH'nin patogeneziyle yakından ilişkilidir (Yakhine-Diop et al., 2019). Dopaminerjik hücrelerde nörotoksinler, histon asetilasyon seviyelerini artırarak apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Fakat deneysel Parkinson modeli oluşturmada kullanılan paraquat ve rotenonun HDA'yı azalttığı, dieldrinin ise HAT aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Feng et al., 2015; Song et al., 2010). In vivo deneylerde ise parakuat ile indüklenen deneysel Parkinson modelinde oluşan α -sinüklein'in histon hipoasetilasyonuna neden olması literatür bilgisi ile bağdaşmaktadır. Kimyasallarla indüklenen deneysel modellerle yapılan araştırmalardan çıkan ve birbiriyle çelişen bu bilgilerden hareketle HDA ve HAT inhibitörlerinin sitoprotektif

etkiler gösterebileceği düşünülmektedir (Yakhine-Diop et al., 2019). Yakın zamanda idiopatik (LRRK2) ve genetik (G2019S LRRK2) Parkinson hastalarının fibroblastlarında yapılan araştırmada asetilenmiş protein seviyelerinin farklılıkları gösterilmiştir. Bu farklılıkların yüksek molekül ağırlıklı proteinlerde daha belirgin olması idiopatik Parkinson hastalarında hipoasetilasyonun varlığını, genetik PH'de ise hiperasetilasyonun varlığını işaret etmesi çelişkiyi güçlendirmiştir. Yakhine-Diop ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada HAT ve HDA'ların idiopatik PH'ye sahip hücrelerde hipoasetillenmiş proteinlerin hasarlı mitokondrilerin birikmesiyle oluştuğunu varsaymışlardır (Yakhine-Diop et al., 2019). HDA2, HDA3 ve HDA4'ün inhibisyonunun bu farklılıkların önüne geçerek PH modellerinde hücre ölümünü azaltacağı varsayılmaktadır. Datta ve arkadaşlarının 2018'de yaptığı çalışmada ise HDA1 ve HDA2'nin mikroglial fonksiyon üzerine olan etkilerinin araştırılmasında yapılan çalışmada HDA1 ve HDA2'nin genetik olarak silinmesinin mikroglial amiloid fagositozunu artırarak Alzheimer patolojisinde görülen yükü azalttığı gösterilmiştir (Datta et al., 2018). Ayrıca HDA1/HDA2 selektif inhibitörünün MPTP ile oluşturulan Parkinson modelinde nöroprotektif etkiler sağlaması bu enzimlerin nöroproteksiyonda etkisi olabileceğini göstermektedir (Park et al., 2016). Bunlara ek olarak mikroglial HDA4'ün özellikle Parkinson hastalarının beyin dokularındaki lewy cisimciklerinin içerisinde bulunması, HDA4'ün potansiyel ilaç hedefi olarak düşünülmesine katkı sağlamaktadır (Chuang, Leng, Marinova, Kim, and Chiu, 2009). HDA'lar içerisinde inhibisyonuyla nöroprotektif etkilerin ortaya çıktığı son üye HDA6'dır (Simoes-Pires et al., 2013). Valproik asitle HDA 6 inhibisyonu sonucu nöroprotektif etkinin gösterilmiş olması HDA 6 y1 olası bir ilaç hedefi haline getirmektedir. Bizde tez çalışmamızda birçok alt sınıfa sahip HDA'ları iki deneysel farmakolojik ajan kullanarak araştırdık. Histon hiper-asetilasyonunun kromatin gevşemesini sağlayarak gen ekspresyonunu artırması, pro-inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunun HDAi tarafından baskılanması çelişkili gibi görünmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda HDAi'lerin hücrel immünoşüpresan etkilerinin temel mekanizmaları araştırılmış ve geniş etkili bir translasyon inhibitörü olan sikloheksimid kullanarak anti-inflamatuvar ve immünoşüpresan etkilerden translasyonel mekanizmaların araştırılması gerektiğini göstermiştir (Faraco et al., 2009). Yapılan çalışmada kodlama özelliği olmayan

RNA'ların bu etkilerden sorumlu olabileceği düşünülmüş, fakat mir-146 (mikroRNA-a ve b)'nin hem inflamasyon ajanlarından hem de vorinostat uygulamasından etkilenmemesi bu hipotezi çürütmüştür. Bu fikirler doğrultusunda HDAl-bağımlı immünosupresan etkilerin direkt transkripsiyon aktivasyonu ile ilgili olduğu hipotezini güçlendirmektedir. Ayrıca Villagra ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada HDAl1 izoformunun anti-inflamatuvar interlökin-10 (IL-10) ekspresyonunu regüle ettiğini ve antijen sunumuyla ilgili olan ilişkisinin araştırılması gerektiği fikrini ortaya koymuştur (Villagra et al., 2009). Bu bilgiler HDAl enzimlerinin alt sınıflarının selektif inhibitörlerle incelenerek farklılıklarının ve özellikle immünosupresan yanıt gibi sistemik cevapların mekanizmalarının aydınlatılmasını kaçınılmaz kılmaktadır.

Kullandığımız CUDC-907 HDAl 1,2,3,10 ve 11 alt sınıflarına karşı 1.7, 1.8, 2.8, 5.0 ve 5.4 nM IC50 değerine sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (C. Qian et al., 2012). Ayrıca diğer alt sınıfları araştırmak için kullandığımız TMP-195 HDAl 4, 5, 7, 9 alt sınıflarına karşı IC50 değerlerinin sırasıyla 15, 26, 59, 60 nM olduğu bilinmektedir (Lobera et al., 2013). Çalışmamız CUDC-907 ve TMP-195'in α -sinüklein ile birlikte 6 saat uygulanmasından sonra MHC-II ekspresyonunda artışa dolayısıyla mikroglyal hücrelerin antijen sunum fonksiyonlarının artmasına neden olduğu görülmüştür. Buna ek olarak bu etkinin daha fazla HDAl alt sınıfına etki eden CUDC-907'de daha olması bu alt sınıfların antijen sunumu ve immün mekanizmalardaki rollerinin etkileri hakkında literatürde bulunan bilgilerle uyumaktadır. Bu bilgilerden hareketle çalışmamıza uygulama süresi ve dozunu belirlediğimiz ajanların MHC-II'nin genomik regülatörü olarak kabul edilen CIITA üzerindeki etkisini araştırarak bu etkinin transkripsiyon düzeyinde nasıl değiştiğini aydınlatmaya çalıştık. Elde ettiğimiz sonuçlar histon asetilasyonunun farmakolojik ajanlarla artırılmasının MHC-II ekspresyonunu artırdığını göstermektedir. Histon asetilasyonunun artması sonucu ekspresyonda görülen bu artışın olası mekanizmasının açıklanması için mevcut literatür bilgilerinden hareketle MHC-II'nin regülatörü olan CIITA'nın ekspresyon düzeyindeki değişikliğe, dolayısıyla MHC-II transkripsiyonel düzeyde histon asetilasyonundan etkilenip etkilenmediğini ortaya çıkarmaya çalıştık. CIITA yapısal ve indüklenme sonrası MHC-II gen ekspresyonunun gerçekleşmesinde rol oynayan ve antijen sunumunda gerekli olarak kabul edilen bir transkripsiyonel koaktivatördür (Muhlethaler-Mottet, Di Berardino,

Otten, and Mach, 1998; Steimle, Otten, Zufferey, and Mach, 1993). Birçok hücre tipinde yapılan çalışmalar CIITA'nın immün etkenlerle MHC-II upregülasyonu için önem arz ettiğini göstermiştir (Chang, Guerder, Hong, van Ewijk, and Flavell, 1996; Zhao et al., 2007). *In vivo* ve *in vitro* olarak CIITA'nın lentiviral shRNA'lar ile susturulmasının MHC-II ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Harms et al., 2013; Williams et al., 2018). CIITA'nın metilasyon özelliklerinin araştırılması sonrasında bir metiltransferaz olan ko-aktivatör ilişkili metil transferaz-1 (CARM1)'in yapısal ve interferon- γ kaynaklı MHC-II ekspresyonu için gerekli olduğu fikrini güçlendirmektedir. MHC-II ekspresyonunun aktivasyonu birçok PH modelinde gösterilmiştir (Williams et al., 2018). Örneğin hidrokسيدopamin (6-OHDA) ve α -sinüklein'in fazla ekspresyonuyla oluşturulan modellerde MHC-II ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2019). Daha önceden yapılan çalışmalar α -sinüklein'in MHC-II aktivasyonunun doğal ve adatif bağışıklık cevaplarında ortaya çıktığı ve terapötik bir hedef olarak düşünülebileceğini göstermiştir (Harms et al., 2013). TSA ile HDA inhibisyonunun MHC-II gen transkripsiyonunu artırması fakat bu artışı yaparken CIITA gen promötörünün dimerini ayrıştırarak ekspresyonunu azaltması, bu molekülün HDA sınıflarının pan-inhibitörü özelliğinde olması ortaya çıkan etkinin iki yönlü olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca ekzojen HDA1 ve HDA2'nin baskılanmasıyla INF- γ (interferon-gama) ile indüklenen MHC-II gen aktivasyonunu ve CIITA fonksiyonunun azaltması çift taraflı etki fikrini desteklemektedir. Çalışmamızda eş zamanlı PZR reaksiyonuyla CIITA ekspresyonu araştırılmış ve α -sinüklein'in CIITA ekspresyonunu iki kattan fazla artırdığı bulunmuştur. Dolayısıyla bu bulgu çalışmamızda görülen α -sinüklein bağımlı MHC-II ekspresyonundaki artışla uyumaktadır. Ayrıca CIITA'nın bazal ekspresyon aktivitesinin olduğu bilinmekte olduğundan α -sinüklein uygulamadan CUDC-907 ve TMP-195 uygulamasının CIITA ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmış her iki ajanla da ekspresyon seviyesinin arttığı fakat bu etkinin yalnızca CUDC-907'de anlamlı olduğu görülmüştür. Buna ek olarak CUDC-907 ve TMP-195'in α -sinüklein ile uygulanmasının CIITA ekspresyonunu anlamlı olarak artırdığı görülmüştür. Bu artış MHC-II ekspresyon sonuçlarımızla uyumlamakla birlikte, etkinin CUDC-907'de daha fazla olması MHC-II ekspresyon seviyesindeki CUDC-907'de görülen TMP-195'e kıyasla

fazla artışı açıklamakta ve mekanizmasının CIITA kaynaklı olduğunu ortaya koymaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda α -sinüklein uygulmasının MHC-II ekspresyonunda artışa neden olduğu ve bu artışın CUDC-907 ve TMP-195 ile CUDC-907'de daha şiddetli olduğu bulundu. Ayrıca α -sinüklein'in CIITA ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığını ve bu etkinin MHC-II ekspresyon sonuçlarına paralel olarak CUDC-907 ve TMP-195 ile CUDC-907'de daha şiddetli olarak ortaya çıktığı bulundu. Çalışmamız sonucunda PH patolojisinde rol oynadığı düşünülen α -sinüklein'in santral sinir sisteminin birincil savunma hücreleri olarak kabul edilen mikrogliaların antijen sunumunu artırdığını ve bu artışın transkripsiyonel düzeyden histon asetilasyonunun artırılması sonucu ortaya çıktığını gösterdik. Bu doğrultuda bağışıklık sisteminde T hücrelerine antijen sunumunda primer rol oynayan MHC-II proteinin ve bu proteinin ana düzenleyicisi olan CIITA'nın ekspresyonunda α -sinüklein ve CUDC-907 ile TMP-195 gibi iki adet yeni nesil histon deasetilaz inhibitörleriyle birlikte uygulanmasının nasıl değişikliklere yol açtığını analiz ettik.

Bu sayede α -sinüklein patolojik formuyla santral sinir sisteminin bağışıklık hücreleri arasında ilişkinin gösterilmesinin ve bu ilişkinin histon asetilasyonu gibi epigenetik bir etkenle değişiminin aydınlatılması gelecek çalışmalara büyük bir bilgi aktarımı sağlayacaktır. İlerleyen zamanlarda bu etkileşim sonucunda CIITA ve MHC-II ekspresyonunun yanı sıra CIITA'nın transkripsiyon bölgelerinin ayrıntılı olarak incelenmesi ve alt ünitelerinde ortaya çıkabilecek farklılıkların aydınlatılması etyolojisinde epigenetik nedenlerin önemli bir kısmını oluşturduğu PH'de yeni tedavi arayışlarının ve olası yeni ilaç hedeflerinin gösterilmesinin önünü açacaktır. Bu sayede çalışmamız ilerleyen zamanlarda α -sinüklein ile ortaya çıkan antijen sunumu ve süregelen patolojisinin araştırılmasına ve bu ilişkinin epigenetik değişikliklerden nasıl etkilendiğinin aydınlatılmasına öncülük edecektir.

KAYNAKLAR

Abramsky, O., and Litvin, Y. (1978). Automimmune response to dopamine-receptor as a possible mechanism in the pathogenesis of Parkinson's disease and schizophrenia. *Perspect Biol Med*, 22(1), 104-114. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/733451>

Ammal Kaidery, N., Tarannum, S., and Thomas, B. (2013). Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities. *Neurotherapeutics*, 10(4), 698-708. doi:10.1007/s13311-013-0211-8

Ascherio, A., and Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol*, 15(12), 1257-1272. doi:10.1016/S1474-4422(16)30230-7

Ascherio, A., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Kawachi, I., Colditz, G. A., Speizer, F. E., and Willett, W. C. (2001). Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol*, 50(1), 56-63. doi:10.1002/ana.1052

Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., . . . Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, 152(4), 879-884. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546347>

Babinski, J., Jarkowski, B., and Plichet, X. (1921). Kinésie paradoxale. Mutisme parkinsonien. *Rev Neurol*, 37(12), 1266-1270.

Barrett, P. J., and Timothy Greenamyre, J. (2015). Post-translational modification of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Brain Res*, 1628(Pt B), 247-253. doi:10.1016/j.brainres.2015.06.002

Benedetti, M. D., Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E., . . . Rocca, W. A. (2000). Smoking, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Neurology*, 55(9), 1350-1358. doi:10.1212/wnl.55.9.1350

Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., Cartlidge, N. E., Parker, W. D., Jr., and Turnbull, D. M. (1991). Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 104(2), 203-208. doi:10.1016/0022-510x(91)90311-t

Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., . . . Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604), 256-259. doi:10.1126/science.1077209

Bordia, T., McGregor, M., Papke, R. L., Decker, M. W., McIntosh, J. M., and Quik, M. (2015). The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 protects against nigrostriatal damage in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp Neurol*, 263, 277-284. doi:10.1016/j.expneurol.2014.09.015

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 197-211. doi:10.1016/s0197-4580(02)00065-9

Breckenridge, C. B., Berry, C., Chang, E. T., Sielken, R. L., Jr., and Mandel, J. S. (2016). Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11(4), e0151841. doi:10.1371/journal.pone.0151841

Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., . . . Hunot, S. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 119(1), 182-192. doi:10.1172/JCI36470

Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., and Winrow, C. J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci*, 31(1), 47-58. doi:10.1007/BF02686117

Burre, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A. T., and Sudhof, T. C. (2013). Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature*, 498(7453), E4-6; discussion E6-7. doi:10.1038/nature12125

Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, 26, 267-298. doi:10.1146/annurev.neuro.26.010302.081142

Chang, C. H., Guerder, S., Hong, S. C., van Ewijk, W., and Flavell, R. A. (1996). Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity*, 4(2), 167-178. doi:10.1016/s1074-7613(00)80681-0

Charcot, J. (1892). La médecine vibratoire: Application des vibrations rapides et continues a traitement de quelques maladies du système nerveux. *Prog Méd*, 16, 149-151.

Chartier-Harlin, M. C., Dachsel, J. C., Vilarino-Guell, C., Lincoln, S. J., LePrete, F., Hulihan, M. M., . . . Farrer, M. J. (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89(3), 398-406. doi:10.1016/j.ajhg.2011.08.009

Chen, H., Dzitoyeva, S., and Manev, H. (2012). Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics. *Eur J Pharmacol*, 690(1-3), 51-59. doi:10.1016/j.ejphar.2012.06.019

Chen, J. F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y. H., Beilstein, M., . . . Schwarzschild, M. A. (2001). Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 21(10), RC143. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319241>

Chen, P. S., Wang, C. C., Bortner, C. D., Peng, G. S., Wu, X., Pang, H., . . . Hong, J. S. (2007). Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial

apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience*, 149(1), 203-212. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.06.053

Chuang, D. M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H. J., and Chiu, C. T. (2009). Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*, 32(11), 591-601. doi:10.1016/j.tins.2009.06.002

Dani, A., Chaudhry, A., Mukherjee, P., Rajagopal, D., Bhatia, S., George, A., . . . Mayor, S. (2004). The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment. *J Cell Sci*, 117(Pt 18), 4219-4230. doi:10.1242/jcs.01288

Datta, M., Staszewski, O., Raschi, E., Frosch, M., Hagemeyer, N., Tay, T. L., . . . Prinz, M. (2018). Histone Deacetylases 1 and 2 Regulate Microglia Function during Development, Homeostasis, and Neurodegeneration in a Context-Dependent Manner. *Immunity*, 48(3), 514-529 e516. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.016

De la Boe, S. (1690). *Opera Medica (Editio Altera Correctior and Emendatio)*. Amsterdam, The Netherlands: Danielem Elsevirium and Abrahamum Wolfgang, 1690.

Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P., and Bjorklund, A. (2012). Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis*, 45(3), 939-953. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.013

Del Tredici, K., and Braak, H. (2016). Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of alpha-synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 42(1), 33-50. doi:10.1111/nan.12298

Deng, H., Wang, P., and Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev*, 42, 72-85. doi:10.1016/j.arr.2017.12.007

Depboylu, C., Stricker, S., Ghobril, J. P., Oertel, W. H., Priller, J., and Hoglinger, G. U. (2012). Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *Exp Neurol*, 238(2), 183-191. doi:10.1016/j.expneurol.2012.08.020

Di Fonzo, A., Dekker, M. C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., . . . Bonifati, V. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72(3), 240-245. doi:10.1212/01.wnl.0000338144.10967.2b

Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., . . . Greenamyre, J. T. (2016). alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med*, 8(342), 342ra378. doi:10.1126/scitranslmed.aaf3634

Dietz, K. C., and Casaccia, P. (2010). HDAC inhibitors and neurodegeneration: at the edge between protection and damage. *Pharmacol Res*, 62(1), 11-17. doi:10.1016/j.phrs.2010.01.011

Dokmanovic, M., Clarke, C., and Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res*, 5(10), 981-989. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0324

Edison, P., Ahmed, I., Fan, Z., Hinz, R., Gelosa, G., Ray Chaudhuri, K., . . . Brooks, D. J. (2013). Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology*, 38(6), 938-949. doi:10.1038/npp.2012.255

Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P. J., Moisan, F., Galanaud, J. P., Delemotte, B., . . . Tzourio, C. (2009). Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*, 66(4), 494-504. doi:10.1002/ana.21717

Ellmeier, W., and Seiser, C. (2018). Histone deacetylase function in CD4(+) T cells. *Nat Rev Immunol*, 18(10), 617-634. doi:10.1038/s41577-018-0037-z

Faraco, G., Pittelli, M., Cavone, L., Fossati, S., Porcu, M., Mascagni, P., . . . Chiarugi, A. (2009). Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis*, 36(2), 269-279. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.019

FB, S. (1763). *Nosologia methodica*. Amstelodami: Sumptibus Fratrum Tournes.

Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., . . . Stefanova, N. (2013). Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*, 61(3), 349-360. doi:10.1002/glia.22437

Feng, Y., Liu, T., Dong, S. Y., Guo, Y. J., Jankovic, J., Xu, H., and Wu, Y. C. (2015). Rotenone affects p53 transcriptional activity and apoptosis via targeting SIRT1 and H3K9 acetylation in SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, 134(4), 668-676. doi:10.1111/jnc.13172

Fiszer, U., Mix, E., Fredrikson, S., Kostulas, V., and Link, H. (1994). Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. *Acta Neurol Scand*, 90(3), 160-166. doi:10.1111/j.1600-0404.1994.tb02699.x

Foix, C., and Nicolesco, J. (1925). *Les noyaux gris centraux et la région mésencéphalo-sous-optique*: Masson.

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., . . . Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*, 4(2), 160-164. doi:10.1038/ncb748

Garretti, F., Agalliu, D., Lindestam Arlehamn, C. S., Sette, A., and Sulzer, D. (2019). Autoimmunity in Parkinson's Disease: The Role of alpha-Synuclein-Specific T Cells. *Front Immunol*, 10, 303. doi:10.3389/fimmu.2019.00303

Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., . . . Brooks, D. J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21(2), 404-412. doi:10.1016/j.nbd.2005.08.002

Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a008862. doi:10.1101/cshperspect.a008862

Greenfield, J. G., and Bosanquet, F. D. (1953). The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 16(4), 213-226. doi:10.1136/jnnp.16.4.213

Hamza, T. H., Zabetian, C. P., Tenesa, A., Laederach, A., Montimurro, J., Yearout, D., . . . Payami, H. (2010). Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet*, 42(9), 781-785. doi:10.1038/ng.642

Harms, A. S., Cao, S., Rowse, A. L., Thome, A. D., Li, X., Mangieri, L. R., . . . Standaert, D. G. (2013). MHCII is required for alpha-synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci*, 33(23), 9592-9600. doi:10.1523/JNEUROSCI.5610-12.2013

Harms, A. S., Delic, V., Thome, A. D., Bryant, N., Liu, Z., Chandra, S., . . . West, A. B. (2017). alpha-Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. *Acta Neuropathol Commun*, 5(1), 85. doi:10.1186/s40478-017-0494-9

Harrison, I. F., Smith, A. D., and Dexter, D. T. (2018). Pathological histone acetylation in Parkinson's disease: Neuroprotection and inhibition of microglial activation through SIRT 2 inhibition. *Neurosci Lett*, 666, 48-57. doi:10.1016/j.neulet.2017.12.037

He, Y., Appel, S., and Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res*, 909(1-2), 187-193. doi:10.1016/s0006-8993(01)02681-6

Henn, A., Lund, S., Hedtjarn, M., Schratzenholz, A., Porzgen, P., and Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 26(2), 83-94. doi:10.14573/altex.2009.2.83

Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamano-Isorna, F., and Gestal-Otero, J. J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 52(3), 276-284. doi:10.1002/ana.10277

Hernan, M. A., Zhang, S. M., Rueda-deCastro, A. M., Colditz, G. A., Speizer, F. E., and Ascherio, A. (2001). Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol*, 50(6), 780-786. doi:10.1002/ana.10028

Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8(4), 382-397. doi:10.1016/S1474-4422(09)70062-6

Hoehn, M. M., and Yahr, M. D. (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17(5), 427-442. doi:10.1212/wnl.17.5.427

Hoffmann, A., Etle, B., Bruno, A., Kulinich, A., Hoffmann, A. C., von Wittgenstein, J., Schlachetzki, J. C. M. (2016). Alpha-synuclein activates BV2 microglia dependent on its

aggregation state. *Biochem Biophys Res Commun*, 479(4), 881-886. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.109

Holtman, I. R., Skola, D., and Glass, C. K. (2017). Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J Clin Invest*, 127(9), 3220-3229. doi:10.1172/JCI90604

Huang, H. Y., Lin, S. Z., Chen, W. F., Li, K. W., Kuo, J. S., and Wang, M. J. (2011). Urocortin modulates dopaminergic neuronal survival via inhibition of glycogen synthase kinase-3beta and histone deacetylase. *Neurobiol Aging*, 32(9), 1662-1677. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.010

Hughes, C. D., Choi, M. L., Ryten, M., Hopkins, L., Drews, A., Botia, J. A., . . . Klenerman, D. (2019). Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol*, 137(1), 103-120. doi:10.1007/s00401-018-1907-y

Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., and Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*, 106(6), 518-526. doi:10.1007/s00401-003-0766-2

International Parkinson Disease Genomics, C., Nalls, M. A., Plagnol, V., Hernandez, D. G., Sharma, M., Sheerin, U. M., . . . Wood, N. W. (2011). Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*, 377(9766), 641-649. doi:10.1016/S0140-6736(10)62345-8

Jiang, T., Li, G., Xu, J., Gao, S., and Chen, X. (2018). The Challenge of the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Is Autoimmunity the Culprit? *Front Immunol*, 9, 2047. doi:10.3389/fimmu.2018.02047

Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Yang, Y., Anantharam, V., and Kanthasamy, A. G. (2011). alpha-Synuclein negatively regulates protein kinase Cdelta expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *J Neurosci*, 31(6), 2035-2051. doi:10.1523/JNEUROSCI.5634-10.2011

Kalia, L. V., and Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, 386(9996), 896-912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3

Kannarkat, G. T., Cook, D. A., Lee, J. K., Chang, J., Chung, J., Sandy, E., . . . Tansey, M. G. (2015). Common Genetic Variant Association with Altered HLA Expression, Synergy with Pyrethroid Exposure, and Risk for Parkinson's Disease: An Observational and Case-Control Study. *NPJ Parkinsons Dis*, 1. doi:10.1038/nnpjparkd.2015.2

Kidd, S. K., and Schneider, J. S. (2011). Protective effects of valproic acid on the nigrostriatal dopamine system in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 194, 189-194. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.010

- Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., . . . Lee, S. J. (2013). Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*, 4, 1562. doi:10.1038/ncomms2534
- Kirilyuk, A., Shimoji, M., Catania, J., Sahu, G., Pattabiraman, N., Giordano, A., . . . Avantiaggiati, M. L. (2012). An intrinsically disordered region of the acetyltransferase p300 with similarity to prion-like domains plays a role in aggregation. *PLoS One*, 7(11), e48243. doi:10.1371/journal.pone.0048243
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., . . . Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608. doi:10.1038/33416
- Koller, E. J., Brooks, M. M., Golde, T. E., Giasson, B. I., and Chakrabarty, P. (2017). Inflammatory pre-conditioning restricts the seeded induction of alpha-synuclein pathology in wild type mice. *Mol Neurodegener*, 12(1), 1. doi:10.1186/s13024-016-0142-z
- Kontopoulos, E., Parvin, J. D., and Feany, M. B. (2006). Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum Mol Genet*, 15(20), 3012-3023. doi:10.1093/hmg/ddl243
- Kouli, A., Torsney, K. M., and Kuan, W. L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In T. B. Stoker and J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Brisbane (AU).
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980. doi:10.1126/science.6823561
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*, 46(4), 598-605. doi:10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::aid-ana7>3.0.co;2-f
- Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiaras, W. G., Pezzoli, G., . . . Smith, R. J. (2008). Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 82(4), 822-833. doi:10.1016/j.ajhg.2008.01.015
- Lee, E. J., Woo, M. S., Moon, P. G., Baek, M. C., Choi, I. Y., Kim, W. K., . . . Kim, H. S. (2010). Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1. *J Immunol*, 185(1), 615-623. doi:10.4049/jimmunol.0903480
- Lees, A. J., Hardy, J., and Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet*, 373(9680), 2055-2066. doi:10.1016/S0140-6736(09)60492-X
- Leng, Y., Marinova, Z., Reis-Fernandes, M. A., Nau, H., and Chuang, D. M. (2010). Potent neuroprotective effects of novel structural derivatives of valproic acid: potential

roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Neurosci Lett*, 476(3), 127-132. doi:10.1016/j.neulet.2010.04.013

Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., Deramecourt, V., Jacoupy, M., Nicolas, A., . . . International Parkinson's Disease Genomics, C. (2016). Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet*, 98(3), 500-513. doi:10.1016/j.ajhg.2016.01.014

Lionnet, A., Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Murayama, S., Takao, M., Adler, C. H., . . . Beach, T. G. (2018). Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathol*, 135(1), 1-12. doi:10.1007/s00401-017-1777-8

Lobera, M., Madauss, K. P., Pohlhaus, D. T., Wright, Q. G., Trocha, M., Schmidt, D. R., . . . Nolan, M. A. (2013). Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. *Nat Chem Biol*, 9(5), 319-325. doi:10.1038/nchembio.1223

Luger, K. (2003). Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 13(2), 127-135. doi:10.1016/s0959-437x(03)00026-1

Ma, C., Liu, Y., Neumann, S., and Gao, X. (2017). Nicotine from cigarette smoking and diet and Parkinson disease: a review. *Transl Neurodegener*, 6, 18. doi:10.1186/s40035-017-0090-8

MacDonald, J. L., and Roskams, A. J. (2008). Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. *Dev Dyn*, 237(8), 2256-2267. doi:10.1002/dvdy.21626

Mackenzie, I. R. (2000). Activated microglia in dementia with Lewy bodies. *Neurology*, 55(1), 132-134. doi:10.1212/wnl.55.1.132

Manyam, B. V. (1990). Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. *Mov Disord*, 5(1), 47-48. doi:10.1002/mds.870050112

Marinova, Z., Leng, Y., Leeds, P., and Chuang, D. M. (2011). Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. *Neuropharmacology*, 60(7-8), 1109-1115. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.09.022

Marinova, Z., Ren, M., Wendland, J. R., Leng, Y., Liang, M. H., Yasuda, S., . . . Chuang, D. M. (2009). Valproic acid induces functional heat-shock protein 70 via Class I histone deacetylase inhibition in cortical neurons: a potential role of Sp1 acetylation. *J Neurochem*, 111(4), 976-987. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06385.x

Marmorstein, R., and Roth, S. Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, 11(2), 155-161. doi:10.1016/s0959-437x(00)00173-8

Martin, H. L., Santoro, M., Mustafa, S., Riedel, G., Forrester, J. V., and Teismann, P. (2016). Evidence for a role of adaptive immune response in the disease pathogenesis of

the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Glia*, 64(3), 386-395. doi:10.1002/glia.22935

Mayeux, R., Marder, K., Cote, L. J., Denaro, J., Hemenegildo, N., Mejia, H., . . . et al. (1995). The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol*, 142(8), 820-827. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a117721

McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., and McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285-1291. doi:10.1212/wnl.38.8.1285

McKinnon, C., and Tabrizi, S. J. (2014). The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*, 21(17), 2302-2321. doi:10.1089/ars.2013.5802

McNaught, K. S., and Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 297(3), 191-194. doi:10.1016/s0304-3940(00)01701-8

Moon, H. E., and Paek, S. H. (2015). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol*, 24(2), 103-116. doi:10.5607/en.2015.24.2.103

Muhlethaler-Mottet, A., Di Berardino, W., Otten, L. A., and Mach, B. (1998). Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity*, 8(2), 157-166. doi:10.1016/s1074-7613(00)80468-9

Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., . . . Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 46(9), 989-993. doi:10.1038/ng.3043

Nicholas, A. P., Lubin, F. D., Hallett, P. J., Vattam, P., Ravenscroft, P., Bezard, E., . . . Standaert, D. G. (2008). Striatal histone modifications in models of levodopa-induced dyskinesia. *J Neurochem*, 106(1), 486-494. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05417.x

Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y. L., Hara, Y., . . . Wada, K. (2003). Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun*, 304(1), 176-183. doi:10.1016/s0006-291x(03)00555-2

Oberlander, U., Pletinckx, K., Dohler, A., Muller, N., Lutz, M. B., Arzberger, T., . . . Scheller, C. (2011). Neuromelanin is an immune stimulator for dendritic cells in vitro. *BMC Neurosci*, 12, 116. doi:10.1186/1471-2202-12-116

Okubadejo, N. U., Bower, J. H., Rocca, W. A., and Maraganore, D. M. (2006). Parkinson's disease in Africa: A systematic review of epidemiologic and genetic studies. *Mov Disord*, 21(12), 2150-2156. doi:10.1002/mds.21153

Olgiati, S., Quadri, M., Fang, M., Rood, J. P., Saute, J. A., Chien, H. F., . . . Bonifati, V. (2016). DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. *Ann Neurol*, 79(2), 244-256. doi:10.1002/ana.24553

Orr, C. F., Rowe, D. B., Mizuno, Y., Mori, H., and Halliday, G. M. (2005). A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain*, 128(Pt 11), 2665-2674. doi:10.1093/brain/awh625

Paisan-Ruiz, C., Bhatia, K. P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N. W., . . . Schneider, S. A. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol*, 65(1), 19-23. doi:10.1002/ana.21415

Park, G., Tan, J., Garcia, G., Kang, Y., Salvesen, G., and Zhang, Z. (2016). Regulation of Histone Acetylation by Autophagy in Parkinson Disease. *J Biol Chem*, 291(7), 3531-3540. doi:10.1074/jbc.M115.675488

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2), 223-236.

Peng, G. S., Li, G., Tzeng, N. S., Chen, P. S., Chuang, D. M., Hsu, Y. D., . . . Hong, J. S. (2005). Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res*, 134(1), 162-169. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.10.021

Pickrell, A. M., and Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85(2), 257-273. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., . . . Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047. doi:10.1126/science.276.5321.2045

Puschmann, A., Ross, O. A., Vilarino-Guell, C., Lincoln, S. J., Kachergus, J. M., Cobb, S. A., . . . Nilsson, C. (2009). A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early cortical dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord*, 15(9), 627-632. doi:10.1016/j.parkreldis.2009.06.007

Qian, C., Lai, C. J., Bao, R., Wang, D. G., Wang, J., Xu, G. X., . . . Voi, M. (2012). Cancer network disruption by a single molecule inhibitor targeting both histone deacetylase activity and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Clin Cancer Res*, 18(15), 4104-4113. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0055

Qian, J., Luo, F., Yang, J., Liu, J., Liu, R., Wang, L., . . . Chu, Y. (2018). TLR2 Promotes Glioma Immune Evasion by Downregulating MHC Class II Molecules in Microglia. *Cancer Immunol Res*, 6(10), 1220-1233. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0020

Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgiati, S., Breedveld, G. J., Graafland, J., . . . Bonifati, V. (2013). Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat*, 34(9), 1208-1215. doi:10.1002/humu.22373

Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., . . . Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 38(10), 1184-1191. doi:10.1038/ng1884

Reynolds, A. D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H. E., and Mosley, R. L. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J Leukoc Biol*, 82(5), 1083-1094. doi:10.1189/jlb.0507296

Reynolds, A. D., Stone, D. K., Hutter, J. A., Benner, E. J., Mosley, R. L., and Gendelman, H. E. (2010). Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J Immunol*, 184(5), 2261-2271. doi:10.4049/jimmunol.0901852

Reynolds, A. D., Stone, D. K., Mosley, R. L., and Gendelman, H. E. (2009). Proteomic studies of nitrated alpha-synuclein microglia regulation by CD4+CD25+ T cells. *J Proteome Res*, 8(7), 3497-3511. doi:10.1021/pr9001614

Ritz, B., Ascherio, A., Checkoway, H., Marder, K. S., Nelson, L. M., Rocca, W. A., . . . Gorell, J. (2007). Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol*, 64(7), 990-997. doi:10.1001/archneur.64.7.990

Ritz, B., Lee, P. C., Lassen, C. F., and Arah, O. A. (2014). Parkinson disease and smoking revisited: ease of quitting is an early sign of the disease. *Neurology*, 83(16), 1396-1402. doi:10.1212/WNL.0000000000000879

Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., . . . White, L. R. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, 283(20), 2674-2679. doi:10.1001/jama.283.20.2674

Roy, A., Ghosh, A., Jana, A., Liu, X., Brahmachari, S., Gendelman, H. E., and Pahan, K. (2012). Sodium phenylbutyrate controls neuroinflammatory and antioxidant activities and protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. *PLoS One*, 7(6), e38113. doi:10.1371/journal.pone.0038113

Saiki, M., Baker, A., Williams-Gray, C. H., Foltynie, T., Goodman, R. S., Taylor, C. J., . . . Goris, A. (2010). Association of the human leucocyte antigen region with susceptibility to Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(8), 890-891. doi:10.1136/jnnp.2008.162883

Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., . . . Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41(12), 1303-1307. doi:10.1038/ng.485

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., . . . Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*, 30(3), 350-358. doi:10.1002/mds.26069

Schneider, J. S., Aras, R., Williams, C. K., Koprach, J. B., Brotchie, J. M., and Singh, V. (2019). GM1 Ganglioside Modifies alpha-Synuclein Toxicity and is Neuroprotective in

a Rat alpha-Synuclein Model of Parkinson's Disease. *Sci Rep*, 9(1), 8362. doi:10.1038/s41598-019-42847-x

Schulte, C., and Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet*, 4, 67-80. doi:10.2147/TACG.S11639

Siddiqui, A., Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rajagopalan, S., Hanson, I., Rane, A., . . . Andersen, J. K. (2012). Selective binding of nuclear alpha-synuclein to the PGC1alpha promoter under conditions of oxidative stress may contribute to losses in mitochondrial function: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 53(4), 993-1003. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.024

Sidransky, E., and Lopez, G. (2012). The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol*, 11(11), 986-998. doi:10.1016/S1474-4422(12)70190-4

Simoès-Pires, C., Zwick, V., Nurisso, A., Schenker, E., Carrupt, P. A., and Cuendet, M. (2013). HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Mol Neurodegener*, 8, 7. doi:10.1186/1750-1326-8-7

Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., . . . Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41(12), 1308-1312. doi:10.1038/ng.487

Simon-Sanchez, J., van Hilten, J. J., van de Warrenburg, B., Post, B., Berendse, H. W., Arepalli, S., . . . Heutink, P. (2011). Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. *Eur J Hum Genet*, 19(6), 655-661. doi:10.1038/ejhg.2010.254

Song, C., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Sun, F., and Kanthasamy, A. G. (2010). Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol*, 77(4), 621-632. doi:10.1124/mol.109.062174

Song, C., Kanthasamy, A., Jin, H., Anantharam, V., and Kanthasamy, A. G. (2011). Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology*, 32(5), 586-595. doi:10.1016/j.neuro.2011.05.018

Srinivasan, R., Henley, B. M., Henderson, B. J., Indersmitten, T., Cohen, B. N., Kim, C. H., . . . Lester, H. A. (2016). Smoking-Relevant Nicotine Concentration Attenuates the Unfolded Protein Response in Dopaminergic Neurons. *J Neurosci*, 36(1), 65-79. doi:10.1523/JNEUROSCI.2126-15.2016

St Laurent, R., O'Brien, L. M., and Ahmad, S. T. (2013). Sodium butyrate improves locomotor impairment and early mortality in a rotenone-induced *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 246, 382-390. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.037

Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M., and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare

lymphocyte syndrome). *Cell*, 75(1), 135-146. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402893>

Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., . . . Kruger, R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 14(15), 2099-2111. doi:10.1093/hmg/ddi215

Su, X., and Federoff, H. J. (2014). Immune responses in Parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems. *Biomed Res Int*, 2014, 275178. doi:10.1155/2014/275178

Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., and Federoff, H. J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 29(11), 1690-1701. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006

Subramaniam, S. R., and Federoff, H. J. (2017). Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fnagi.2017.00176

Sulzer, D., Alcalay, R. N., Garretti, F., Cote, L., Kanter, E., Agin-Lieb, J., . . . Sette, A. (2017). T cells from patients with Parkinson's disease recognize alpha-synuclein peptides. *Nature*, 546(7660), 656-661. doi:10.1038/nature22815

Tan, L. C., Venketasubramanian, N., Hong, C. Y., Sahadevan, S., Chin, J. J., Krishnamoorthy, E. S., . . . Saw, S. M. (2004). Prevalence of Parkinson disease in Singapore: Chinese vs Malays vs Indians. *Neurology*, 62(11), 1999-2004. doi:10.1212/01.wnl.0000128090.79756.10

Tang, K. C., Trzaska, K. A., Smirnov, S. V., Kottenko, S. V., Schwander, S. K., Ellner, J. J., and Rameshwar, P. (2008). Down-Regulation of MHC II in Mesenchymal Stem Cells at High IFN- γ Can Be Partly Explained by Cytoplasmic Retention of CIITA. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1826-1833. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1826

Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., . . . Langston, J. W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, 119(6), 866-872. doi:10.1289/ehp.1002839

Thome, A. D., Harms, A. S., Volpicelli-Daley, L. A., and Standaert, D. G. (2016). microRNA-155 Regulates Alpha-Synuclein-Induced Inflammatory Responses in Models of Parkinson Disease. *J Neurosci*, 36(8), 2383-2390. doi:10.1523/JNEUROSCI.3900-15.2016

Tysnes, O. B., and Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 124(8), 901-905. doi:10.1007/s00702-017-1686-y

Valente, E. M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A. E., Caputo, V., . . . Bentivoglio, A. R. (2004). PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*, 56(3), 336-341. doi:10.1002/ana.20256

Van Den Berge, N., Ferreira, N., Gram, H., Mikkelsen, T. W., Alstrup, A. K. O., Casadei, N., . . . Borghammer, P. (2019). Evidence for bidirectional and trans-synaptic

parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol*, 138(4), 535-550. doi:10.1007/s00401-019-02040-w

Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., and Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 157(11), 1015-1022. doi:10.1093/aje/kwg068

Van Maele-Fabry, G., Hoet, P., Vilain, F., and Lison, D. (2012). Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Int*, 46, 30-43. doi:10.1016/j.envint.2012.05.004

Vilarino-Guell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., . . . Farrer, M. J. (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 23(7), 1794-1801. doi:10.1093/hmg/ddt570

Villagra, A., Cheng, F., Wang, H. W., Suarez, I., Glozak, M., Maurin, M., . . . Sotomayor, E. M. (2009). The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol*, 10(1), 92-100. doi:10.1038/ni.1673

Wang, S., Chu, C. H., Stewart, T., Gingham, C., Wang, Y., Nie, H., . . . Zhang, J. (2015). alpha-Synuclein, a chemoattractant, directs microglial migration via H2O2-dependent Lyn phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(15), E1926-1935. doi:10.1073/pnas.1417883112

Wider, C., Skipper, L., Solida, A., Brown, L., Farrer, M., Dickson, D., . . . Vingerhoets, F. J. (2008). Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family. *Parkinsonism Relat Disord*, 14(6), 465-470. doi:10.1016/j.parkreldis.2007.11.013

Williams, G. P., Schonhoff, A. M., Jurkuvenaite, A., Thome, A. D., Standaert, D. G., and Harms, A. S. (2018). Targeting of the class II transactivator attenuates inflammation and neurodegeneration in an alpha-synuclein model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 15(1), 244. doi:10.1186/s12974-018-1286-2

Winkler, A. S., Tutuncu, E., Trendafilova, A., Meindl, M., Kaaya, J., Schmutzhard, E., and Kassubek, J. (2010). Parkinsonism in a population of northern Tanzania: a community-based door-to-door study in combination with a prospective hospital-based evaluation. *J Neurol*, 257(5), 799-805. doi:10.1007/s00415-009-5420-z

Wojtera, M., Sobow, T., Kloszewska, I., Liberski, P. P., Brown, D. R., and Sikorska, B. (2012). Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature. *Folia Neuropathol*, 50(1), 74-84. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505366>

Wright, K. L., and Ting, J. P. (2006). Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes. *Trends Immunol*, 27(9), 405-412. doi:10.1016/j.it.2006.07.007

Xu, K., Xu, Y., Brown-Jermyn, D., Chen, J. F., Ascherio, A., Dluzen, D. E., and Schwarzschild, M. A. (2006). Estrogen prevents neuroprotection by caffeine in the

mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 26(2), 535-541. doi:10.1523/JNEUROSCI.3008-05.2006

Yakhine-Diop, S. M. S., Martinez-Chacon, G., Uribe-Carretero, E., Niso-Santano, M., Gonzalez-Polo, R. A., and Fuentes, J. M. (2019). The paradigm of protein acetylation in Parkinson's disease. *Neural Regen Res*, 14(6), 975-976. doi:10.4103/1673-5374.250575

Yamada, T., McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (1992). Lewy bodies in Parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol*, 84(1), 100-104. doi:10.1007/BF00427222

Zhang, Z. X., Dong, Z. H., and Roman, G. C. (2006). Early descriptions of Parkinson disease in ancient China. *Arch Neurol*, 63(5), 782-784. doi:10.1001/archneur.63.5.782

Zhang, Z. X., Roman, G. C., Hong, Z., Wu, C. B., Qu, Q. M., Huang, J. B., . . . Zahner, G. E. (2005). Parkinson's disease in China: prevalence in Beijing, Xian, and Shanghai. *Lancet*, 365(9459), 595-597. doi:10.1016/S0140-6736(05)17909-4

Zhao, M., Flynt, F. L., Hong, M., Chen, H., Gilbert, C. A., Briley, N. T., . . . Piskurich, J. F. (2007). MHC class II transactivator (CIITA) expression is upregulated in multiple myeloma cells by IFN-gamma. *Mol Immunol*, 44(11), 2923-2932. doi:10.1016/j.molimm.2007.01.009

Zhou, W., Bercury, K., Cumiskey, J., Luong, N., Lebin, J., and Freed, C. R. (2011). Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. *J Biol Chem*, 286(17), 14941-14951. doi:10.1074/jbc.M110.211029

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., . . . Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44(4), 601-607. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.005

1.5- SS BİLGE, C GÜNAYDIN, ME ÖNGER, A BOZKURT, B AVCI. Neuroprotective action of agmatine in rotenone-induced model of Parkinson's disease: Role of BDNF/cREB and ERK pathway. *Behav Brain Res.*2020 Aug 17;392:112692. 10.1016/j.bbr.2020.112692.

1.6- ZB ÇELİK, FN CANKARA, C GÜNAYDIN. Alterations in the matrix metalloproteinase-3 promoter methylation after common chemotherapeutics: in vitro study of paclitaxel, cisplatin and methotrexate in the MCF-7 and SH-SY5Y cell lines. *Mol Biol Rep.*2020 Nov 2. 10.1007/s11033-020-05955-w

1.7- FN CANKARA, C GÜNAYDIN, SS BİLGE, Ö ÖZMEN, A KORTHOLT. The neuroprotective action of lenalidomide on rotenone model of Parkinson's Disease: Neurotrophic and supportive actions in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Lett.*2020 Nov 1;738:135308. 10.1016/j.neulet.2020.135308.

1.8- DY KEHRİBAR, M CİHANGİROĞLU, E SEHMEN, B AVCI, M ÇAPRAZ, M BORAN, C GÜNAYDIN, M ÖZGEN. The assessment of the serum levels of TWEAK and prostaglandin F₂ α in COVID – 19. *Turk J Med Sci.*2020 Sep 27. 10.3906/sag-2006-96.

1.9- FN CANKARA, C GÜNAYDIN, ZB ÇELİK, Y ŞAHİN, Ş PEKGÖZ, Y ERZURUMLU & K GÜLLE. Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin-induced hippocampal neurotoxicity. *Metab Brain Dis.* 2020. 10.1007/s11011-020-00634-y.

1.10 B AVCI, C GÜNAYDIN, T GÜVENÇ, CK YAVUZ, N KURUCA, SS BİLGE. Idebenone ameliorates rotenone-induced Parkinson's disease in rats through decreasing lipid peroxidation. *Neurochem Res.* 2020 Nov 28. doi: 10.1007/s11064-020-03186-w.

1.11 DY KEHRİBAR, M CİHANGİROĞLU, E SEHMEN, B AVCI, A CAPRAZ, AY BİLGİN, C GÜNAYDIN, M ÖZGEN. The Receptor for Advanced Glycation End Product (RAGE) Pathway in COVID-19. *Biomarkers.* 2020 Dec 7. doi: 10.1080/1354750X.2020.1861099.

1.12 C GÜNAYDIN, ZB ÇELİK, SS BİLGE, B AVCI, N KARA. SAHA attenuates rotenone-induced toxicity in primary microglia and HT-22 cells. *Toxicol Ind Health.* 2020 Dec 10;748233720979278. doi: 10.1177/0748233720979278.

1.13 FN CANKARA, ZB ÇELİK, C GÜNAYDIN. Cannabinoid receptors modulate LPS-induced increase of class-II transactivator expression levels in a microglial cell line. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 2021 Jan, doi: 10.1080/10799893.2020.1868510.

1.14 FN CANKARA, ZB ÇELİK, C GÜNAYDIN. Cannabinoid receptor-1 has an effect on CD200 under rotenone and alpha-synuclein induced stress. Neuroscience letters. 2021 April, doi: 10.1016/j.neulet.2021.135908.

2- SCI dışı indekslerde (AHCI, ESCI) taranan ulusal yayımlar

2.1 C GÜNAYDIN AND SS BİLGE. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs at the molecular level. Eurasian J Med.2018 Jun; 50(2): 116–121. 10.5152/eurasianjmed.2018.0010.

2.2 M HALLAK, H BALCI, C GÜNAYDIN AND SS BİLGE. The role of muscarinic and serotonergic-2A receptors in the antinociceptive effect of pregabalin, Physiology and pharmacology.2019, 24765236, 4, 23, 302-308.

3- TR indekslerde taranan ulusal yayımlar

3.1 FN CANKARA, Ö ÖZMEN, HB SAVAŞ, Y ŞAHİN, C GÜNAYDIN. Acta Medica Alanya.2020 4(3): 278 – 284. 10.30565/medalanya.797406.

3.2 ZB CELİK, C GÜNAYDIN, AK CENGİZ, Ş TURAL. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.2020 40(4) 10.5336/medsci.2020-74849.

B. Bildiriler

1- Uluslararası Bildiriler

B.1.1 C. GÜNAYDIN, S. S. BILGE, M. E. ÖNGER, A. BOZKURT & B. AVCI, Sıçanlarda Rotenon ile İndüklenen Parkinson Modelinde Agmatinin Olası Etki Mekanizması, Poster Sunumu, 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ekim 2019, 04 Kasım 2019.

B.1.2 C. GÜNAYDIN, G. ARSLAN & S. S. BILGE, Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Tutuşma Modelinde Trans-Sinamaldehitin Etkilerinin Araştırılması, Poster Sunumu, 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ekim 2019, 03 Kasım 2019.

B.1.3 C. GÜNAYDIN & S. S. BILGE, Role of NMDA-2B receptor subtype in the proconvulsant effect of cinnamaldehyde in rats, Poster Sunumu, FENS Regional Meeting, 10 Temmuz 2019, 13 Temmuz 2019.

B.1.4 C. GÜNAYDIN, A. BOZKURT, B. AVCI, M. E. ÖNGER, H. BALCI & S. S. BILGE, Effects Of Agomelatine In Rotenone-induced Parkinson's Disease Model In Rats. Sözlü Sunum, 7th World Congress Of Oxidative Stress, Calcium Signaling And Trp Channels, 20 Nisan 2018, 23 Nisan 2018.

B.1.5 Y. ÖZTÜRK, C. GÜNAYDIN, F. YALÇIN, M. NAZIROGLU & N. BRAIDY, Paclitaxel Induces Trpm2 Channel Activation, Oxidative Stress And

Cell Death In Dbtrg Glioblastoma Cells, Poster Sunumu, 7th World Congress Of Oxidative Stress, Calcium Signaling And Trp Channels, 20 Nisan 2018, 23 Nisan 2018.

B.1.6 C GÜNAYDİN, ME ONGER, B AVCI, A BOZKURT, NF CANKARA, SS BİLGE. Investigation of the effect of Agmatine in Rotenone induced Parkinson's Disease Model in Rats. Proceedings for Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Poster Sunumu, 2018, WCP2018 (PO4-1-135). 2020 10.1254/jpssuppl.WCP2018.0_PO4-1-135.

B.1.7 N ÇİÇEKLİ, C GÜNAYDIN, Ç ÇİÇEKLİ. Does Covid-19 Cause Neurodegeneration. 5th International Medicine and Health Sciences Researches Congress (Virtual). 12-13 December, Ankara.

B.1.8 N ÇİÇEKLİ, C GÜNAYDIN, Ç ÇİÇEKLİ. Medical Leech Therapy and Its Use in Various Pain Syndromes. 5th International Medicine and Health Sciences Research Congress (Virtual). 12-13 December, Ankara.

2- Ulusal Bildiriler

B.2.1 H. BALCI, B. AKYÜZ, Ö. DARAKCI SALTİK, D. GÜNDOĞDU ARSLAN, C. GÜNAYDIN & C. AKINÖZEL, Kolorektal Distansiyon İle İndüklenen Deneysel Viseral Ağrı Modelinde Nikotinin Analjezik Etkisinin Araştırılması, Poster Sunumu, 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17 Ekim 2017, 20 Ekim 2017.

B.2.2 M. HALLAK, H. BALCI, C. GÜNAYDIN & S. S. BILGE, Pregabalin'in Deneysel Hotplate Ve Tail-flick Testleri İle Oluşturulan Somatik Ağrı Modelindeki Antinosiseptif Etkisinde Kolinerjik Ve Serotonerjik Sistemin Rolü, Poster Sunumu, 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17 Ekim 2017, 20 Ekim 2017.

B.2.3 C. GÜNAYDIN & S. S. BILGE, Pentetilentetrazol ile İndüklenen Tutuşma Modelinde Aprepitantın Etkisi, Poster Sunumu, 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 04 Kasım 2019, 07 Kasım 2019.

B.2.4 C. GÜNAYDIN & S. S. BILGE, Curcumin'in Pentetilentetrazol ile İndüklenen Tutuşma Modelindeki Etkisinde Sirtuin'lerin Rolü, Poster Sunumu, 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 04 Kasım 2019, 07 Kasım 2019.

C. Projeler

C.1 BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ, ARAŞTIRMACI, Alfa-sinüklein ile indüklenen in vitro Parkinson modelinde histon asetilasyonunun mikrogliyal antijen sunumu üzerine olan etkisinin araştırılması, Yürütülen Kuruluş: OMÜ TIBBİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) Bütçe: 17,800 (01.01.2020-01.01.2021).

C.2 BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ, ARAŞTIRMACI, Farklı deneysel Multiple Skleroz (Allerjik ensefalopati) modellerinde JAK/STAT yolak inhibitörlerinin etkilerinin araştırılması, Yürütülen Kuruluş: OMÜ TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) Bütçe: 48,000 (01.07.2019-01.02.2021).

C.3 BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ, ARAŞTIRMACI, Sıçanlarda Rotenon ile İndüklenen Parkinson Hastalığı Modelinde Agomelatinin Etkisi, Yürütülen Kuruluş: OMÜ TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ, Bütçesi: 4,800 (01 Ekim 2018, 01 Haziran 2019).

C.4 KURUMSAL, BURSIYER, Rotenon İle İndüklenen Deneysel Parkinson Modelinde Agmatin'in Etkisinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: OMÜ TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK. Bütçesi: 58,000 (01 Aralık 2018, 01 Nisan 2020).

D. Kitaplar

D.1 S. S. BILGE & C. GÜNAYDIN, Yoğun Bakım Farmakolojisi / Bölüm 5 / Toksikoloji, A. H. SAHINOGLU [Editörler], Yoğun Bakım Sorunlar ve Tedavileri (1861-1864), ISBN: 9789752778054, TÜRKİYE: Güneş Tıp Kitapevleri, 18 Mart 2020, Kitapta Bölüm.

E. Katıldığı Kurslar ve Sertifika Programları:

- 13. Sinir Bilimleri Kongresi / Konya – Western blot ve jel elektrofezi Kursu (30 Nisan- 3 Mayıs 2015)
- 14. Sinir Bilimleri Kongresi / Ankara – Stereotaksi ve Beyin Doku izolasyonu Kursu (26-29 Mayıs 2016)
- Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Kursu – Biruni Üniversitesi, İstanbul (11-12 Mayıs 2015)
- 2. Uluslararası Beyin Araştırmaları Okulu – Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta (6-12 Kasım 2017)
- Hücre Kültürü Uygulamaları Okulu – Daytam, Erzurum (25-29 Nisan 2018)
- 17. Sinir Bilimleri Kongresi / Trabzon – Uyku Hastalıkları, EEG ile Bilişsel Becerinin İlişkisi, MATLAB uygulamaları, Trabzon (4-7 Nisan 2019)

- Deney hayvanları kullanımı kursu (08.02.2019)

F. Teknik Beceriler

- İn-vitro Yöntemler (Organ Banyosu–Hücre Kültürü), Jel Elektroforezi / Western Blot, Spektrofotometrik Biyokimyasal Yöntemler (ELISA), Kromatografik Analiz (GC-MS, HPLC), Görüntüleme Yöntemleri (İmmünohistokimya ve floresans analiz) İstatistiksel Analiz, Deneysel Hayvan Modelleri, Stereotaksik Cerrahi, Deney Hayvanlarında EEG-EMG Kayıt ve Analizleri

G. Üyesi Olunan Dernekler:

- 1- Türk Farmakoloji Derneği (TFD 2017-)
- 2- Samsun Eczacı Odası (SEA 2013-)
- 3- Türkiye Beyin Araştırmaları Derneği (TÜBAS 2018-)
- 4- Federation of European Neuroscience Societies (FENS 2018-)