



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MPP⁺ (1-METİL-4-FENİLPRİDİNYUM) İLE MUAMELE
SONUCU FARE NÖROBLASTOMA (N2A)
HÜCRESİNDE OLUŞACAK EKŞİTOTOKSİSİTE
DURUMUNUN VE GLT-1 SEVİYELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

CEYLAN AK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN

AYDIN-2020

2020

YÜKSEK LİSANS

TIBBİ BİYOLOJİ

Ceylan AK

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MPP⁺ (1-METİL-4-FENİLPRİDİNYUM) İLE MUAMELE
SONUCU FARE NÖROBLASTOMA (N2A) HÜCRESİNDE
OLUŞACAK EKŞİTOTOKSİSİTE DURUMUNUN VE GLT-1
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEYLAN AK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Gizem Dönmez Yalçın

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18021 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ceylan AK tarafından hazırlanan “MPP⁺ (1-metil-4-fenilpridinyum) ile muamele sonucu fare nöroblastoma (N2A) hücresinde oluşacak eksitotoksosite durumunun ve GLT-1 seviyelerinin araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/01/2020

Ünvan	Adı Soyadı	Kurum	İmza
Doç. Dr.	Gizem Dönmez YALÇIN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Dr. Öğr. Ü.	Ayşegül YILDIZ	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	
Dr. Öğr. Ü.	Özlem Bozkurt GİRİT	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit Kum

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana değerli bilgi ve tecrübelerini aktardığı, bunun yanında manevi desteğini üzerimden hiç eksik etmediği ve hiçbir zaman da etmeyeceğini bildiğim, beni her zaman sevip güven duyan ve bana da içtenlikle güven sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Gizem Dönmez YALÇIN'a gönülden teşekkür ederim.

Aynı şekilde yüksek lisans eğitimim süresince her zaman engin bilgilerini, tecrübelerini bizlere sakınmadan ileten, her konuda destek ve örnek olan, birçok konuda yanımda bulunan bölüm hocalarımdan Doç. Dr. Mehtap Kılıç EREN'e ve Doç. Dr. Abdullah YALÇIN'a teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarımı yürütmem için laboratuvar ve araç gereçlerinden yararlandığım Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi'ne ve bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Özge ÇEVİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu yolculukla birlikte tanıdığım, hayatıma değer katan, çalışmalarım boyunca ve yaşamımda da her zaman yanımda olan, bana her konuda destek sağlayan kıymetli arkadaşlarım Ar. Gör. Burçin İrem ABAS ve Hatice PİLEVNELİ'ye, ayrıca bu süreçte birlikte bulunduğum arkadaşlarımdan Anı Altuğ CURNA'ya, çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz Merve ÇOLAK, Rabia UYARICI ve Alime SARI'ya teşekkür ederim.

Uzakta olsalarda hep yanımda hissettiğim, manevi desteklerini benden esirgemeyen, her daim arkamda olan, lisans eğitimim boyunca birlikte bir hayat paylaştığım değerli dostlarım Mihrap MASAT ve Seda KURTULMUŞ'a teşekkür ederim.

Dünümde, bugünümde ve yarınımda her zaman yanımda, yakınımda olan beni yaşamım boyunca destekleyen, sevgi ve şevkatlerini her zaman hissettiğim varlıklarına şükrettiğim ve iyi ki benim ailem dediğim canım annem Tunay AK ve canım babam Atilla AK'a, hayattaki en kıymetli varlığım olan, her zaman dayanağım olacağını bildiğim, canımdan çok sevdiğim kardeşim Mustafa Furkan AK'a teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Parkinson Hastalığının Tarihiçesi ve Epidemiyolojisi	3
2.2. Hastalığa Etkisi Olan Faktörler ve Hastalığın Etiyolojisi	4
2.3. Parkinson Hastalığının Patolojik Özellikleri	5
2.3.1 α -Sinüklein ve Lewy Cisimcikleri.....	5
2.4 Moleküler Mekanizmalar	8
2.4.1 Mitokondriyal Disfonksiyon	8
2.4.2. Lizozomal Disfonksiyon	8
2.4.3 Oksidatif Stres ve Nitrik Oksit	9
2.4.4. Protein Yanlış Katlanması ve Birikimi.....	10
2.4.5 Apoptoz ve Nekroz.....	13
2.5 Eksitotoksisite.....	13

2.5.1 Glutamat Taşıyıcıları	15
2.5.1.1. Veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT)	16
2.5.1.2 Eksitator (uyarıcı) amino asit taşıyıcıları (EAAT)	16
2.5.1.2.1 GLT-1 (EAAT 2).....	17
2.5.2. Glutamat Reseptörleri.....	18
2.5.2.1. İyonotropik glutamat reseptörleri	18
2.5.2.2. Metabotropik glutamat reseptörleri (G-protein bağlı reseptörler).....	19
2.5.3 Glutamat-glutamin döngüsü (Glutamat homeostazı)	21
2.5.4 Glutamat Alımı	22
2.5.5 Eksitotoksisitede Ca ⁺² İyonlarının Rolü	22
2.6. Parkinson'a Yol Açan Faktörler	23
2.6.1. Genetik Faktörler	23
2.6.2. Çevresel Faktörler.....	23
2.6.2.1. 6-OHDA	24
2.6.2.2 Paraquate ve Rotenone	24
2.6.2.3 MPTP ve MPP ⁺	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması	27
3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	27
3.1.2. Deney Düzeninin Hazırlanması	30
3.1.2.1. Hücre kültürü.....	30
3.1.2.1.1. Hücrelerin çözülmesi	30
3.1.2.1.2 Hücrelerin pasajlanması	31

3.1.2.1.3 Hücrelerin sayımı	31
3.1.2.1.4 Hücrelerin dondurulması	32
3.1.2.2. Hücre hatlarının konsantre edilmiş MPP ⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium)'nin uygun dozları ile muamelesi.....	32
3.1.2.3 MTT testi	34
3.1.2.4 RİPA ile protein izolasyonu metodu	35
3.1.2.5 Protein Miktar Tayini için Bradford Tahlili	36
3.1.2.6 Western blot.....	38
3.1.2.6.1. Yükleme ve yürütme (Jel Elektroforezi)	38
3.1.2.6.2. Jelden membrana transfer	39
3.1.2.6.3. Bloklama ve antikor uygulaması	40
3.1.2.6.4. Yıkama (Wash) aşamaları	40
3.1.2.6.5 Bloklama ve ikincil antikor uygulaması	40
3.1.2.6.6. Stripping uygulaması (uzaklaştırma tamponu uygulaması)	41
3.1.2.6.7. Western blot için tampon çözeltiler (buffer)	41
3.1.2.7. RNA izolasyonu	42
3.1.2.8. cDNA Sentezi	43
3.1.2.9. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR-Kantitatif PCR)	43
3.1.2.10. Glutamat assay.....	45
3.2. İstatistik	48
4. BULGULAR	49
4.1. MTT Testi Ölçüm Sonuçları ve Değerlendirilmesi	49
4.2. Western Blot Çalışma Sonuçları ve Değerlendirilmesi	51

4.2.1 Bradford Tahlihi Ölçüm Sonuçları, Grafikleri ve Değerlendirmeleri	51
4.2.2. Western Blot Çalışması İle Hücre Hatlarındaki GLT-1 Proteininin belirlenmesi.....	52
4.2.3. Western Blot Çalışmasının Ardından Elde Edilen Bantların Kuantifikasyonu.....	53
4.3. Real Time (Gerçek Zamanlı) veya QPCR (Kantitatif PCR) Sonuçları	57
4.4. Glutamate Assay Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	60
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AH	: Alzheimer hastalığı
ALS	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
AMPA	: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
DA	: Dopamine
DAT	: Dopamine Active Transporter
DJ-1	: Protein Deglycase
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ER	: Endoplazmik Retikulum
ETC	: Electron Transport Complex
GLAST	: Glutamate/aspartate transporter
GLT-1 (EAAT 2)	: Glutamate transporter 1 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcısı 2)
GluT	: Glutamate transporter
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
İGluRs	: İyonotropik Glutamat Reseptörleri
LB	: Lewy Body
LRRK2	: Leucine-Rich Repeat Kinase 2
LSD	: Lizozomal Depolama Bozukluğu
MAO-B	: Monoamin Oksidaz-B

MGlurRs	: Metabotropik Glutamat Reseptörleri
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MPDP	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridyuma
MPP⁺	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTT	: 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADH	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit Hidrojen
NAD⁺	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NMDA	: N-methyl-D-aspartic acid
O²⁻	: Süperoksit Anyon
OH	: Hidroksi Radikal
PH	: Parkinson hastalığı
PINK1	: PTEN-induced kinase 1
ROS	: Reactive Oxygen Species
SNPc	: Substansiya Nigra pars Kompakta
SNCA	: α -sinüklein
UCHL-1	: Ubiquitin Carboksil-terminal Hidrolaz -1
UPS	: Ubiquitin-Proteasome Sistemi
Ub	: Ubiquitin
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. PH'da sinüklein agregasyonunun olası sebepleri ve sonuçları.....	7
Şekil 2. PH'na katkısı bulunan patolojik yolların dizisi.....	10
Şekil 3. Nöronlardaki protein metabolizması.....	12
Şekil 4. Glutamat taşıyıcılarının nöronlar ve glial hücreler üzerindeki lokalizasyonunu gösteren bir glutamaterjik sinaps gösterimi.....	15
Şekil 5. Nöronlarda ve astrositlerde Eksitator amino asit taşıyıcılarının (EAAT) ekspresyonu ve aktiviteleri.....	17
Şekil 6. Glutamat reseptörleri.....	21
Şekil 7. MPTP'nin MPP ⁺ ya kimyasal dönüşümü.....	25
Şekil 8. MPTP Metabolizmasının Şematik Gösterimi.....	26
Şekil 9. Bradford Assay çalışması için referans alınan standart veri grafiği.....	38
Şekil 10. Western blot blotlama sandiviçi.....	39
Şekil 11. Glutamate-Glo™ Assay prensibinin şematik diyagramı.....	46
Şekil 12. N2a hücreleri üzerinde MPP ⁺ uygulamasının hücre canlılığına olan etkisi.....	49
Şekil 13. IHA hücreleri üzerinde MPP ⁺ uygulamasının hücre canlılığına olan etkisi.....	50
Şekil 14. N2a hücrelerinin bradford tahlilindeki standart veri grafiği.....	51
Şekil 15. IHA hücrelerinin bradford tahlilindeki standart veri grafiği.....	52
Şekil 16. Kontrol ve MPP ⁺ ile muamele edilmiş IHA hücre hattında GLT-1 ifadesi ve kuantifikasyonu.....	53
Şekil 17. IHA hücre hattında western blot ile elde edilen GLT-1 bantlarının Image J programı ile belirlenmesi.....	54
Şekil 18. Şekil 16'da belirtilen bantlar için tepe (peak) grafikleri.....	55
Şekil 19. IHA hücre hattında western blot ile elde edilen Tubulin bantlarının Image J programı ile belirlenmesi.....	56
Şekil 20. Şekil 18'de belirtilen bantlar için tepe (peak) grafikleri.....	57
Şekil 21. N2a hücre hattı için kontrol (C) ve MPP ⁺ uygulanmış gruplarda GLT-1 mRNA oranları karşılaştırılması.....	59

- Şekil 22.** N2A hücre hattına MPP⁺ muamelesinin ardından yapılan glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi61
- Şekil 23.** IHA hücre hattına MPP⁺ muamelesinin ardından yapılan glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi.62



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Deney yapımı aşamalarında kullanılan laboratuvar araç gereçleri.....	27
Tablo 2. Deney yapımı için gerekli olan sarf malzemeler ve çalışma materyalleri.....	29
Tablo 3. N2A için MPP ⁺ ara stok dozları ve hücreye eklenme miktarı.....	33
Tablo 4. IHA için MPP ⁺ ara stok dozları ve hücreye eklenme miktarı	33
Tablo 5. Abcam (ab102535) Protein Quantitation Kit standart hazırlama tablosu	37
Tablo 6. Glutamat ölçümü için reaktif solüsyonunun hazırlığı	47
Tablo 7. GLT-1 ve Tubulin protein bantlarına karşılık olan kuantifikasyon değerleri	53
Tablo 8. N2a hücrelerine uygulanan qPCR çalışması sonucu örneklerin C _T (eşik) ve rölatif mRNA miktarı ölçüm değerleri	58

ÖZET

MPP⁺ (1-METİL-4-FENİLPRİDİNYUM) İLE MUAMELE SONUCU FARE NÖROBLASTOMA (N2A) HÜCRESİNDE OLUŞACAK EKŞİTOTOKSİSİTE DURUMUNUN VE GLT-1 SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

AK C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020

Parkinson hastalığı, lewy nöritleri ve lewy cisimleri olarak ifade edilen α -sinükleinin intranöronal agregatlarının birikimleri ile substansiya nigra'daki dopamin üreten hücrelerin kaybından ve böylece dopaminerjik nöronların dejenerasyonundan kaynaklanan bir fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır.

Eksitotoksosite nörodejenerasyonun ortak moleküler mekanizmalarından biridir. Glutamat eksitotoksitesi, presinaptik sinir terminallerinden ve astrositlerden intraselüler alana aşırı glutamat salınımının tetiklenmesiyle ve glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasıyla oluşur. Glutamat taşıyıcıları biriken fazla glutamata toplayarak glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonunu önler. Özellikle GLT-1 (Glutamate Transporter-1) ya da EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter2) beyindeki toplam glutamate emiliminin %95'inden sorumludur.

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), Parkinson hastalığı için önemli bir kimyasal model ve sık kullanılan etkili bir toksindir. Elektron transport zincirindeki Kompleks 1'i inhibe ederek mitokondriyal fonksiyona zarar verir. Bu çalışmada MPTP'nin aktif metaboliti MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium) kullanılarak, nöron ve glia hücrelerinde eksitotoksosite modeli oluşturuldu ve MPP⁺'nin GLT-1 ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. N2A (fare nöroblastoma hücreleri) ve glia (IHA-immortalized human astrocytes-immortalize olmuş insan astrositleri) MPP⁺ ile muamele edildikten sonra, hücrelerin canlılık oranları, glutamat salınım oranları ve GLT-1'in mRNA ve protein düzeylerindeki değişiklikleri araştırıldı.

MPP⁺ muamelesinden sonra IHA hücrelerinden total protein izole edildi, GLT-1 ekspresyonu western blot yöntemi ile incelendi ve MPP⁺ verilen hücrede kontrole oranla anlamlı artış görüldü. MPP⁺ muamelesi yapılan ve yapılmayan (kontrol) N2A hücre hattından total RNA izole edilerek cDNA üretildi ve Real Time PCR (Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile GLT-1 mRNA düzeyi ölçüldü. IHA hücrelerinde alınan

sonuç ile uyumlu olarak, MPP⁺ muamelesi yapılan N2A hücrelerinde GLT-1 mRNA seviyesinin kontrol hücrelerine göre anlamlı artışı görüldü. Glutamat salınımı glutamat assay ile ölçüldü.

Sonuç olarak, MPP⁺ ile oluşturulan eksitotoksik durum karşısında, GLT-1 ekspresyonunun bir kurtarıcı mekanizma olarak arttığı gözlemlendi. Bu nedenle, ilk 12 saatlik dönemde glutamat salınımının azaldığı ancak nörotoksisitenin etkisi devam ettikçe glutamat salınımının artmaya devam ettiği görüldü. Glutamat salınımının azalmasının nedeni aynı zamanda hücre ölümü gerçekleştiği için olabileceği düşünüldü. GLT-1 ekspresyonunun düzenli artırılması hedef alınarak ilgili moleküler yolların araştırılması, eksitotoksisiteyi azaltarak Parkinson hastalığına karşı tedavi geliştirilmesi yolunda önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Eksitotoksisite, GLT-1, glutamat, lewy cisimciği, MPP⁺, Parkinson

ABSTRACT

EXAMINATION OF EXCITOTOXICITY STATUS AND GLT-1 LEVELS IN MPP⁺ (1-METHYL-4-PHENYLPYRIDINIUM)-TREATED MOUSE NEUROBLASTOMA (N2A) CELLS

**AK C. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine
Faculty Clinical Biology Program Master Thesis, Aydın, 2020**

Parkinson's disease is defined as a dysfunction resulting from the accumulation of intraneuronal aggregates of α -synuclein, expressed as lewy neurites and lewy bodies, with loss of dopamine-producing cells in the substantia nigra and thus degeneration of dopaminergic neurons.

Excitotoxicity is one of the common molecular mechanisms of neurodegeneration. Glutamate excitotoxicity occurs by triggering excessive release of glutamate from presynaptic nerve terminals and astrocytes into the intracellular domain and by overexcitation of glutamate receptors. Glutamate carriers prevent excess activation of glutamate receptors by accumulating excess glutamate. In particular, GLT-1 (Glutamate Transporter-1) or EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter2) is responsible for 95% of total glutamate absorption in the brain.

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) is an important chemical model for Parkinson's disease and a commonly used effective toxin. It interferes with mitochondrial function by inhibiting Complex 1 in the electron transport chain. In this study, MPT⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium), the active metabolite of MPTP, was used to model excitotoxicity in neuron and glia cells and the effect of MPP⁺ on GLT-1 expression was investigated. After N2A (mouse neuroblastoma cells) and glia (IHA-immortalized human astrocytes-immortalized human astrocytes) cells were treated with MPP⁺, the viability of cells, glutamate release and changes in GLT-1's mRNA and protein levels were investigated.

After MPP⁺ treatment, total protein was isolated from IHA cells and GLT-1 protein expression was examined by western blot. It was observed that MPP⁺ treated IHA cells showed a significant increase in GLT-1 expression when compared to control. Total RNA was isolated from MPP⁺ treated and untreated (control) N2A cells, total RNA was isolated and cDNA was produced. GLT-1 mRNA level was measured by Real Time PCR (Real-time Polymerase Chain Reaction). Consistent with the results of IHA cells, a significant increase

in GLT-1 mRNA level was observed in MPP⁺ treated N2A cells compared to control cells. In the end, glutamate release was measured by glutamate assay.

As a result, it was observed that GLT-1 expression increased as a rescue mechanism in response to the excitotoxicity induced by MPP⁺. Therefore, it was observed that glutamate release decreased in the first 12 hours. However, glutamate release continued to increase as the effect of neurotoxicity continued. It was thought that the decrease in glutamate secretion may be due to cell death. It will be important to investigate the relevant molecular pathways with the aim of increasing GLT-1 expression regularly, and to develop treatment against Parkinson's disease by reducing excitotoxicity.

Keywords: Excitotoxicity, GLT-1, glutamate, lewy body, MPP⁺, Parkinson



1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra dünya çapında en çok rastlanan ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığı, başlangıç yaşı 55 olan ilerleyici bir hastalıktır ve görülme sıklığı yaşla birlikte belirgin bir şekilde artmaktadır, genel olarak görülme aralığı 20/100,000 iken 70 yaşındaki görülme aralığı 120/100,000'a kadar çıkar. Hastalığın klinik belirtileri arasında kas sertliği, istirahat tremoru (titreme), bradikinezi (hareketlerde yavaşlama), bozulmuş postural refleksler ve değişken derecelerde otonomik disfonksiyon bulunur. Parkinson hastalığında karakteristik olan patolojik değişiklikler, orta beynin substansiya nigra pars kompakta (SNc) bölümündeki dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu ve lewy cisimcikleri olarak bilinen intrasitoplazmik oluşumları içerir. Parkinson Hastalığı ile ilgili moleküler yollar arasında oksidatif stres, mitokondriyal hasarlar, apoptoz, nekroz, lizozomal disfonksiyonlar, protein yanlış katlanması ve birikimi ve eksitotoksikite bulunur (Dauer ve Przedborski, 2003; Schapira, 2010).

Glutamat hafıza, öğrenme, bilişsel, duyuşsal, endokrin ve diğer iç organlara ait fonksiyonlar gibi birçok işlevi kontrol edebildiği için merkezi sinir sisteminin fizyolojisinde başlıca uyarıcı nörotransmitter olarak önemli rol oynar. Glutamat aracılı iletim, sinaptik plastisite olayları, beynin bağlantılarını düzenleme yada yeni bağlantılar kurma yetisi, gelişim sırasında sinir ağlarının oluşumu ve Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nin onarımı gibi sayısız temel beyin fonksiyonunu sağlar. Eksitotoksikite, merkezi sinir sistemi (MSS)'nde nörotoksikiteye yol açan nedenlerden biridir (Blandini, 2010). Glutamat başta olmak üzere uyarıcı amino asitler tarafından nöronların aşırı uyarılması veya aşırı aktivasyonu, eksitotoksikite denilen patolojik bir süreci oluşturarak nöronal ölüme neden olur. Böylece, önemli bir patolojik mekanizma olarak başta glutamat eksitotoksikitesinin, inme, beyin travması, serebral iskemi ve hatta Amiyotrofik Lateral Skleroz (Turcan ve ark.) , Parkinson hastalığı (DeMaagd ve Philip,) , Alzheimer hastalığı ve Huntington hastalığı gibi nörolojik bozukluklarda rolü olduğu öne sürülmüştür (Ezza ve Khadrawy, 2014; Schapira, 2010).

Eksitotoksikite nöronlar arası sinaptik boşlukta aşırı glutamat birikimi ile oluşur. Fazla glutamatın ortamdaki uzaklaştırılması, eksitotoksikiteyi önleyen ve beyindeki etkili nörotransmisyonu izin vererek düşük hücre dışı glutamat seviyelerini koruyan önemli bir süreçtir (Shih ve ark, 2014). Beyinde, kritik bir şekilde, glutamat için hücre dışı katabolik bir mekanizma olmadığından, sinaptaki fazla glutamatu temizlemek için eksitatör amino asit

taşıyıcıları (EAAT) görev alır. Bu sürece katkısı olan beş adet EAAT vardır: GLAST (EAAT1; slc1a3), GLT-1 (EAAT2; slc1a2), EAAC1 (EAAT3; slc1a1), EAAT4 (slc1a6) ve EAAT5 (slc1a7) (Bjornsen ve ark, 2014). MSS'nde EAAT1 ve EAAT2 genel olarak astrositlerde bulunurken, EAAT3 ve EAAT4 genel olarak nöronlarda bulunur (Lin ve ark, 2012). GLT-1 (EAAT2), beyindeki toplam glutamatin yaklaşık % 95'inin taşınmasından sorumludur ve çoğunlukla astrositlerde bulunur (Bjornsen ve ark, 2014; Shih ve ark, 2014).

Kortekste nörotransmisyonun gerçekleşmesi için nöronlara glutamin taşınması ve kaybolan glutamatin yenilemesi ve eksitotoksitenin engellenmesi gerekir. Dolayısıyla GLT-1 korteks içindeki glutamat homeostazında rol oynar (Bjornsen ve ark, 2014). Glial glutamat taşıyıcı GLT-1 (EAAT2), ortamdaki aşırı glutamatin toplanmasında önemli bir rol oynar ve GLT-1 (EAAT2) ekspresyonunun artmasının nöronal koruma sağladığı da çalışmalarla gösterilmektedir. İşlev bozukluğu veya GLT-1 (EAAT2)'nin azalmış ekspresyonu birçok nörodejeneratif hastalıkta gösterilmiştir (Lin ve ark, 2012).

Nörodejeneratif hastalıkları, özellikle de Parkinson Hastalığı'nı tetikleyen eksitotoksiste mekanizmasının oluşması için multifaktöriyel bir sistem etkindir. Genetik yatkınlık, çevresel toksinler ve yaşlanma hem kalıtsal hemde sporadik olarak Parkinson hastalığının başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan önemli faktörlerdendir (Gorman, 2008). Çevresel bir nörotoksin olan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)'nin çeşitli hayvan modellerinde, MPTP'nin aktif metaboliti olan nörotoksin MPP⁺ nin ise hücre kültürlerinde, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks 1'ini inhibe ederek ATP tükenmesine, serbest radikallerin üretiminin artmasına, oksidatif strese ve apoptotik hücre ölümüne neden olup Parkinson hastalığının çeşitli biyokimyasal, patolojik ve klinik özelliklerini ortaya koyduğu gösterilmiştir (Badisa ve ark, 2010; Keane ve ark, 2015). MPP⁺, in vitro ve in vivo olarak dopaminerjik nöronları seçici bir şekilde öldürür (Choi ve ark, 2015). Bu nedenle MPP⁺ toksisitesi PH'nin en çok çalışılan kimyasal modelidir (Dauer ve Przedborski, 2003).

Bizim bu çalışmadaki amacımız, fare nöroblastoma hücreleri ve glia hücreleri (IHA-immortalized human astrocytes) olmak üzere iki farklı hücre hattında öncelikle MPP⁺ ile hücrel Parkinson modeli oluşturmak, MPP⁺'nin hücre düzeyinde yarattığı metabolik değişiklikleri, ekstraselüler glutamat seviyesindeki ve GLT-1 ekspresyonundaki değişimleri araştırarak MPP⁺'nin oluşturduğu eksitotoksitenin moleküler mekanizmasını gözlemlemektir. Bu hücrel modeller, Parkinson hastalığına eksitotoksiste ekseninden yaklaşarak tedavi modelleri geliştirilmesine ön ayak olacak ve yine bu hastalıkta eksitotoksiste mekanizmasının aydınlatılmasını sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi ve Epidemiyolojisi

İlk tanımlama, doktor James Parkinson'un 1817 yılında yayımladığı "An Essay on the Shaking Palsy" derlemesi ile yapılmıştır. Alzheimer'dan sonra yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların en sık gözlenenini olarak, hastalığın temel klinik özellikleri belirlenmiştir (Cedarbaum ve Gancher, 1992; Dauer ve Przedborski, 2003). Hastalığın tanımlaması Parkinson'un öncelikle göz önüne aldığı, hastalığın semptomlarını gösteren, 6 hastayı izlemesiyle ortaya çıkmıştır (Cedarbaum ve Gancher, 1992).

Parkinson'un hastaları gözlemleyerek fark ettiği ve tanımlama için yaptığı özlü açıklaması hala geçerlidir: Vücudun desteklendiği zaman bile hareketsiz olan kısımlarında kas gücünün kaybıyla ilişkili istemsiz bir titreme hareketi, gövdeyi öne doğru bükme (kambur duruş) ve yürüme mesafesinden koşma hızına geçme eğilimi gösterirler (Reich ve Savitt, 2019). Bu semptomların yanında ek olarak, bradikinezi (hareketlerde yavaşlama), hipokinezi (hareket genliğinde azalma), akinezi (yürüme sırasında kol salınımı), normal yüz ifadesinin azlığı (hipomimya), ses hacminin azalması (hipofoni) ve boğulma (düşünmeden yutamama) gibi çeşitli semptomlar kendini gösterir (Dauer ve Przedborski, 2003).

Endüstrileşmiş ülkelerde PH prevalansının genel olarak tüm popülasyonun % 0-3'ü ve 60 yaşın üzerindeki insanlarda yaklaşık % 1 olduğu tahmin edilmektedir (de Lau ve Breteler, 2006). 50 yaşından önce nadir görülürken, insidansı ve prevalansı 60 yaşından sonra giderek artmaktadır; prevalans çalışmalarının meta-analizine dayanarak, prevalansı 50 ila 59 yaş arasındaki 107/100.000 kişiden 70 ila 79 yaş arasındaki 1087/100.000 kişiye yükselmiştir (Elbaz ve ark, 2016).

Kadın hastaların erkek hastalara oranı yaklaşık 1.5/2 olup, erkeklerde kadınlardan daha yaygındır. Bu farkın olası açıklamaları, erkeklerde daha sık mesleki maruziyet yaşanması, kadınlarda östrojenlerin nöroprotektif etkilerinin ve X'e bağlı genetik faktörlerin olması olarak bilinir. Ancak bu roller hala tartışılmaktadır (de Lau ve Breteler, 2006; Elbaz ve ark, 2016).

2.2. Hastalığa Etkisi Olan Faktörler ve Hastalığın Etiyolojisi

Dünyada PH'nın değişken prevalansı, etnik farklılıklar ile birlikte çevresel ve genetik faktörlerin hepsinin hastalık patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (DeMaagd ve Philip, 2015). Parkinson hastalarının yaklaşık% 5-10'u ailesel kalıtım kalıplarına sahiptir (Martin ve ark, 2006) ve tekli monogenik mutasyonlara atfedilebilir; Her ne kadar aile öyküsü olmayan ve kesin genetik temeli olmayan sporadik Parkinson Hastalıkları, hastalık vakalarının% 90'ını oluştursa da, ailesel PH formları, PH patofizyolojisinin merkezinde bulunan hücresel yolakları ortaya çıkarmıştır (Park ve ark, 2018). Fakat, sonuç olarak, hastalığın büyük çoğunluğu sporadiktir ve etiyolojisi genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimleri içerir (Milanese ve ark, 2018).

Hastalığın başlangıcının 30-40 yaş aralığından önce görülmesi nadir bir durum olduğu gibi, yaş ilerledikçe ensidansta da orantılı bir artma görülür (Cedarbaum ve Gancher, 1992). Hastalığın sıklığı artan yaşla birlikte artmaktadır ve 60-65 yaşındaki bireylerin yaklaşık %1'ini etkilerken ve 85 yaşında % 5'e yükselmektedir (Eriksen ve Petrucelli, 2004).

Cinsiyet açısından da PH için birçok çalışma kadınlar ve erkekler arasındaki hastalığın görülme oranında önemli farklılıklar bulundurur (Cedarbaum ve Gancher, 1992).

Sporadik PH vakalarının yaklaşık % 3-5'i bir tek genetik varyanttan kaynaklanır. Ailesel vakalar arasında, % 30'un monogenik bir nedeni vardır. PH vakalarının büyük çoğunluğu “idiyopatik” olmasına rağmen, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, hastalık riskine katkıda bulunan çok sayıda duyarlılık genini ve lokusunu (en az 24) tanımlamıştır; bunlar hastalık sürecindeki mekanik rolleri açısından araştırılmaktadır (Williams-Gray ve Worth, 2016). Kalıtım ile PH'na neden olan bu genlerden en sık karşılaşılanları α -sinüklein, Pink, Parkin, DJ-1 ve UCHL-1'dir (Eriksen ve Petrucelli, 2004).

PH gelişiminde kırsal alanlarda pestisit kullanımı ve herbisitler arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu bulgu, bazı pestisitlere ve herbisitlere maruz kalmanın dopaminerjik nöronların kaybına neden olabileceğini gösteren deneysel çalışmalara ek destek sağlamıştır (Eriksen ve Petrucelli, 2004).

2.3. Parkinson Hastalığının Patolojik Özellikleri

PH'nın ana patolojik özellikleri, korpus striatuma yansıyan substansiya nigra pars compacta (SNc)'nin melanize dopaminerjik nöronlarının dejenerasyonunu ve kaybını; ayrıca Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan, α -sinüklein agregatlarını (yığılımlarını) içerir (Blandini, 2010; DeMaagd ve Philip, 2015; Dickson, 2018). SNc'deki hücre kaybindan kaynaklanan striatal dopaminerjik denervasyon (bozuk sinir biçimi), bazal ganglion devrelerinde karmaşık fonksiyonel modifikasyonları tetikler ve bunlar, hastalığın tipik motor semptomlarının (tremor, sertlik, bradikinezi) nedenidir (Blandini, 2010).

PH'daki Lewy patolojisinin sadece dopaminerjik hücreleri değil, aynı zamanda gözlenen geniş semptom ve bulgu spektrumunu hesaba katan kolinerjik, noradrenerjik, serotonerjik, histaminerjik ve glutaminerjik hücreleri içerdiği iyi bilinmektedir (Williams-Gray ve Worth, 2016).

PH patogenezinin altında yatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, biriken kanıtlar, çözünür oligomerler olarak bilinen fibriler yapıdaki α -sinüklein agregatlarının (yığılımlarının), birçok subselüler fonksiyona zarar vererek PH'nın nörodejeneratif sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Rocha ve ark, 2018).

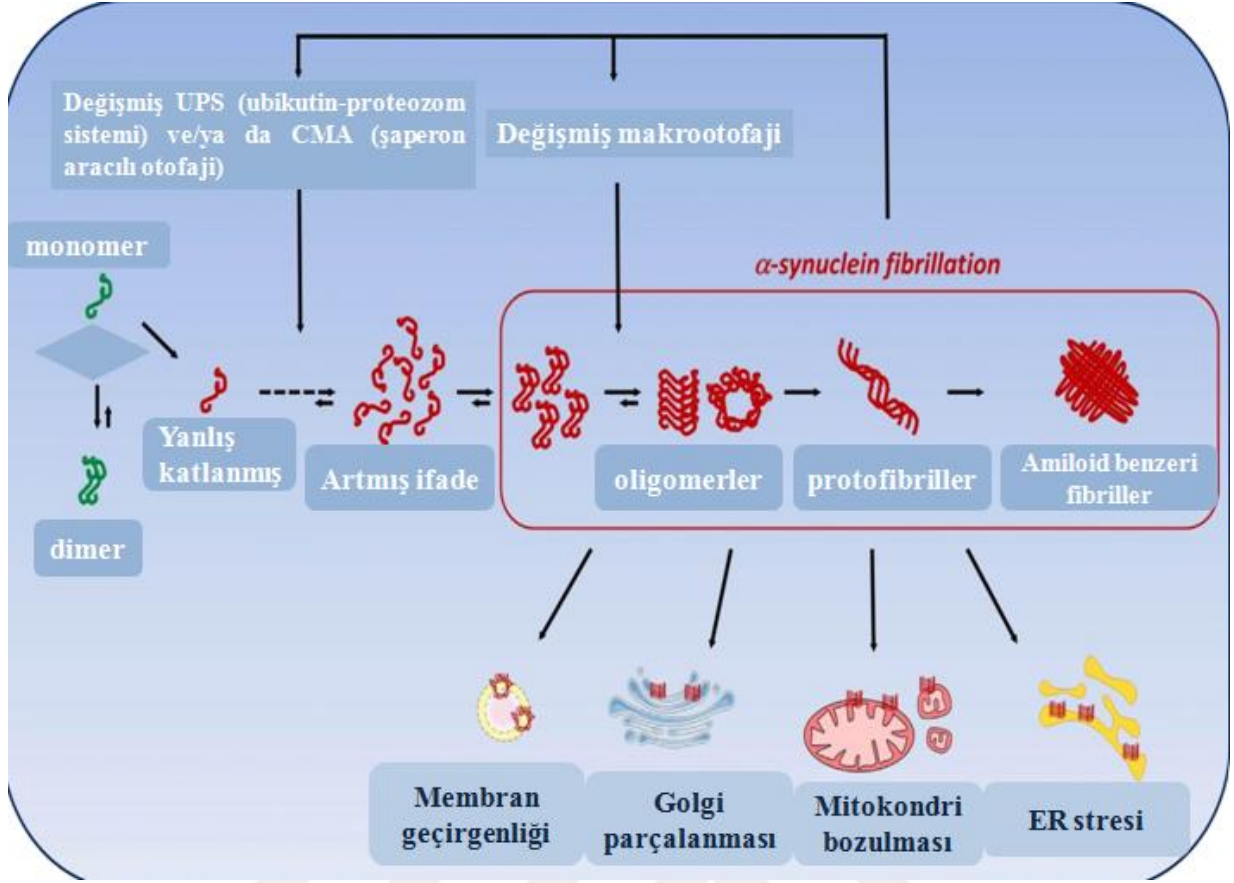
α -sinüklein küçük agregatlarının anatomik olarak birbirine bağlı beyin bölgeleri boyunca sinaps yoluyla yayılabildiğine dair kanıtlar vardır. Bu patolojinin yayılmasını sağlayan mekanizmalar ve bunun farklı bireylerde farklı oranlarda meydana gelme nedenleri hala belirsizdir (Williams-Gray ve Worth, 2016).

2.3.1 α -Sinüklein ve Lewy Cisimcikleri

İnsan α -sinüklein proteini SNCA geni tarafından kodlanır. SNCA genindeki mutasyonların, hastalık patogenezi ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. SNCA geni, 4q21 kromozomunda bulunur (Mehra ve ark, 2019). SNCA geninde bir nokta mutasyonunun varlığı veya tam bir lokus duplikasyonu, otozomal dominant PH formu ile sonuçlanacaktır (Rocha ve ark, 2018). Oluşan bu mutasyonlar ve duplikasyonlar yada triplikasyonlar, hastalığın ailesel ve sporadik bir şekline sebep olur (Mehra ve ark, 2019). PH'nın patolojik özelliklerinden biri de nöronlarda bu hasarlardan dolayı α -sinüklein-pozitif sitoplazmik inklüzyonların birikmesidir (Booth ve ark, 2017).

Bu küçük, hidrofilik, doğal olarak katlanmamış, 140-amino asit içeren protein, insan sinir sisteminde, sinir hücrelerinin hepsinde değil fakat birçoğunda bulunur (Braak ve ark, 2004). Sitoplazmik içeriklerde α -sinüklein varlığı anormal sitolojik lokalizasyonu temsil eder, çünkü α -sinüklein normalde sinaptik vezikül salınımında rol oynayan presinaptik terminallerde zenginleştirilmiş ve doğal olarak katlanmamış bir proteindir. Lewy cisimcikleri de α -sinüklein agregatlarından oluşan intranöronal yığılımlardır (Şekil 1) (Dickson, 2018).

PH'daki anormal α -sinüklein, yalnızca agregasyonu destekleyen anormal bir konformasyona sahip değil, aynı zamanda fosforilasyon, kesilme ve oksidatif hasar da dahil olmak üzere patolojiye yol açan posttranslasyonel modifikasyonlara sahiptir (Dickson, 2018). Bir hipoteze göre, α -sinüklein'in doğası gereği düzensiz bir protein veya yapılandırılmamış monomer olarak var olduğu düşünülmektedir. Bu α -sinüklein proteini yapısal olarak üç ayrı bölgeye ayrılır: pozitif yüklü bir N-terminal bölgesi, toplanma eğilimi yüksek bir merkezi hidrofobik bölge ve yüksek asidik bir C-terminal alanı (Rocha ve ark, 2018). α -sinüklein'nin N-terminal bölgesi, bir amfipatik α -helix yapısını oluşturan ve yüksek oranda korunan 11 amino asit tekrar dizisinin mevcudiyeti ile karakterize edilir. Bu amfipatik bölgenin varlığı, proteinin membranlarla bağlanmasını sağlar. Bu bölgeyi, α -sinüklein'nin hidrofobik bölgesi veya amiloid olmayan bileşen (NAC) olarak adlandırılan bölgesi izler. Bu bölge amiloidojeniktir ve protein toplanmasından sorumludur. Daha sonra polar olan ve birçok yüklü amino asit kalıntısından oluşan α -sinüklein'nin C-terminal alanı yerini alır. Bu bölge, translasyon-sonrası modifikasyon bölgelerinin çoğunu içerir ve ayrıca α -sinüklein'nin diğer proteinler, ligandlar ve metal iyonları ile etkileşimine aracılık eder (Mehra ve ark, 2019).



Şekil 1. PH'da sinüklein agregasyonunun olası sebepleri ve sonuçları (Michel ve ark, 2016)

Bir α -sinüklein fibrilasyon işlemi, katlanmamış veya yanlış katlanmış monomerlerin dimerler halinde toplanmasını, daha sonra β -tabaka benzeri etkileşimlerle stabilize edilebilen küçük oligomerik türler içerir. Bu aşamada, sinüklein agregasyonu daha yüksek moleküler ağırlıklı, çözünmeyen protofibrillere evrilir ve Lewy cisimleri gibi patolojik yapılarda biriken amiloid benzeri fibrillerin oluşumuyla sonuçlanır. α -sinüklein'nin oligomerleri ve protofibrillerinin, nöronlar için özellikle toksik olduğuna inanılmaktadır. Mitokondriyal ve ER (endoplazmik retikulum) homeostazı gibi temel hücresel fonksiyonları değiştirmenin yanı sıra Golgi cisimlerinin parçalanmasını ve zarların geçirgenliğini artırırlar (Michel ve ark, 2016).

2.4 Moleküler Mekanizmalar

2.4.1 Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondriyal disfonksiyonun hem sporadik hem de ailesel PH'de en önemli faktör olduğu düşünülmektedir ve temel olarak mitokondriyal elektron transport zinciri kompleks I'deki anormallikler, gen mutasyonları ve homeostaz değişiklikleridir (Sun ve ark, 2019).

Mitokondriyal düzensizliğe, eksojen nörotoksinler gibi çevresel faktörlerin neden olmasının yanı sıra, gen mutasyonları ve transkripsiyon faktörlerinin disregülasyonu da neden olmaktadır (Sun ve ark, 2019).

MPTP ve rotenon dahil PH modelleri oluşturmak için uygulanan nörotoksinler, mitokondrinin kompleks-1 aktivitesini inhibe ederek mitokondriyal fonksiyona zarar verir (Wang ve ark, 2016). Mitokondriyal fonksiyon kaybı, normal beyin fonksiyonlarını bozar ve aynı zamanda nöronal onarımı azaltır (Kumar Sahel ve ark, 2019).

Metabolik homeostazı ve hücre sağlığı sürdürmek için, mitokondri normal bir fisyon ve füzyon işlemine tabi tutulur ve fonksiyonel olarak hücre ortamındaki değişime adapte olur. Bu işlemlerin dengesizliği, mitokondriyal hasar ve hücre ölümü yeteneğini bozabilir (Şekil 2) (Kumar Sahel ve ark, 2019).

Mitokondriyal disfonksiyonun karakteristik özellikleri başlıca; ROS (reactive oxygen species)'un aşırı üretimi, ATP tükenmesi, mitokondriyal DNA tükenmesi, kaspaz salınımı düzensizliği ve ETC (electron transport complex) enzim defeksiyonunu içerir (Wang ve ark, 2016).

2.4.2. Lizozomal Disfonksiyon

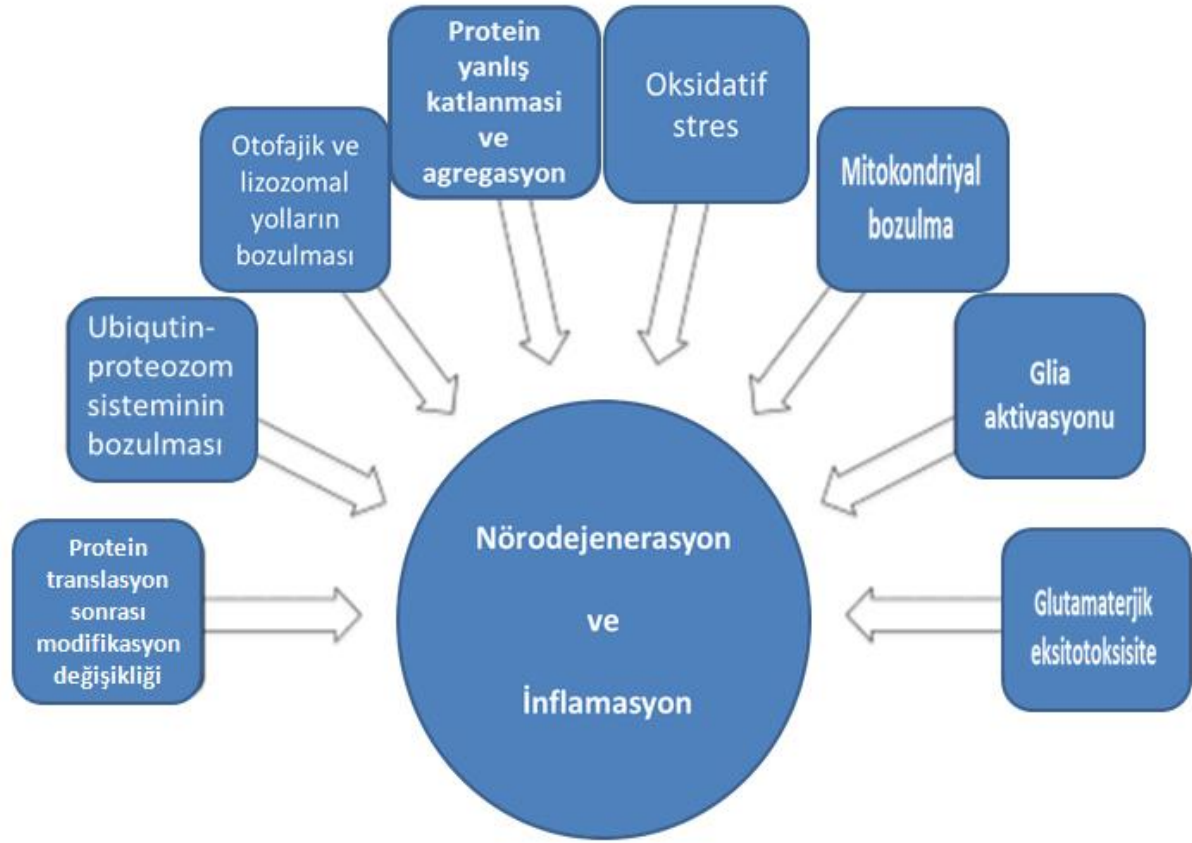
Lizozomlar, lümenlerinde asidik bir pH ile membrana bağlı organellerdir. Lizozomlar, 50-60 tane çözünür enzim ve en az 7 tane integral membran proteini içerir. Bu proteinleri şifreleyen genlerdeki mutasyonlar, bozulmamış substratların birikmesi ile karakterize edilen bir lizozomal depolama bozukluğuna (LSD) neden olur. 40'tan fazla LSD bilinir ve genellikle biriken substratın yapısına göre sınıflandırılır. LSD'lerin çoğunluğu otozomal resesif bir şekilde kalıtsaldır ve geniş bir klinik şiddet spektrumu sergileyen çocuk,

genç ve yetişkin formlarında bulunur. Merkezi sinir sistemindeki patolojiler, çoğu LSD' nin ortak bir özelliğidir (Şekil 2) (Shachar ve ark, 2011).

2.4.3 Oksidatif Stres ve Nitrik Oksit

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (Talepoor Ardakani ve ark,) , özellikle de süperoksit anyon (O^{2-}), hidroksi radikal (Turcan ve ark,) ve moleküler oksijeni kullanan normal ve anormal metabolik işlemlerin yan ürünleri olarak üretilen hidrojen peroksitin (H_2O_2) sitotoksik etkilerini ifade eder (Şekil 2) (Salinska ve ark, 2005).

Oksidatif stres, PH'da dopaminerjik nöronların kaybının altında yatan kavramların temel taşı olmaya devam etmektedir. Oksidatif stresin kaynağı, hem nöronal hem de glial kaynakların etkilenmesiyle ortaya çıkarken bu oluşuma en fazla katkıda bulunan, mitokondri ve endoplazmik retikulumdan kaynaklanan artmış radikal oluşumlarıdır. SNC'de demir birikiminin değişmesi, kalsiyum kanalı aktivitesindeki değişiklikler, değişmiş proteoliz (proteasomal ve lizozomal), α -sinüklein birikimindeki değişiklikler ve mutant proteinlerin varlığı, PH'daki oksidatif stresin nasıl indüklenebileceğinin örnekleridir (Dexter ve Jenner, 2013).



Şekil 2. PH'na katkısı bulunan patolojik yolların dizisi (Ebrahimi-Fakhari ve ark, 2011 den adapte edilmiştir)

Mekanizmalar arasında reaktif oksijen türleri veya glutamaterjik eksitotoksisite ile indüklenen hücrel stresin yanı sıra değişmiş protein metabolizması ve mitokondriyal fonksiyon bulunur. Tüm yollar birbiri ile ilişkilidir ve sonuç olarak nörodejenerasyon ile inflamasyon oluşumu gözlenir (Şekil 2).

2.4.4. Protein Yanlış Katlanması ve Birikimi

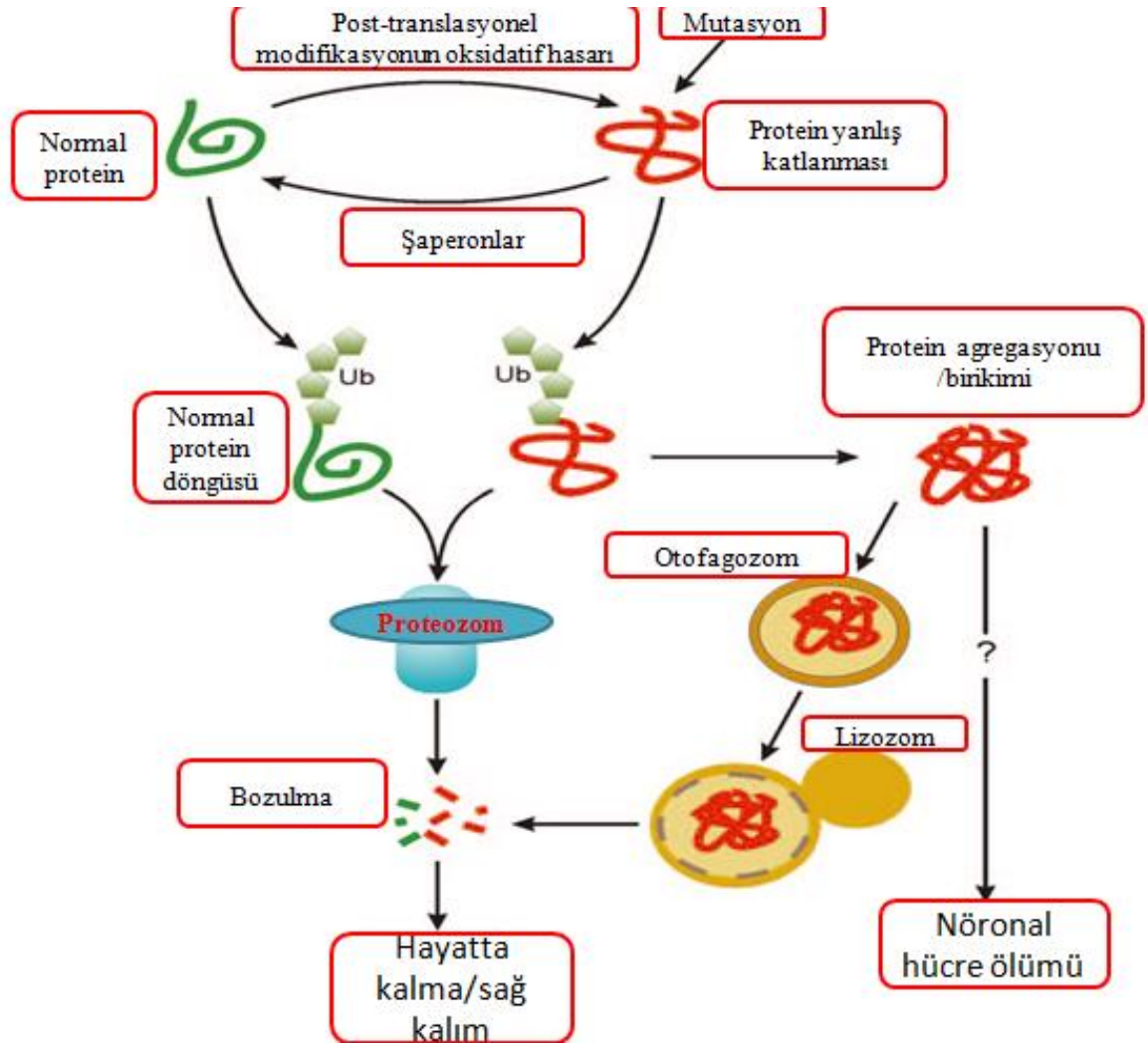
Beyin dokusunda proteinin anormal birikmesi, PH da dahil olmak üzere yaşa bağlı çeşitli nörodejeneratif hastalıkların bir özelliğidir. Protein agregatlarının bileşimi ve konumu farklı olsa da, bu ortak özellik, kendi başına protein birikiminin ya da bazı ilgili olayların nöronlar için toksik olduğunu göstermektedir (Dauer ve Przedborski, 2003).

Yanlış katlanmış veya istenmeyen proteinler, hücre içinde iki yolla parçalanır. Ubiquitin-proteasome sistemi (UPS), hücre içi proteinlerin çoğunluğu için ana bozunma yoludur (Gorman, 2008). Bozulmaya mahkum proteinler, şaperonlarla (yanlış katlanmış/anormal proteinleri tanıyan proteinler) bağlanır ve ubiquitin parçaları ile etiketlenir (Eriksen ve Petrucelli, 2004).

İkincisi, otofajidir ve hücre tarafından istenmeyen veya zarar görmüş organelleri lizozomal bozunma yoluyla elimine etmek için kullanılır ayrıca proteinlerin bozunması için de kullanılabilir (Gorman, 2008).

Ubiquitin, protein üzerinde poli-ubikuitin zinciri oluşturan, 26S proteozomu tarafından saldırıya uğrayan bir bozunma sinyali haline gelen küçük, kovalent bir değiştiricidir. Poli-ubiquitin zinciri, bir substrat tanıma molekülü olarak işlev gören, üç enzim; E1 (ubiquitin aktive edici enzim), E2 (ubiquitin-konjuge enzim) ve E3 (ubiquitin-bağlayan enzim) içeren kaskad reaksiyonu ile sentezlenir (Shimura ve ark, 2000). Ubiquitin aktive edici enzim E1, yüksek enerjili bir ara E1-ubiquitin üretir. Daha sonra, E2 enzimleri, ubikuitini E1'den E3 ligazına aktararak, aktive ubiquitini bağladığı spesifik substratlara bağlanır (Gorman, 2008). Etiketlenmiş proteinler daha sonra bir varil biçimli, çoklu protein, proteolitik kompleks olan proteazom tarafından peptidlere parçalanır (Şekil 3) (Gorman, 2008).

Parkinson hastalığı ile ubiquitin sistemi arasındaki bağlantı, patolojik çalışmalarda ve mutasyonları otozomal dominant ailesel Parkinson hastalığına neden olan, UCH-L1 (ubiquitin karboksil-terminal hidrolaz) ve α -sinüklein gibi iki gen ürününün analizinde önerilmiştir (Shimura ve ark, 2000).



Şekil 3. Nöronlardaki protein metabolizması (Gorman, 2008)

Yanlış katlanmış proteinler, mutasyonlar, oksidatif hasar, hatalı proteoliz veya diğer post-translasyonel modifikasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Bunlar, Hsps gibi şaperonlar tarafından yeniden katlanabilir veya ubiquitin (Braak ve ark.) ilavesiyle proteazomal bozunma hedefli olabilir. UPS'in aracılık ettiği bozulmanın bozulması, otofaji yoluyla parçalanabilen protein agregatlarının oluşumuna yol açabilir. Yanlış katlanmış proteinlerin veya protein agregatlarının birikmesi, bilinmeyen bir mekanizma tarafından nöronal hücre ölümüne yol açar (Gorman, 2008).

2.4.5 Apoptoz ve Nekroz

Nekroz, akut bir hücre ölümü şeklidir. ATP kaybı, iyon gradyanlarının dağılması, hücre şişmesi ve sonuçta hücre erimesi ile karakterize edilir. Bu nedenle nekroz, hücre içeriğinin çevreye salınmasından dolayı çevre bölgede enflamasyona neden olur. Nekroz, tanımlanabilir bir biyokimyasal yol bulunmadığı için programlanmış bir hücre ölümü biçimi değildir ve nekrotik hücre ölümü genellikle şiddetli hücre stres, örneğin; yüksek düzeyde toksinler tarafından meydana gelir (Gorman, 2008).

Apoptoz ise başlangıçta küçülmüş hücrelerde yoğunlaşmış ve parçalanmış çekirdekler sergileyen “büzülme nekrozu” olarak tanımlanmıştır. Nekrozun aksine, apoptoz, hücre ATP'nin korunması ve apoptotik cisimler ile bu hücre partiküllerinin fagositozunun tomurcuklanmasıyla hücre büzülmesine yol açan bir biyokimyasal yolun başlatılması üzerine karakterize edilir (Gorman, 2008).

2.5 Eksitotoksisite

Eksitotoksisite, en yaygın incelenen nöronal hücre ölümü süreçlerinden biridir ve MSS (merkezi sinir sistemi) iskemisi, travma ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok MSS hastalığında önemli bir rol oynar (Sattler ve Tymianski, 2001). İlk olarak John Olney tarafından formüle edilen eksitotoksisite hipotezi, glutamatın aşırı nöronal uyarma ile nörotoksik etkilerini açıklar (Salinska ve ark, 2005). Glutamat, beyindeki sinaptik bölgelerde ana uyarıcı nörotransmitterdir. Tüm glutamaterjik sinapsların %40'ına kadar ve tüm nöronların % 80'inden fazlasında bulunur (Ezza ve Khadrawy, 2014). Dolayısıyla, hafıza, öğrenme, biliş ve algı gibi beyin fonksiyonlarında rol oynamaktadır.

Hücrelerde oksidatif stresi çoğaltabilen birçok faktör olmasına rağmen, nörotransmitter glutamat, öncelikle iyonotropik reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla beyindeki bu işlemin başlıca efektörüdür (Coyle ve Puttfarcken, 1993). Glutamatın, postsinaptik bölgelerde, hücreyi depolarize edebilen ve bir aksiyon potansiyelinin oluşmasına yol açabilen iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır (Rueda ve ark, 2016). Glutamatın etkisi, pre-postsinaptik nöronlarda, özellikle yakındaki astrositlerde bulunan, Na⁺ bağımlı 'yüksek afiniteli' taşıyıcılar ailesi tarafından (Sheldon ve Robinson, 2007), glutamat-glutamin döngüsü ile

presinaptik nöronlara geri dönüştürülüp uzaklaştırılmasıyla hızlıca sona erer (Rueda ve ark, 2016). Glutamat taşıyıcıları, dinamik sinaptik sinyalleme işlemlerini sürdürmek için hücre dışı glutamat konsantrasyonlarını düzenlemede önemli bir rol oynar (Vandenberg ve Ryan, 2013).

Beş farklı Na⁺ bağımlı yüksek afiniteli glutamat taşıyıcısı tanımlanmıştır; bu taşıyıcılar yaklaşık % 50-60 benzer amino asit dizisini paylaşır. Bu taşıyıcılardan ikisi olan GLAST ve GLT-1'e sırasıyla EAAT1 veya EAAT2 de denir. Hem GLT-1 hem de GLAST öncelikle astrositlerde bulunur (Sheldon ve Robinson, 2007). GLT-1 (EAAT2), beyinde en fazla bulunan glutamat taşıyıcısıdır ve ön beyindeki glutamat alımının % 90'ından sorumludur. EAAT2 ağırlıklı olarak astrositlerde eksprese edilir, ancak EAAT2'nin % 10 kadarı hipokampustaki presinaptik nöronal terminallerde de bulunur. Sinaps yakınında bulunan bu taşıyıcıların yoğunluğu, glutamat reseptörlerinin aktivasyonu için salınan glutamat miktarını azaltmada yeterlidir. Esasen reseptör aktivasyonunu sınırlandırmak için yeterli olan taşıyıcılara glutamatların bağlanması sonucu glutamat taşıyıcıları sinapslarda tampon olarak işlev görürler (Vandenberg ve Ryan, 2013).

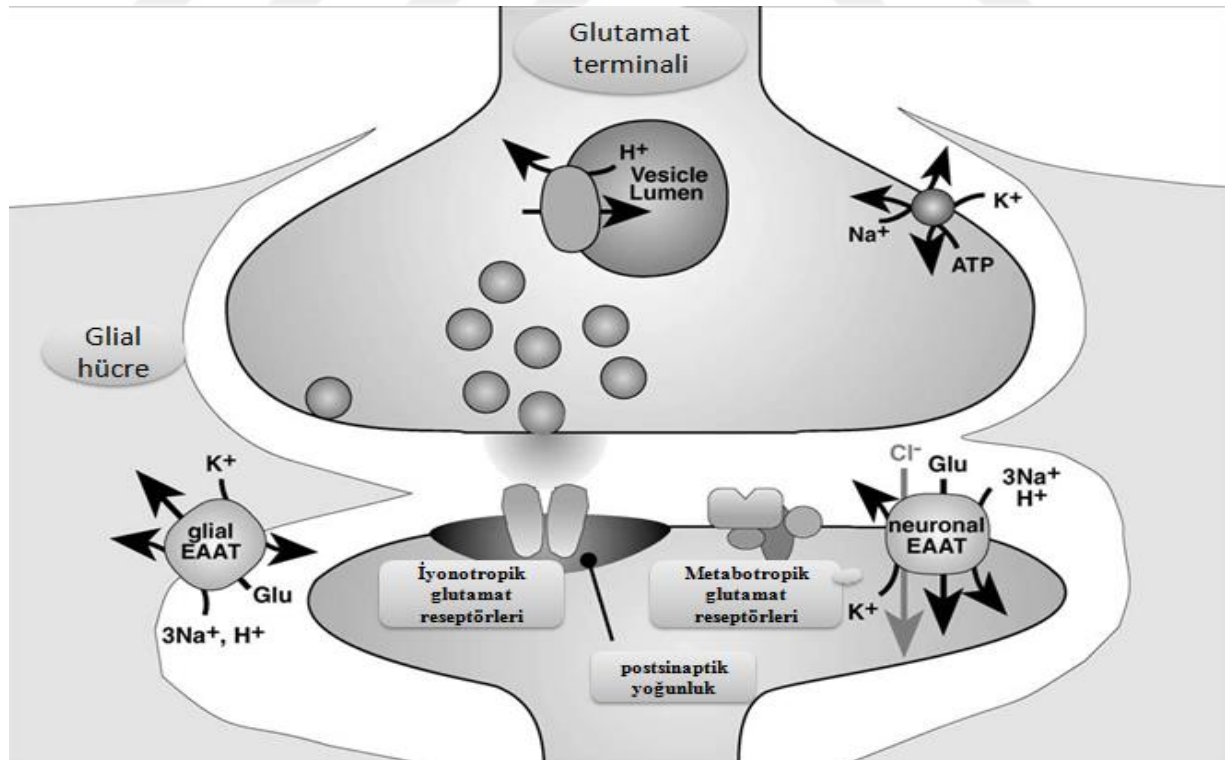
Glutamat reseptörleri ya iyonotropik ya da metabotropik olarak sınıflandırılır (Jia ve ark, 2015). Glutamatın depolarize edici etkisine aracılık eden iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluRs), en kuvvetli agonistlerinden sonra adlandırılmıştır, farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikleri ile ayırt edilebilir (Coyle ve Puttfarcken, 1993). İyonotropik reseptörler, glutamat bağlandığında ve NMDA (N-metil-Daspartat), AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit) veya kainat reseptörlerinde alt sınıflara ayrıldığında iyon kanalını doğrudan aktive eder (Jia ve ark, 2015; Coyle ve Puttfarcken, 1993). Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluRs), G-proteinlerinin aktivasyonu ve takiben birçok yol boyunca daha yavaş hareket eder (Jia ve ark, 2015).

Anormal glutamat salınımı ve/veya glutamat temizlenmesinin disfonksiyonu, glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasına neden olabilir ve eksitotoksisite olarak bilinen nöronal hasara yol açabilir (Lin ve ark, 2012). Hem iyonotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz, Demans, ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen nöronal hasarlanmayı açıkça işaret etmektedir (Ezza ve Khadrawy, 2014).

2.5.1 Glutamat Taşıyıcıları

Glutamat taşıyıcılarının fonksiyonel aktivitesi, sağlam bir hücrel sodyum gradyanına ve dolayısıyla $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ 'ın çalışmasına bağlıdır. Bu nedenle, taşıyıcılar plazma zarındaki ATPaz ile sıkı bir şekilde bağlanmıştır. Sodyuma bağlı taşıma açıkça ATP formunda kimyasal enerji gerektirdiğinden, astrositik glutamat taşıyıcıları hem glikolitik enzimler hem de mitokondri ile yakından ilişkilidir. Son astrositik süreçlerde glutamat taşıyıcı aktivitesi ile mitokondrinin hareketliliği/değişkenliği arasında bir korelasyon olması özellikle önem taşır. Bu nedenle, nöronal aktivitedeki ve glutamat alımındaki bir artış, taşıyıcılara yakın bir yerde mitokondriyal hareketliliğin durdurulmasına neden olur (Sonnewald ve Schousboe, 2016).

Glutamat, veziküler glutamat taşıyıcılarının (VGLUT) etkisiyle sinaptik veziküllerde depolanır ve salıverilmesinin ardından, iyonotropik ve metabotropik reseptörler yoluyla etkisini gösterir. Glutamatın sinaptik etkileri, astrositlerin ve nöronların plazma zarı üzerinde bulunan glutamat taşıyıcılarının (uyarıcı amino asit taşıyıcıları [EAAT]) etkisiyle hızla sonlandırılır (Şekil 4). Bu 2 taşıyıcı aile, fonksiyonel özelliklerinin çoğunda farklıdır (Benarroch, 2010).



Şekil 4. Glutamat taşıyıcılarının nöronlar ve glial hücreler üzerindeki lokalizasyonunu gösteren bir glutamaterjik sinaps gösterimi (Amara ve Fontana, 2002)

2.5.1.1. Veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT)

Glutamat, fosfatla aktive olan glutaminazın etkisiyle presinaptik terminallerde glutaminden sentezlenir ve VGLUT'ler vasıtasıyla presinaptik veziküllerin lümenine translokasyonla yerleşir. Glutamat alımı, ATPaz tarafından oluşturulan vakumlu bir tip vezikül membranı boyunca proton (H) bağımlı bir elektrokimyasal gradyan ile sürülür. Üç VGLUT izoformu, VGLUT1, VGLUT2 ve VGLUT3, moleküler olarak tanımlanmış ve bugüne kadar işlevsel olarak karakterize edilmiştir. VGLUT'lerin ekspresyonu, sinir gelişimi sırasında sıkı bir şekilde düzenlenir ve yetişkin MSS (merkezi sinir sistemi)'de toplam veziküler glutamat alımının yaklaşık% 80'ini oluşturur (Benarroch, 2010).

2.5.1.2 Eksitatör (uyarıcı) amino asit taşıyıcıları (EAAT)

MSS'deki uyarıcı amino asit taşıyıcıları (EAATs), hücre dışı glutamat konsantrasyonlarını eksitotoksik seviyelerin altında tutar ve nörotransmisyon sırasında salınan glutamatın temizlenmesine katkıda bulunur (Amara ve Fontana, 2002). EAAT'lar normal uyarıcı sinaptik iletimin korunması için gereklidir, çünkü bunlar glutamat reseptörü aktivasyonunun zamanını belirler. Ayrıca 2 nötral amino asit taşıyıcısını da içeren SLC1 (solute carrier 1) ailesinin üyesidir (Benarroch, 2010).

İnsanlarda şimdiye kadar beş sodyum-bağımlı plazma zarı glutamat taşıyıcısı alt tipi (EAAT1-EAAT5) tanımlanmıştır (Amara ve Fontana, 2002; Benarroch, 2010). EAAT1 ve EAAT2 astrositlerde, EAAT3 ve EAAT4 nöronlarda ve EAAT5'te çoğunlukla retina hücrelerinde eksprese edilir (Benarroch, 2010).

EAAT1 ve EAAT2, 3 Na⁺, 1 H⁺ iyonları alan ve K⁺ iyonları veren ve bu nedenle, glutamat akışına yol açarak bir konsantrasyon gradyanı üreten Na⁺ 'a bağlı taşıyıcılardır (Goodwani ve ark, 2017).

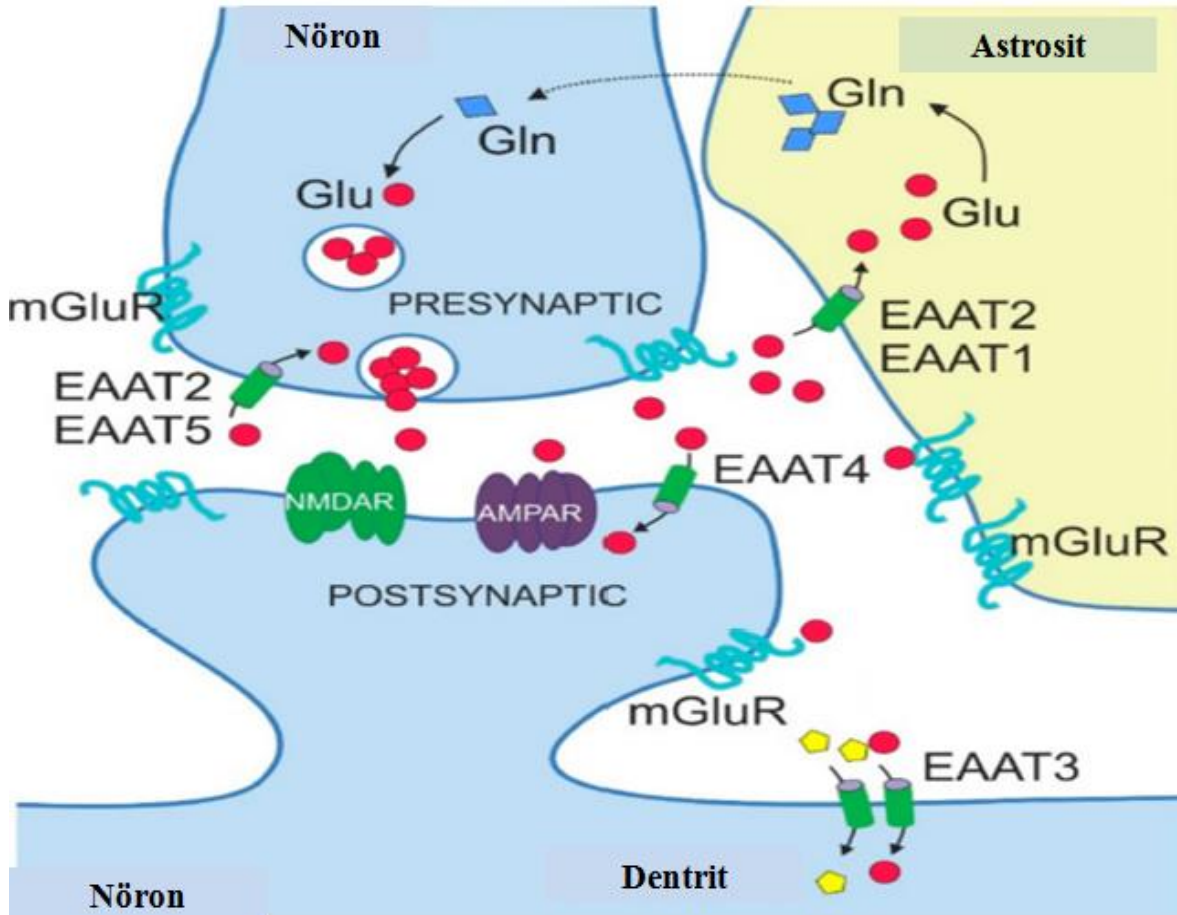
EAAT3, ön beyin nöronlarındaki birincil glutamat taşıyıcısıdır ve glutamat alımına izin vererek, GABA habercisinin mevcudiyetini ve böylece inhibe edici internöronlarda GABA sentezini düzenler (Benarroch, 2010). Ek olarak, EAAT'lar, yüksek Cl⁻ iletkenliğini nispeten zayıf glutamat alım kapasiteleri ile birleştiren ve bu nedenle çift taşıyıcı/Glu kapılı Cl⁻ kanallarını temsil eden, EAAT4 ve EAAT5 için özellikle belirgin olan termodinamik olarak bağlanmamış bir Cl⁻ akışına sahiptir (Kim ve ark, 2011) (Şekil 5).

2.5.1.2.1 GLT-1 (EAAT 2)

Glutamat, merkezi sinir sistemindeki önemli noktalarda eksitator sinir iletimine aracılık eden bir nörotransmitterdir. Bu iletim, hafıza ve öğrenmeyle ilgili sinaptik plastisite, gelişme sırasında sinir ağlarının oluşumu ve merkezi sinir sisteminin onarımı gibi sayısız temel beyin işlevlerinde merkezi rol oynamaktadır. Bu nedenle PH'nın motor semptomlarının altında yatan sinirsel mekanizmalarda da merkezi rol oynar (Blandini, 2010).

Çeşitli kanıt dizilerine dayanarak, GLT-1/EAAT-2'nin nöroaks boyunca glutamatın temizlenmesinde baskın bir rol oynadığı görülmektedir (Sheldon ve Robinson, 2007).

EAAT2 fonksiyonunun ve EAAT2'nin glutamati astrositlere geri taşımalarının bozulması, hücre dışı glutamat birikimine neden olarak hipoksi, nöbetler ve enerji hasarları ile bağlantılı diğer durumlarda ortaya çıkabilir (Benarroch, 2010).



Şekil 5. Nöronlarda ve astrositlerde Eksitator amino asit taşıyıcılarının (EAAT) ekspresyonu ve aktiviteleri (Malik ve Willnow, 2019'dan adapte edilmiştir)

Glutamat (Glu; kırmızı noktalar) sinapsın presinaptik tarafındaki nöronlar tarafından salınır ve nöronal ve glial glutamat reseptörleri (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit reseptörleri, AMPAR'lar; N-metil-d-aspartat reseptörleri, NMDAR'lar metabotropik glutamat reseptörleri, mGluR'ler) üzerine etki eder. Hücre dışı glutamat, astrositler ve nöronlarda bulunan EAAT'ler tarafından uzaklaştırılır. Astrositlerde glutamat, nötr amino asit taşıyıcıların aktivitesiyle nöronlara geri konan glutamine (Gln, mavi kareler) dönüştürülür (Şekil 5).

2.5.2. Glutamat Reseptörleri

MSS'nin çoğu nöronunda, doğrudan ya da dolaylı olarak glutamat tarafından aktive edilen en az iki ana Ca^{+2} geçirgen kanal sınıfı vardır: ligand kapılı iyon kanalları (İyonotropik glutamat reseptörleri; NMDA alt tipleri, Ca^{+2} geçirgen AMPA ve kainat alt tipleri) ve Voltaj duyarlı Ca^{+2} kanalları (VSCC) (G-proteini ile aktive olan metabotropik glutamat reseptör alt tipleri [mGLUR]). VSCC'ler, membran potansiyeli ile düzenlenir ve elektrofizyolojik ve farmakolojik kriterlere dayanan birkaç alt tipe ayrılır. VSCC'lerin eksitotoksitedeki doğrudan rolü hala belirsizdir (Sattler ve Tymianski, 2001; Yokoi ve ark, 2012).

Yüksek Ca^{+2} geçirgenliği nedeniyle NMDA reseptörlerine, eksitotoksiteye katkısı yönünden baskın bir rol atfedilmiştir. Çeşitli moleküler klonlama teknikleri çalışmalarıyla beş NMDA reseptör alt birimi, (NR1 ve NR2A-D'nin) tanımlanmıştır. NR1 alt ünitesinin fonksiyonel bir NMDA reseptörü oluşturmak için gerekli olduğuna ve NR1'in NR2 alt birimleri ile birlikte eksprese edilmesinin gerekli olduğuna inanılmaktadır, ayrıca nöronlardaki NMDA reseptörlerine çok benzeyen belirgin fonksiyonel ve farmakolojik özelliklere sahip iyon kanallarının oluşmasına yol açmaktadır (Sattler ve Tymianski, 2001).

2.5.2.1. İyonotropik glutamat reseptörleri

α -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit (AMPA) tipi glutamat reseptörleri (AMPAR), beyindeki hızlı uyarıcı sinaptik iletimin çoğuna aracılık eder. AMPAR'lar, postsinaptik zarın içine ve dışına, etkinliğe bağlı bir şekilde dinamik olarak döner. AMPAR'ların postsinapslardaki sayıları ve fonksiyonel özellikleri, sinaptik iletimin

etkinliğini belirlediğinden, AMPAR işleyişinin altında yatan moleküler mekanizmaların, öğrenme ve hafıza için merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Yokoi ve ark, 2012).

AMPA reseptörleri genellikle dört gen, GluR1-4 (GluR-A-D) tarafından kodlanan alt ünitelerin heteromerleridir ve AMPA ile glutamat, kainata kıyasla daha yüksek bir afinite sergilerler. AMPA reseptörü alt birimleri, hücre dışı bir N-terminal alanı ve sitoplazmik olarak yerleştirilmiş bir C-terminali kuyruğu olan dört hidrofobik membran alanına sahiptir (Sattler ve Tymianski, 2001). AMPA ve KA (kainate, kainic acid) reseptörleri genellikle NMDA olmayan reseptörler olarak adlandırılır (Şekil 6) (Goodwani ve ark, 2017).

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, bir glutamat bağlayıcı NR2 ve/veya glisin bağlayıcı NR3 alt ünitesi ile glisin bağlayıcı NR1 alt ünitesinden oluşan tetramerik protein kompleksleridir. Ayrıca beyin gelişimi, sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda anahtar rol oynar (Schuler ve ark, 2008). NMDAR'lar postsinaptik membranın nispeten stabil bileşenleridir ve normal dinlenme zarı potansiyelinde Mg^{2+} ile bloke edilir. AMPAR'lar, membran potansiyelini depolarize edecek kadar aktive edildiklerinde NMDAR, hem glutamat bağlanmasında hem de Mg^{2+} blok bloğunun salınmasında açılır ve bu, postsinaptik nöronlara Ca^{2+} akışına neden olur. Artan hücre içi Ca^{2+} , Ca^{2+} / kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) gibi çeşitli enzimlerin aktivasyonunu tetikler ve böylece sinaptik iletim kuvvetinde değişikliklere yol açar. Tek değerli katyonlara (Na^+ ve K^+) geçirgen olan AMPAR'lar beyindeki nöronal depolarizasyonun çoğundan sorumludur (Yokoi ve ark, 2012).

NMDA ve AMPA reseptörlerine benzer şekilde, KA reseptörleri ayrıca GluR5, GluR6, GluR7, KA1 ve KA2 olarak adlandırılan birkaç alt birimden oluşan heterotetramerik komplekslerdir. KA reseptörlerinin Na^+ ve K^+ iyonlarına karşı geçirgen olması bu reseptörlerin uyarıcı postsinaptik akıntılara katıldığını göstermektedir. KA reseptörlerinin, glutamat salınımını modüle eden presinaptik nöronlarda bulunduğunu not etmek önemlidir (Goodwani ve ark, 2017).

2.5.2.2. Metabotropik glutamat reseptörleri (G-protein bağlı reseptörler)

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR), bazal ganglionlar (BG) boyunca yoğun bir şekilde eksprese edilir, burada nöronal uyarılabilirliği, transmitterin serbest bırakılmasını ve uzun süreli sinaptik plastisitesini modüle eder (Masilamoni ve Smith, 2018).

Metabotropik GluR'lerin birçok beyin fonksiyonunda yer aldığı gösterilmiştir. Örneğin, öğrenme ve hafızanın kaynağı olduğu düşünülen uzun vadeli güçlenme ve uzun süreli depresyon gibi sinaptik plastisite olaylarının indüksiyonuna katılırlar Pin ve Duvoisin, 1995.

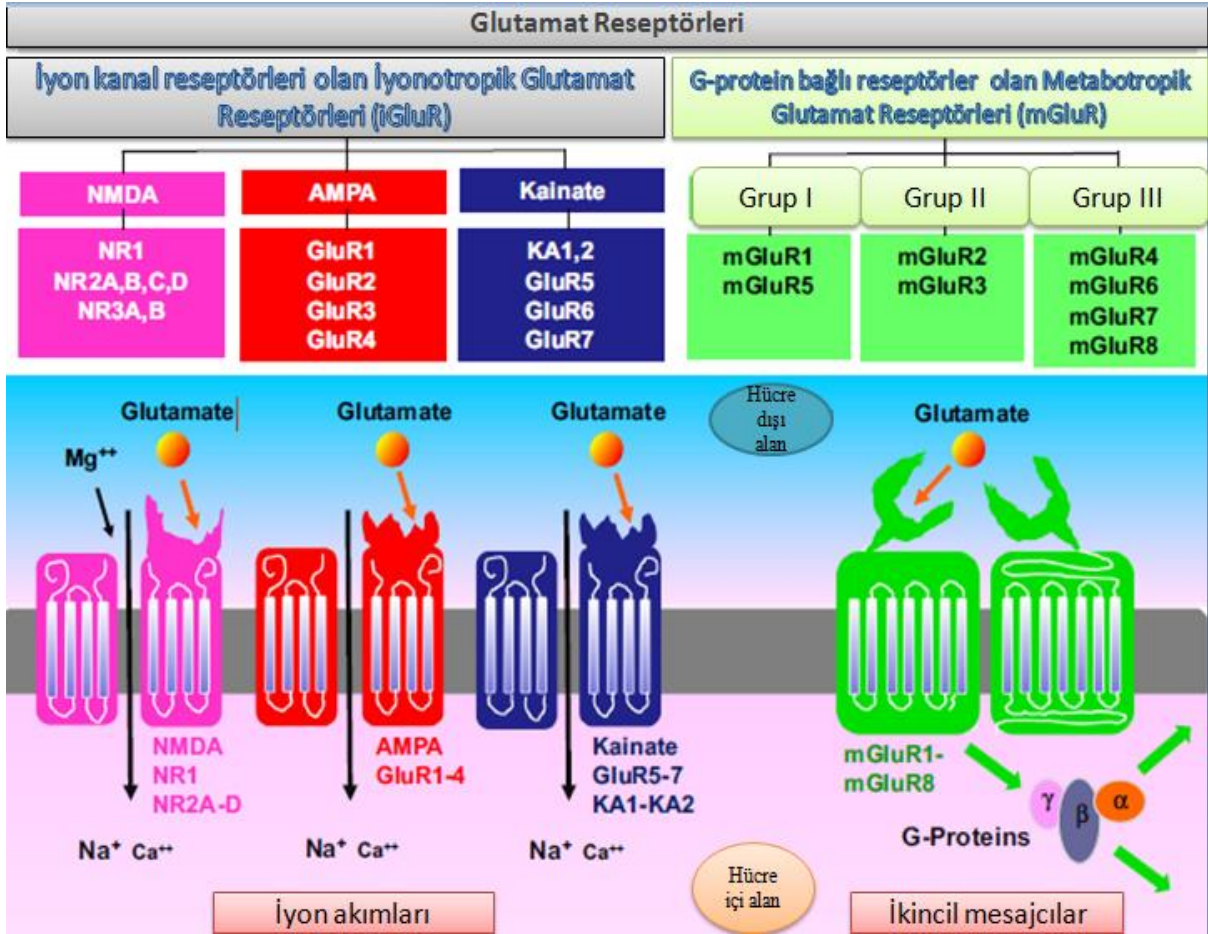
Motor semptomları büyük ölçüde substansiya nigra pars kompacta'daki (SNc dopamin (DA) nöronlarının ilerleyen dejenerasyonu ile ortaya çıkar. Bu (DA) nöronları, korteks ve talamustan büyük dışsal glutamaterjik yansımaları alan, motor, limbik ve bilişsel fonksiyonları içeren, oldukça organize bir beyin çekirdeği ağı, bazal ganglionların (BG) kilit bileşenidir (Masilamoni ve Smith, 2018).

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR), sekans homolojisine, ligand bağlama profiline (farmakolojik profillere) ve sinyal iletim mekanizmalarına göre grup I (mGluR1 ve 5), grup II (mGluR2 ve 3) ve grup III (mGluR4, 6, 7 ve 8) olarak üç gruba ayrılan sekiz G-protein-bağlı reseptör ailesidir (Şekil 6). Bu reseptör ailesi Parkinson hastalığında glutamaterjik disfonksiyonun anahtar düzenleyicileridir (Amalric, 2015; Masilamoni ve Smith, 2018).

Grup I mGluR'ler, mGluR1 ve mGluR5, SNc'nin DAerjik nöronları, striatal nöronları ve internöronlar, globus pallidus (GP) ve subtalamik çekirdek dahil olmak üzere bazal ganglion çekirdeklerinde yaygın olarak eksprese edilir (Masilamoni ve Smith, 2018).

Grup II mGluR'ler, mGluR2 ve mGluR3, glutamaterjik aksonlar ve terminallerde, kolinerjik internöronlarda ve astrositlerde buldukları BG çekirdeği içerisinde farklı şekilde eksprese edilir. Fonksiyonel olarak, striatal grup II mGluR'ler, korteks ve talamustan glutamat salımını ve ventral orta beyinden dopamin salınımını doğrudan veya dolaylı presinaptik mekanizmalar yoluyla düzenler (Masilamoni ve Smith, 2018).

Grup III mGluR'ler, mGluR4, mGluR7 ve mGluR8, BG devresi boyunca ifade edilir, ancak mGluR8, mGluR4 ve mGluR7'den daha düşük bir seviyede ifade edilir. Grup III mGluR'lerin aktivasyonu, presinaptik mekanizmalar yoluyla subtalamik nükleusa (STN) ve SNc'ye olan uyarıcı glutamaterjik enerjiyi azaltır (Şekil 6) (Masilamoni ve Smith, 2018).



Şekil 6. Glutamat reseptörleri (Levite, 2017' den adapte edilmiştir)

Glutamat iki geniş aileye ayrılan birçok tip ve alt tip glutamat reseptörü (GluR) içerir: iyon kanalı reseptörleri olan iyotropik glutamat reseptörleri (iGluR'ler) ve G proteini ile birleştirilmiş reseptörler olan metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR'ler). Tüm GluR'ler glutamat ile aktive edilir. Ek olarak, GluR'ler, her GluR tipine seçici agonistler tarafından aktive edilir.

2.5.3 Glutamat-glutamin döngüsü (Glutamat homeostazı)

Normal koşullar altında, glutamat presinaptik nöronlardan serbest bırakılır ve Na^+ - Ca^{+2} iyonlarının artmasına neden olabilecek olan postsinaptik iyotropik reseptörlerini aktive eder. Sinaptik yarıktaki glutamat konsantrasyonları, glutamat salımı ve glutamatın sinaptik boşluktan temizlenmesi kombinasyonu ile sıkı bir şekilde düzenlenir. Astrositlerin

glutamat temizleme işleminde önemli bir rol oynaması dikkat çekicidir. Sinaptik glutamatın fazlası astrositlere taşıyıcılar tarafından alınır ve burada glutamin sentetaz ile glutamine dönüştürülür; Glutamin daha sonra hücre dışı boşluğa salınır, ayrıca presinaptik nöronlar tarafından alınır ve tekrar glutamat haline dönüştürülür (Goodwani ve ark, 2017).

Astrositlerin, hücre dışı ortamdan alınan glutamata glutamine metabolize ettiği, buna ek olarak glutamatın oksidatif olarak metabolize edilebildiği iyi bilinmektedir. Hücre dışı glutamatın glutamine dönüşümü, glutamat-glutamin döngüsünün bir parçasıdır (Sonnwald ve Schousboe, 2016).

2.5.4 Glutamat Alımı

Fizyolojik koşullarda, glutamat taşıyıcıları, nöronal ateşleme patlamaları sırasında bile sinapslardaki glutamat konsantrasyonlarının azaltılmasına etkili bir şekilde katkıda bulunur. Sinaptik aktivitenin artması, sinaptik yarıқта hızlı bir şekilde milimolar glutamat konsantrasyonları oluşturabilir. Aynı zamanda, sinapsta bulunan tek glutamat taşıyıcı alt tipi, GLT-1, seyrek olarak eksprese edilir ve substratın düşük konsantrasyonlarında maksimum alım hızına ulaşır (Gegelashvili ve Bjerrum, 2019). Glutamat alımı, hem taşıyıcı salınımındaki değişiklikler hem de taşıyıcı aktivitesindeki değişiklikler ile düzenlenebilir (Amara ve Fontana, 2002).

2.5.5 Eksitotoksisitede Ca^{+2} İyonlarının Rolü

Kalsiyum iyonları, farklılaşma ve büyüme, membran uyarılabilirliği, ekzositoz ve sinaptik aktivite gibi hücresel fonksiyonları düzenleyen önemli hücre içi habercilerdir (Arundine ve Tymianski, 2003).

Nöronlar, sitosolik Ca^{+2} seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesini sağlamak için özel homeostatik mekanizmalara sahiptir. Nöronlar hem hücre içi Ca^{+2} seviyelerini hem de Ca^{+2} iyonlarının yerleşimini, Ca^{+2} 'un hücre içi ve hücre dışı akışı, Ca^{+2} tamponlaması ve dahili Ca^{+2} 'un depolanması arasındaki karmaşık etkileşim yoluyla kontrol eder (Arundine ve Tymianski, 2003).

Glutamat eksitotoksisitesi, nörotransmitter homeostatik denge bozulduğunda oluşur. Glutamat eksitotoksisitesinin, nöronal hücrelerde büyük Ca^{+2} akışına neden olduğu ve bunun

da geri dönüşü olmayan hücre hasara yol açan işlemleri (proteaz, lipaz, nitrik oksit sentaz [NOS]) aktive ettiği gösterilmiştir (Jia ve ark, 2015).

Nöronal aktivite sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunda belirgin bir artışa yol açtıktan daha sonra geniş bir hücre tepki aralığına aracılık eden ikinci bir haberci olarak işlev görür. Hücre içi depolardan tetiklenen herhangi bir Ca^{+2} salımı ile birlikte aşırı hücre dışı Ca^{+2} akışı, nöronal sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonlarını, hücre içi Ca^{+2} düzenleyici mekanizmaların kapasitesini aşan seviyelere yükseltebilir ve serbest radikallerin oluşumu ve hücre ölümü gibi metabolik değişikliklere yol açabilir (Sattler ve Tymianski, 2001).

2.6. Parkinson'a Yol Açan Faktörler

2.6.1. Genetik Faktörler

PH'nın %10'unu oluşturan ailesel PH, α -sinüklein (SNCA), Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), Vacuolar protein sorting 35 (VPS35), Parkin (PRKN), PTEN-inducedkinase 1 (PINK1), protein deglycase (DJ-1), Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL-1) mutasyonlarından kaynaklanır. PH ile ilişkili bu genlerin hepsinin mitokondriyal düzensizlikle doğrudan ve dolaylı ilişkileri vardır (Sun ve ark, 2019).

Bugüne kadar, bu bir avuç gen, ailesel PH'nın monojenik nedenleri olarak tanımlanmıştır, bu genlerdeki patojenik mutasyonların çoğu, doğrudan mitokondriyal fonksiyon bozukluğuyla bağlantılıdır (otozomal dominant SNCA ve LRRK2 mutasyonları ve otozomal resesif Parkin, PINK1 ve ATP13A2 mutasyonları) (Park ve ark, 2018).

2.6.2. Çevresel Faktörler

Epidemiyolojik çalışmaların en tutarlı bulgularından biri, artan PH riski ile kırsal yerleşim, tarım, kuyu suyu içilmesi ve tarımsal kimyasallara maruz kalma gibi çevresel faktörler arasındaki ilişkidir (Di Monte, 2001).

Dopaminerjik nörodejenerasyonu indüklemek için kullanılan nörotoksinler arasında 6-hidroksidopamin (6-OHDA), MPTP ve daha yakın zamanda paraquate ve rotenone en fazla dikkat çekenlerdir (Dauer ve Przedborski, 2003).

Muhtemelen, bu toksinlerin tümü ROS oluşumuna neden olmaktadır. Rotenone ve MPTP, mitokondriyal kompleks 1'i potansiyel olarak inhibe etme yetenekleri bakımından benzerdir. Ancak, hayvanlarda kullanım kolaylığı da dahil olmak üzere, önemli farklılıklar sergilerler. Yalnızca MPTP açıkça bir insan parkinsonizm biçimiyle bağlantılıdır ve bu nedenle bu nörotoksinler arasında en çok çalışılan modeldir (Dauer ve Przedborski, 2003).

2.6.2.1. 6-OHDA

6-hidroksi-dopamin (6-OHDA), ilk olarak sıçanlarda nigrostriatal (dopamin) DA nöronlarında lezyonlara neden olduğu bildirilen, ancak fareler gibi diğer hayvanlarda da çalıştığı gösterilen seçici bir nörotoksindir. 6-OHDA, sitozolde birikir ve oto-oksidasyon yoluyla hidrojen peroksit, diğer reaktif oksijen türleri ve kininlerin oluşumunu destekler (Jagmag ve ark, 2015).

6-OHDA uyarımlı toksisite, dopamin ve noradrenerjik taşıyıcı moleküller tarafından öncelikli olarak tercih edilen bir 6-OHDA alımından kaynaklanan katekolaminerjik nöronlar için nispeten seçicidir. Nöronların içinde, 6-OHDA sitozolde birikir ve apoptotik özellik göstermeden hücre ölümüne neden olur (Schober, 2004).

2.6.2.2 Paraquat ve Rotenone

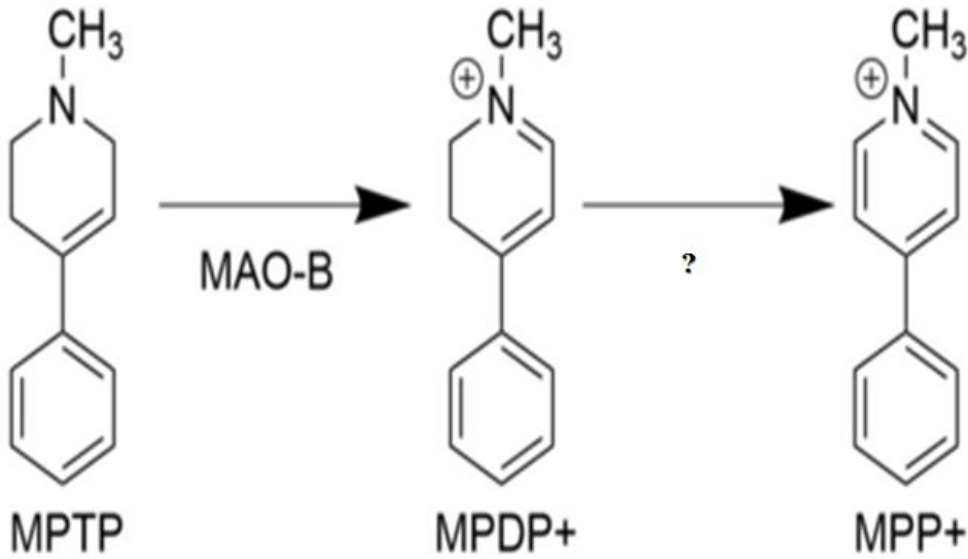
Rotenone, çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunur ve geniş spektrumlu bir böcek ilacı ve pestisit olarak kullanılmıştır. MPTP'de görüldüğü gibi mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks-1 inhibisyonu yoluyla bloke ederek çalışır. Rotenone ayrıca mitozu bloke eder ve hücre çoğalmasını önler. Bu, mikrotübül tertibatının bozulmasına ve GTP hidrolizinin azaltılmasına bağlıdır. Sıçanlarda rotenona kronik sistemik maruz kalma, nigrostriatal DA dejenerasyonu dahil olmak üzere PH'nın birçok özelliğine neden olur. Bu modelin, (lewy body) LB'ye benzeyen hücre içi birikimlerinin oluşumu dahil olmak üzere, PH'nın hemen hemen bütün özelliklerini ürettiği gösterilmiştir (Jagmag ve ark, 2015).

N,N'-dimethyl-4,4'-bi pyridinium dichloride (Paraquat), en yaygın kullanılan herbisitlerden biridir. Paraquat, reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle hücrede oksidatif strese neden olur (Jagmag ve ark, 2015). Paraquat, beyine nötr amino asit taşıyıcıları vasıtasıyla ulaşır, ancak rotenonun aksine hidrofiliği nedeniyle kan beyin bariyerini

serbestçe geçemez (Bove ve Perier, 2012). Paraquat, MPP^+ ile yapısal bir benzerliği paylaşır (Jagmag ve ark, 2015). Kimyasal isminden de anlaşılacağı gibi paraquat, geçmişte kullanılan ve MPP^+ olan ‘cyperquat’ adı verilen bir başka herbisit ile yapısal benzerlikleri paylaşan bir piridinyumdur. Bu gerçek, her iki nörotoksik maddenin de, bazı nörotoksisite mekanizmalarını paylaşabildiğini gösterir, bunun kesin detayları ise hala tartışma konusudur (Bove ve Perier, 2012).

2.6.2.3 MPTP ve MPP^+

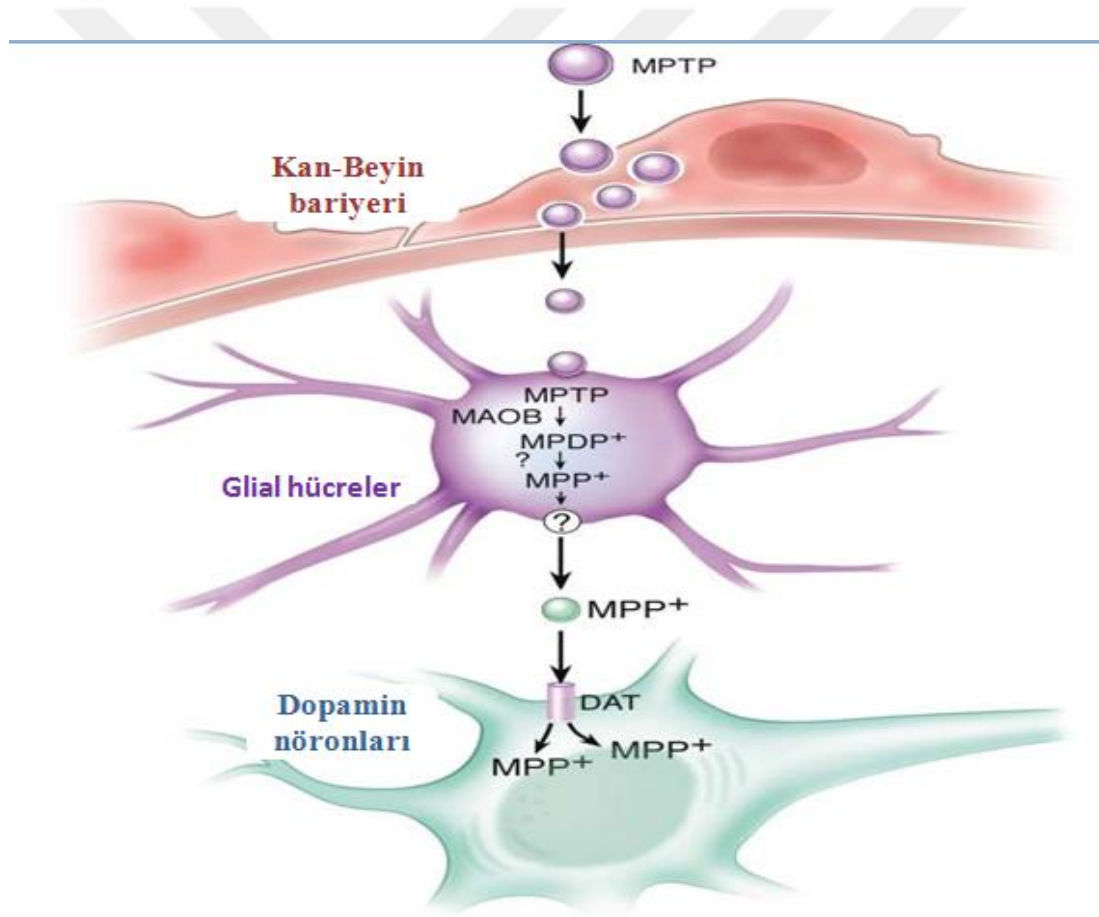
1982’ de narkotik meperidin (Demerol) ’in bir analogu olan dopaminerjik nörotoksin 1-metil-4-fenil1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) yanlışlıkla keşfedildi. Genç uyuşturucu bağımlıları, “sentetik eroin” in intravenöz uygulanmasından sonra ideopatik bir parkinson sendromu geliştirdi (Schober, 2004).



Şekil 7. MPTP’nin MPP^+ ’ya kimyasal dönüşümü

MPTP oldukça lipofiliktir ve sistemik uygulamadan sonra hızla kan-beyin bariyerini geçer. Daha sonra, protoksin MPTP sadece dopaminerjik olmayan hücrelerde (özellikle astrositler ve serotonerjik nöronlarda Monoamin Oksidaz-B (MAO-B) içinde ve daha sonra spontan olarak 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridyuma (MPDP) dönüştürülür. 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP^+) ’ya oksitlenir (Şekil 7,8). Bundan sonra, MPP^+ bilinmeyen bir

mekanizma ile hücre dışı boşluğa salınır (Choi ve ark, 2015; Schober, 2004). MPP^+ , kompleks 1 inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerinin artması gibi mitokondriyal aktivitede PH ile ilişkili değişiklikleri uyaran ve yaygın şekilde kullanılan bir nörotoksindir (Talepoor Ardakani ve ark, 2019). MPP^+ substansiya nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronlar üstündeki dopamin taşıyıcılar tarafından alınarak konsantre edilir (Lewis ve Spillane, 2018). MPP^+ , plazma membranlı dopamin taşıyıcı için yüksek afiniteye sahipken, norepinefrin ve serotonin taşıyıcılar için nispeten daha düşük afinitelere sahiptir (Jagmag ve ark, 2015). MPP^+ , hedef hücrelerinde DAT tarafından biriktirilir (Krug ve ark, 2014). Hücrelerin içine girdikten sonra, bu nöronlarda MPP^+ , mitokondriyal solunum zincirinin kompleks 1'ine bağlanır ve onu inhibe eder, hücrelerin solunumunu önler ve ölümüne sebep olur (Krug ve ark, 2014; Lewis ve Spillane, 2018).



Şekil 8. MPTP Metabolizmasının Şematik Gösterimi (Dauer ve Przedborski, 2003)

MPTP, glial hücrelerde monoamin oksidaz B'nin etkisiyle araürün olan l-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyuma $MPDP^+$ 'e dönüştürülür. Bu ara ürün daha sonra MPP^+ 'ya oksitlenir (Jagmag ve ark, 2015).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Çalışmalarımız hücre paradigmaları üzerinden sürdürüldüğü için herhangi bir etik kurulu iznine ihtiyaç duyulmamıştır.

Fare nöroblastoma hücre hattı N2A, ECACC (The European Collection of Authenticated Cell Cultures)' den sağlanmıştır.

IHA hücre hattı (glia-Immortalized Human Astrocyte) ise Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü (İBG)' den sağlanmıştır (Turcan ve ark, 2012).

3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Tablo 1. Deney yapımı aşamalarında kullanılan laboratuvar araç gereçleri

Kullanılan Araç-Gereçler
Western Blot jel hazırlama seti
Western Blot transfer seti
Western Blot jel yürütme Seti
Santrifüj (Mikro –Makro-soğutmalı)
Hot-blocker Thermal Shaker
Elektroforez Görüntüleme Sistemi
Buz makinesi 60 lt
Elektroforez Dikey (Mini protean)
Laminar air flow cabine
NanoDrop (ThermoFisher Scientific)
Etüv (İnkübatör)
Hassas Terazî

Spektrofotometre (ThermoFisher Scientific)

Su banyosu

İnvert Mikroskop

qPCR cihazı (ThermoFisher Scientific)

Deep freeze (-20) 330 lt

Deep freeze (-80) 490 lt

İnkübatör

Nitrojen Tankı (-196)

Distile su cihazı

Mikroskop (Stereo Zoom)

Otoklav

pHmetre

Hücre sayım cihazı (invitrogen countess)

Tablo 2. Deney yapımı için gerekli olan sarf malzemeler ve çalışma materyalleri

Ürün	Firma
Dulbecco's ModifiedEagleMedium (DMEM), 500 ml	Gibco
Dulbecco's PhosphateBufferSaline (DPBS), 500 ml	Capricorn, Gibco
L-Glutamine, 200 Mm, 100 ml	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS), 100 ml	Gibco
Tripsin-EDTA (%0,25), 1X, 100 ml	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin, 100X, 20 ml	Sigma-Aldrich
RIPA Lysis tamponu, 100 ml	VWR Life Science
Fosfataz İnhibitör Karışımı II (100x, 1 ml)	MedChem Express
Proteaz İnhibitör Karışımı II (100x,1ml)	MedChem Express
WizScript™ cDNA Synthesis Kit(High Capacity)	Wizbiosolutions
RealAmp™ SYBR qPCR Master Mix(2X, High ROX)	Lolicato
Protein Quantitation Kit (Bradford Assay)	Abcam
RiboEx (Total RNA İsolation Solution)	GeneAll
MTT Cell Viability Assay Kit	Biotium
Tris base (Tris-hydroxymethyl-aminomethane)	Nzytech
Glycine	Nzytech

3.1.2. Deney Düzeneginin Hazirlanmasi

3.1.2.1. Hücre kültürü

Fare nöroblastoma hücresi olan N2A hücre hattının kültüre edilmesi için, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyeri kullanıldı. IHA (glia-Immortalized Human Astrocyte) hücre hattının kültüre edilmesi için, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri kullanıldı. Kültüre edilecek olan hücreler 37 °C'de %5 CO₂, %90 nem ve atmosferik oksijen seviyesinde inkübe edilecektir. Adherent büyüme özelliğine sahip olan bu hücrelerde, flask/petri tabanının %70'inin dolmasıyla birlikte hücrelerin pasajlanması gerekmektedir.

Besiyeri hazırlığı için;
Elde edilmek istenen total medium miktarının,
%10'u FBS (Fetal Bovine Serum)
%3'ü L-Glutamin
%1'i Penisilin- Streptomisin
%1'i Sodyum Pirüvat
Karışımı hazırlanır, karışım %85 serumsuz medium üzerine eklenir.

3.1.2.1.1. Hücrelerin çözülmesi

İşleme öncelikle hücreler için kullanacağımız besiyerlerini +4°C'den çıkarıp su banyosunda 15-20 dk ısıtmakla başlanır. Daha sonra istediğimiz hücre hattını -196 °C olan sıvı azot tankından alarak su banyosunda çözdürürüz. Çalışmayı gerçekleştireceğimiz hücre kültürü kabinini ve kullanılacak malzemeleri % 70 derecesinde alkol kullanarak steril hale getirilir.

1 ml oranında kryo (dondurma) tüpünde bulunan hücreyi üzerine 9ml uygun besiyeri ekleyecek şekilde 10mm hacmindeki petri kabına aktararak homojen bir şekilde dağılması için hafifçe sağ-sol, ön-arka çalkalama ya da kabin zemininde petri kabını sekiz çizecek hareketlerle gezdirme işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra hücrelerin çoğalması için inkübe edilecek uygun bir ortam olan etüv/inkübatör'e yerleştirilerek takibi hücre hattı özelliğine göre yapılır (kendi hücrelerimiz için bu süre 24 saattir).

3.1.2.1.2 Hücrelerin pasajlanması

Daha önceden çözme işlemini gerçekleştirip 10 mm'lik petri kabına ekimini yaptığımız hücre hatlarını 37 °C'deki etüvden alınır. İnvert mikroskop ile hücrelerin petri yüzeyini tamamen kaplayıp kaplamadığını incelenir. Petri yüzeyini kaplayan hücrelerin, bu durum konfluent olma durumu olarak isimlendirilir, pasajlamasına başlanır. İlk olarak hücrelerin eski besiyeri aspire edilir. Daha sonra 5ml PBS eklenerek yıkama işlemi uygulanır. Yıkama yapıldıktan sonra PBS de aspire edilir. Hücrelerin petri yüzeyinden kaldırılması için daha sonra 1 ml tripsin eklenir ve 2-3 dk kadar etüvde bekletilir. Süre sonunda etüvden alınan hücreler tekrar mikroskop ile incelenir ve hücrelerin petri yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı gözlemlenir. Petri yüzeyinden ayrılmış olan 1 ml tripsin içindeki hücreler üzerine 9 ml taze besiyeri eklenerek hücrelerin toplanması işlemi gerçekleştirilir. Toplanan hücreler yeni ayrı iki petri kabına ekilerek üzerleri besiyeri ile tamamlanır ve tekrar çoğalmaları için etüve kaldırılır. Hücrelerin konfluent olacakları zamana kadar besiyeri değişimleri hücre ve medium durumu takip edilerek yapılır.

3.1.2.1.3 Hücrelerin sayımı

Öncelikle inkübatörden çıkarılan hücre hatları invert mikroskop aracılığı ile dikkatlice incelenir. Hücre yoğunluğu, canlılık oranları ve hücre morfolojisi uygun mikroskopik faz-kontrast objektif büyütme ayarlarıyla (4X, 10X, 20X, 40X) detaylıca gözlemlenir. Daha sonra hücrelerin normal pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Her zaman yapılandan farklı olarak totalde olan 10 ml miktar yerine 20 ml olarak hücreler toplanır ve 50 ml'lik bir falkon tüpe alınır. Bu hücre süspansiyonu iyice pipetaj edildikten sonra içerisinden 50 µl örnek alınıp 1,5 ml'lik endorf tüpe aktarılır ve üzerine de 50µl tripan mavisi boyası eklenir. Hücre sayımının yapılabilmesi için Invitrogen™ Countess™ II hücre sayım cihazı kullanılır. Boya ve hücre süspansiyonu karışımından 10 µl alınarak hücre sayım cihazının slide lamına yüklenir. Bu lam üzerindeki örnek ile cihaza verilir ve ölçüm üç kez tekrarlanarak 1ml örnekteki ortalama hücre sayısı hesaplanır.

3.1.2.1.4 Hücrelerin dondurulması

Hücrelerimizin dondurulması için öncelikle dondurma mediumu olan freeze medium hazırlanır.

Freeze medium için;

Bir falkon tüpe hazırlanmak istenen total freeze medium miktarının % 20' si FBS, %10' u DMSO ve geri kalanı için üzerine serumsuz medium eklenir. Hazırlanmış olan freeze medium filtreden geçirilerek başka bir falkon tüpe aktarılır. Medium kullanacağımız işleme kadar buz üzerinde muhafaza edilir. Dondurmak istediğimiz hücre hattının öncelikle pasajlaması yapılır. Pasajlaması yapılmış olan hücre hattının toplanması için (elimizde 10 mm'lik 2 petri kabı hücre hattı olduğunu varsayarsak) pasajlama sonrası içerisinde 1'er ml tripsin bulunan 3 dk etüvde bekletilmiş olan hücre hatları etüvden alınır. Toplamda 8ml hücre solüsyonu olması için ilk petri kabına 6ml MEM (N2A için)/DMEM (IHA için) besiyeri eklenir ve hücreler yüzeyden iyice kaldırıldıktan sonra buradaki 7 ml hücre solüsyonu (1ml tripsin + 6ml besiyeri), ikinci petri kabına aktarılarak buradaki hücrelerde yüzeyden kaldırılıp toplama işlemi tamamlanır. Toplanmış olan bu 8 ml hücre solüsyonu 15ml'lik bir falkon tüpe aktarılır. Falkon tüpe aktarılan hücre solüsyonu 5dk süre ile +4°C'de 1200 rpm hızla santrifüj edilir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısım atılır, kalan pelet kısım buz üzerinde 2 dk bekletilir. Sonra pelet kısım bulunan falkon tüpüne dondurulacak her örnek hücre hattı için 1 ml olacak şekilde önceden hazırlanmış freeze medium eklenerek hücre peleti iyice çözülür. Son olarak bu hücre solüsyonu 1'er ml olacak şekilde dondurma tüpü olan kryo tüplere aktarılarak aşamalı şekilde önce -20°C'de 30dk daha sonra izopropanol bulunan kutu içinde -80 °C'de, devamında uzun süre saklayabilmek için -196 °C sıvı azot tankına kaldırılır.

3.1.2.2. Hücre hatlarının konsantre edilmiş MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium)'nin uygun dozları ile muamelesi

100 mg olarak toz halde temin edilen MPP⁺ nörotoksin ajanının ilk olarak konsantre hale getirilmesi için 1 ml RNaz bulundurmeyen steril su ile çözündürülerek ana stok olacak bir solüsyon hazırlanır. Organik bir molekül olan bu toksinin molekül ağırlığı ile mol değerinin hesaplanması yapılarak sonucu 336,553 mM şeklinde kaydedilir. Bu ana stoktan mol değerine uygun olarak hesapladığımız üç ayrı ara stok hazırlanır.

Ana stok kullanılarak uyun dilüsyon ile (30 µl ana stok ile 970 µl RNaz bulundurmeyen steril su bir ependorf tüpte karıştırılır) 10 mM ara bir stok hazırlanır.

10 mM ara stok kullanılarak uyun dilüsyon (100 µl 10 mM'lık ara stok ile 900 µl RNaz bulundurmeyen steril su bir ependorf tüpte karıştırılır) ile 1 mM ara stok hazırlanır.

10 mM ara stok kullanılarak uyun dilüsyon (50 µl 10 mM'lık ara stok ile 950 µl RNaz bulundurmeyen steril su bir ependorf tüpte karıştırılır) ile 500 µM ara stok hazırlanır.

Hazırlanmış olan bütün stoklar ışık ile temasının olmaması için aliminyum folyo ile kaplanır ve +4 °C' de bu şekilde muhafaza edilir.

Hücre hatlarımızın MPP⁺ ile muamelesinin hücre canlılık oranlarını nasıl etkilediğini inceleyebilmek adına yaptığımız MTT çalışmamız için farklı dozlarda MPP⁺ kullanılır. Uygulamanın farklı dozları için daha önce elde edilen ara stoklar kullanılır.

Tablo 3. N2A için MPP⁺ ara stok dozları ve hücreye eklenme miktarı

N2A için MPP⁺ ara stok hazırlama		
10 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	500 µM'lık ara stoktan	2 µl kullanılır.
50 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	1 mM'lık ara stoktan	5 µl kullanılır.
200 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	10 mM'lık ara stoktan	2 µl kullanılır.
500 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	10 mM'lık ara stoktan	5 µl kullanılır.

Tablo 4. IHA için MPP⁺ ara stok dozları ve hücreye eklenme miktarı

IHA için MPP⁺ ara stok hazırlama		
50 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	1 mM'lık ara stoktan	5 µl kullanılır.
500 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	10 mM'lık ara stoktan	5 µl kullanılır.
1000 µM'lik MPP⁺ uygulaması için	10 mM'lık ara stoktan	10 µl kullanılır.

MPP⁺ nin dozu ve kullanılacak miktarları Tablo 3 ve Tablo 4 de ki gibi hesaplandıktan sonra işlemin uygulanacağı hücre hatlarının normal olarak pasajlama ve ardından hücre sayım işlemleri yapılır (bölüm 3.1.2.1.2. ve 3.1.2.1.3).’ de açıklanmış olduğu şekildedir). Hücre sayımı sonrası elde etmek istediğimiz hücre sayısı değeri 5000 olarak belirlenmiştir. İstenilen 5000 hücre sayısı değeri hücre sayımından ortalama olarak elde edilen μ l değerine bölünür. Çıkan sonuç, hücre ekilecek olan 96 well plate’deki her kuyucuk başına 5000 hücre düşürmek için kullanılacak hücre örneğinin μ l değeridir. MPP⁺ kullanılmayacak olan kontrol grubu hücrelerinin dışında kalan MPP⁺ uygulaması olan hücre gruplarında, uygulanacak olan MPP⁺’nin μ l değeri ekilecek total hücre örneğinin μ l değerinden çıkarılarak ekim yapılır. Kontrol hücrelerine MPP⁺ yerine aynı miktar su eklenir. Kuyucuk başına 100 μ l olacak şekilde örneklerin üzeri uygun medium ile tamamlanır. Bu şekilde ekimi gerçekleştirilmiş hücreler tam 24 saat için etüve kaldırılır. MPP⁺ uygulaması için hücrelerin plate yüzeyine tutunarak sağlıklı bir şekilde çoğalmış olması beklenir. 24 saat tam olarak dolduktan sonra hücrelerin yoğunluğu, canlılık durumları ve morfolojileri mikroskop aracılığıyla kontrol edilerek daha önceden hesaplanmış olan MPP⁺ uygulama dozları belirlenen miktarlarda belirlenen kuyucuklara eklenir. Son olarak MPP⁺ ekimi de yapılmış olan hücre hatları bu şekilde tekrar 24 saat inkübasyon için etüve kaldırılır. Süre sonunda deney amacının gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemleyebilmek adına hücre canlılık testi olan MTT assay çalışması düzenlenir.

3.1.2.3 MTT testi

Tetrazolyum tuzları ile yapılan hücre canlılık testlerinden biri olan bu testte de elektron alarak indirgenen tetrazolyum tuzları formazan haline dönüşerek renk değişikliği yaratır. Bu olay yalnızca işlevini yerine getirebilen mitokondriler vasıtasıyla gerçekleşir ve işlevini yapabilen mitokondriler olması için canlı hücrelerin olmasına ihtiyaç vardır. Kısacası renk değişiminin görülmesi canlı hücrelerin varlığını belirler. MTT solüsyonunda bulunan bileşikler sarı renklidir ve renk dönüşümünden sonra ortaya mor renk çıkar. Mor renkli olarak ortaya çıkan formazan su ile çözünmeyen bir yapı olduğundan çözdürülmesi için DMSO (dimetil sülfoksit) kullanılır. Bu renk değişikliğinden mütevellit yapılan spektrofotometrik ölçümde canlı ve ölü hücrelerin oranları gözlemlenerek konsantrasyonları belirlenebilir.

96 well plate de ekilmiş ve MPP⁺ ile muamele edilmiş olan hücreler (tam 24 saat sonra) etüvden alınır. Kontrol hücreleri (MPP⁺ uygulaması olmayan) ve MPP⁺'nin bölüm 3.1.2.2'de, Tablo 3 ve Tablo 4'de belirtilen farklı dozlarıyla muamele edilmiş hücre örneklerinin üzerine 5 µl MTT solüsyonu eklenir, inkübatörde 1,5 saat boyunca inkübe edilir. Süre sonunda suda çözünmemesinden dolayı kristal şeklinde kuyucukların dibine çökmüş olan formazan tuzlarına dokunmadan üst fazdaki sıvıkısım atılır ve bu formazan tuzları üzerine 200 µl DMSO eklenerek dikkatli ve hassas bir şekilde pipetleme yapılarak homojenizasyon sağlanır. Böylece renk değişimi gözle de gözlenebilir. Bu işlem kısa süre içinde yapılarak ölçüm kalitesini etkilemesi engellenir. İşlem tamamlandıktan hemen sonra ölçüm alacağımız Multiskan spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyu ile ölçüm alınır. Ölçüm sonuç konsantrasyonları excell programı üzerinde hesaplanarak MTT ölçüm verilerinin grafiği çizilir. Böylece hücre hatları üzerinde MPP⁺'nin farklı dozlarındaki etkileri gözlemlenir. Hücre canlılığının azalması yönünde katkısı olan toksin oranları çalışmanın ilerleyen süreçlerinde bilgi vermiştir ve çalışma bu yönde sürdürülmüştür. N2A hücre hattı için kullanılan 500 µl MPP⁺ toksini çalışmada kullanılırken IHA hücre hattı için 1000 µl MPP⁺ toksini kullanılmıştır.

3.1.2.4 RİPA ile protein izolasyonu metodu

RİPA ile protein izolasyonu için öncelikle RİPA tamponunun hazırlığı yapılır. Çünkü tampon kendi içeriğinde herhangi bir inhibitör bulundurmaz. Tampon içine proteaz ve fosfataz inhibitörleri % 1 oranında sonradan katılarak hazırlanır (980 µl RİPA + 10 µl proteaz inhibitör + 10 µl fosfataz inhibitör). Hazırlanan tampon çalışma anına kadar buz üzerinde bekletilir.

RİPA tamponunun uygulanacağı kontrol hücreleri ve kimyasal ile muamele edilmiş olan hücreler konfluent durumdayken çalışmaya alınır. İlk olarak eski besiyerleri aspire edilerek uzaklaştırılır. Daha sonra bu adherent (yapışkan) hücrelerin üzerine iki defa 5'er ml soğuk olarak PBS eklenir ve yıkama işlemi gerçekleştirilir. Hücrelerin eski mediumundan tamamen arınmasının ardından çalışma öncesinde hazırlanmış olan RİPA tamponu 1 ml olarak hücrelere eklenir ve yüzeye iyice yayılması için petri içerisinde gezdirilir. Bu şekilde petri yüzeyi eşit bir halde tampon ile kaplanmış olur. Tampon eklenmiş petri buz üzerinde 15 dk kadar bekletilir (belli aralıklarla çalkalanır). Süre sonunda hücreler petri yüzeyinden hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırılıp 1,5'luk ependorf tüplere toplanır.

Son aşamada ependorf tüplerdeki hücre ekstraktları buz üzerinde tutulmasına dikkat edilerek santrifüj aşamasına alınır. 20 dk süre ile +4°C’de 1400 rpm hızla santrifüj edilir. İşlem sonrasında örneğin süpernatant kısmı alınarak –20 °C’de muhafaza edilir.

3.1.2.5 Protein Miktar Tayini için Bradford Tahlili

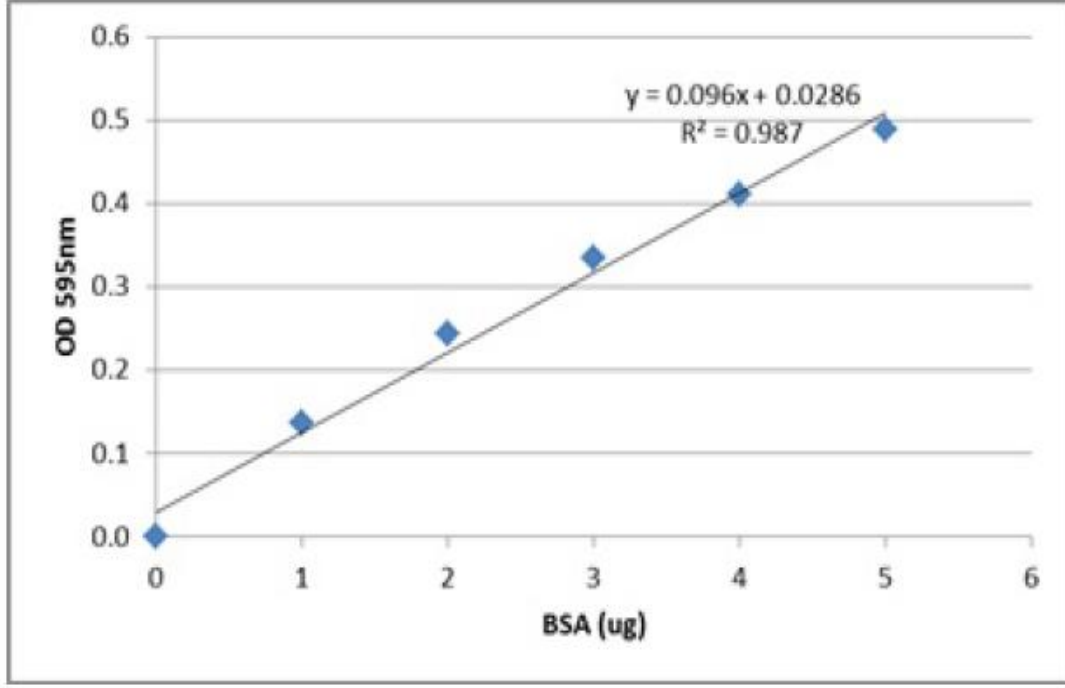
Bir çözeltilideki protein miktarını belirlemek için hızlı bir prosedürdür. Yöntem olarak protein varlığında mavi bir karışım oluşturan gelişmiş coomassie mavisi G reaktifi kullanılır. Mavi rengin yoğunluğu örnekteki protein miktarı ile orantılıdır ve 595 nm dalga boyundaki spektrofotometre ile kolayca ölçülebilir.

- 1) Her çalışma için 5X’lik solüsyondan dH₂O ile seyreltme yapılarak 1X çalışma solüsyonu hazırlanır (kullanımdan önce solüsyonun oda sıcaklığına gelmesi için beklenir).
- 2) Örnelerin hacmine ve beklenen konsantrasyonlarına göre protein standartları seyreltilir (Tablo 5).
- 3) Seyreltilmiş olan standartlar 96 kuyucuklu bir well plate’e çift yükleme şeklinde aktarılır.
- 4) Standart ve örnekleri içeren her kuyucuğa 100 µl 1X çalışma solüsyonu eklenir. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe etmek üzere hafifçe çalkalanır.
- 5) 595±20 nm’ de spektrofotometrede ölçüm alınır. Sinyal 1 saate kadar stabildir.

Tablo 5. Abcam (ab102535) Protein Quantitation Kit standart hazırlama tablosu (Bradford Assay'den alınmıştır)

Sıra no	Standart (µl)	H ₂ O (µl)	Final Konsantrasyonu(µg/ml)
1	0	50	0
2	5	45	100
3	10	40	200
4	15	35	300
5	20	30	400
6	25	25	500

96 well plate'e protokoldeki şekilde standartlar eklendikten sonra istenen örnekler de (hem kontrol örnekleri hemde kimyasal uygulanmış örnekler) dilüsyonları yapılarak belirlenen kuyucuklara 10 µl olacak şekilde yüklenir. Standart ve örneklerin bulunduğu bütün kuyucuklara protokolda de anlatıldığı şekilde 100 µl 1X'lik çalışma solüsyonu eklenir. Çalışma solüsyonunun örnek ve standartlarla homojen hale gelmesi için pipetleme yapılır. Ölçüm için cihaza yerleştirilir ve belirlenmiş olan dalga boyunda konsantrasyon değerleri ölçülür. Ölçüm sonrası elde edilen konsantrasyon değerleri protokolda verilen sonuç analiz grafiği baz alınarak excell programı üzerinde hesaplanır ve kullanılan örnekler için de değerler grafikleştirilir. Böylece örneklerin protein konsantrasyon değerleri verilirilmiş ve bu değerlere göre ilerleyen çalışmalarda kullanılacak protein konsantrasyonları da belirlenmiş olur. (Sonuç grafiği OD (Optical Density)/BSA (bovine serum albumin) oranıyla verilmiştir.) (Grafik R² değeri için $y=0.096x+0.0286$ denklemi kullanılır) (Şekil 9).



Şekil 9. Bradford Assay çalışması için referans alınan standart veri grafiği Abcam (ab102535) Protein Quantitation Kit Bradford Assay'den elde edilmiştir.

3.1.2.6 Western blot

Bradford assay sonucu elde edilen örnek konsantrasyonları baz alınarak western blot yürütme tankına yüklenecek protein miktarları totalde olması istenen 70 µg değerine oranlanarak hesaplanır. Hesaplanmış olan protein örneklerinin miktarları üzerine 5 µl (NYZ Tech-5X) loading dye (yükleme boyası) eklenerek karıştırılır. Kısaca bir santrifüj işleminden geçirilir. Santrifüjden alınan örnekler 96 °C'de ısınmış olan ısı bloğuna bırakılır ve 5 dk inkübe edilir. İnkübasyondan sonra tekrar buharla tüp çevresine yükselmiş olan örnek partikülleri için kısaca bir santrifüj işlemi yapılabilir.

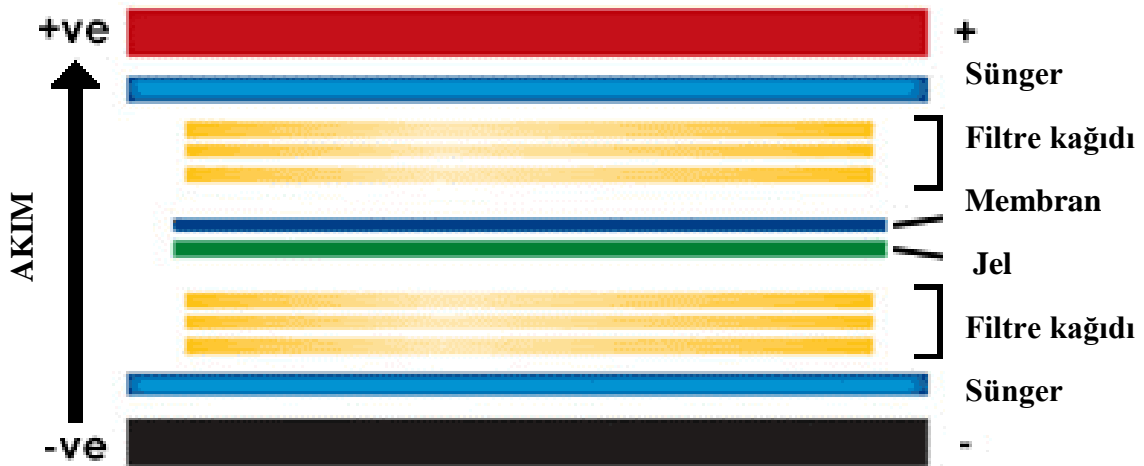
3.1.2.6.1. Yükleme ve yürütme (Jel Elektroföresi)

Çalışmada hazır jel kullanılacağı için önden bir jel hazırlığı yapılmaz. Hazır jel ambalajından dikkatli bir şekilde ele eldiven giyilerek açılır ve dokunulmamasına özen gösterilir. Jel tanka yerleştirilir ve sıkıştırılarak sabitlenir. Sonrasında santrifüjden alınan örnekler yükleme için jel kuyucuklarına belirlenen miktarlarda yüklenmeye başlanır.

Proteinlerin moleküler ağırlıklarını anlayabilmek adına örneklerle birlikte istenilen proteine özgü kDa bölgesini belirleyen marker (belirteç) da yüklenir. Çalışmada kullanılan protein GLT-1 (EAAT2) için bu bölge 62 kDa ve α -tubülin için 50 kDa olarak bilinir. Örnekler ve marker kuyucuklara yüklendikten sonra yürütme tankı içerisine önceden hazırlanmış olan yürütme tamponu belirli tank seviyesine göre dökülür. Tank güç kaynağına bağlanır ve 100V' da 1 saat 10 dk kadar yürütme işleminin gerçekleşmesi sağlanır.

3.1.2.6.2. Jelden membrana transfer

Örneklerin jelde yürütmesi bittikten sonra transfer tankının kasetinin hazırlanacağı küvete önceden hazırlanmış transfer tamponu dökülür. Transfer kaseti küvet içine yerleştirilir ve sırasıyla kaset içine siyah tarafından kırmızı tarafına doğru yerleştirilecek olan sünger, filtre kağıdı, yürütme sonrası elde edilen jel, membran, üzerine tekrar filtre kağıdı ve sünger konularak kaset kapatılır. Kaset içerisine hazırlanan bu gereçler transfer tamponuyla iyice ıslatılır. Bu şekilde kaset tanka siyah taraf siyaha kırmızı taraf kırmızıya gelecek şekilde yerleştirilir (Şekil 10). Tankın içerisi buz blokları ile desteklenir (hacim kaplaması ve sıcaklığa etkisi olması sebebiyle) ve transfer tamponu ile doldurulur. Güç kaynağına bağlanarak + 4°C' de 70- 90 V arasında 2 saat çalıştırılır.



Şekil 10. Western blot blotlama sandiviçi

3.1.2.6.3. Bloklama ve antikör uygulaması

Transfer süresi sonrasında transfer kasetinden çıkarılan membran (jelden örneklerin transfer gerçekleşmiştir) bir kaba alınarak üzerine önceden hazırlanmış olan bloklama tamponu membranın üstünü kaplayacak şekilde dökülür. 1 saat boyunca bir çalkalayıcı (shaker) cihazı üzerinde oda sıcaklığında inkübe edilir.

Süre sonunda primer antikör uygulaması için 1/1000 oranında (blok tamponu ve antikör oranı) EAAT-2 Poliklonal Rabbit Antikoru membranın bulunduğu bloklama tamponuna eklenir. Tekrar çalkalayıcı üzerine alınarak + 4°C' de gece boyu bekletilir (en az 16 saat).

3.1.2.6.4. Yıkama (Wash) aşamaları

Ertesi gün gece boyu bloklama tamponu ile antikorda bekletilmiş olan membranın bloklama tamponundan arındırılması için önceden hazırlanan yıkama tamponu ile yıkaması gerçekleştirilir. Membranın içinde bulunduğu bloklama tamponu dökülerek kaba yıkama tamponu eklenir ve bu işlem 3 kez 5'er dk süresince çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilir.

3.1.2.6.5 Bloklama ve ikincil antikör uygulaması

Yıkaması gerçekleştirilen membranın üzerine tekrar bloklama tamponu eklenerek 1/2000-1/5000 oranında sekonder antikör ilave edilir ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat süre ile inkübe edilir. Kullanılan sekonder antikör, Anti-Rabbit IgG-HRP'dir. Süre sonunda membran tekrar yıkama işlemine tabi tutulur (3 kez 10'ar dk).

Görüntüleme; ikincil antikorda bulunan enzim için substrat içeren ECL solüsyonu kullanılarak oluşan kimyasal reaksiyon sonucu görüntüleme alınır. ECL solüsyonu eklendikten sonra örnekler karanlık ortamda 5 dk bekletilir. Enzim substrat reaksiyonunda ortaya çıkan ışımaya kemilüminesans yöntemi ile UVP görüntüleme cihazında görüntülenir.

3.1.2.6.6. Stripping uygulaması (uzaklaştırma tamponu uygulaması)

Görüntüleme sonrası membran üzerine önceden hazırlanmış olan strip tamponu eklenir ve 1-1,5 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir. Bu işlem membranın üzerinde ilk kullanılmış olan birincil ve ikincil antikordan uzaklaştırılmasını ve birden fazla proteini tek blot üzerinde göstermek için avantaj sağlar.

Süre sonunda membranı yıkama işlemi yapılır (3 kez 5'er dk). Yıkama sonrası bloklama tamponu ile 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilir. Daha sonra bloklama tamponuna 1/5000 oranında primer α -tubulin antikoru eklenir. Çalkalayıcı üzerinde 16 saat + 4°C' de bekletilir. Ertesi gün yıkama işlemi gerçekleştirilir ve tekrar bloklama tamponu ile sekonder antikoru eklenerek 2 saat çalkalayıcıda inkübe edilir. Süre sonunda 3 kez 10'ar dk yıkama yapılarak ECL solüsyonu ile görüntüleme alınır.

3.1.2.6.7. Western blot için tampon çözeltiler (buffer)

Yürütme tamponu; stok olarak 10X tampon hazırlanır (1 lt). Bu tampondan her kullanım için ayrıca 1X tampon hazırlanır.

10X tampon için; Tris-base: 30.3 gr, Glisin: 144 gr, SDS (sodyum dodesil sülfat): 10gr toplam karışım dH₂O (distile su) ile 1000 ml' ye tamamlanır. Bu karışımdan 100 ml örnek alınarak üzerine 900 ml dH₂O eklenir ve 1X tampon kullanılmak üzere hazırlanır.

Transfer tamponu; 3,03 gr Tris-base (25mM), Glisin: 14,4 gr, Methanol: 200ml, % 10 SDS: 2ml toplam karışım dH₂O ile 1000 ml' ye tamamlanır.

TBS (Tris-buffered saline) 1X'lik tampon hazırlığı; Tris-HCL: 6,05 gr NaCl: 8,76 gr karışımı hazırlanarak pH metre aracılığı ile karışımın pH değeri ölçülür. Tampon için gerekli olan pH değeri 7,6'dır. Tampona uygun pH değerini elde edebilmek için ölçülen karışım asidik ise (<7) NaOH, bazik ise (>7) HCL eklenir.

Yıkama tamponu; 1000 ml TBS + 1 ml % 0,1'lik Tween-20 karıştırılarak hazırlanır. Uzaklaştırma tamponu (Stripping Buffer); % 2 SDS: 200 ml, Tris (pH:6,7): 62,5 ml, β -Mercaptoethanol: 350 μ l / 50 ml, karışım dH₂O ile 1000 ml' ye tamamlanır.

Bloklama tamponu; % 5 için 5 gr süt tozu TBS içerisinde çözülerek hazırlanır. Her çalışma için taze hazırlanmasına dikkat edilir.

Ponceau S boya çözeltisi; 0,1 gr ponceau S boyası ve 5 ml asetik asit karışımları dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.

3.1.2.7. RNA izolasyonu

İzolasyonunu gerçekleştireceğimiz hücrelerimizin bulunduğu 10'luk petri kapları etüvden alınarak eski mediumları aspire edilir. PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra her petriye 1 ml RiboExTM eklenir. 2-3 dk bekletildikten sonra hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyinden hafifçe toplanır.

5 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 14.000 rpm de +4°C de 10 dk-boyunca santrifüj edilir.

Elde edilen ürünün süpernatant kısmı yeni bir ependorf tüpe aktararak üzerine 200 µl kloroform eklenir. Bu karışım 15 sn kadar vortekslenir ve inkübasyon için 2 dk oda sıcaklığında bekletilir.

İnkübasyon sonrası 14.000 rpm hızla +4°C' de 15 dk boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Tekrar süpernatant kısım yeni ependorfa alınır. Süpernatant üzerine 500 µl izopropil alkol eklenip homojenize edilir ve 3-5 defa nazikçe ters düz edilir.

Hazırlanan örnekler 10 dk kadar oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 14.000 rpm hızla + 4°C de 10 dk boyunca santrifüj edilir. Bu kez süpernatant kısım atılır. Elde edilen pelet kısım total RNA' nın bulunduğu kısımdır. Elde ettiğimiz bu RNA örneğimiz en az 30 dk en fazla ise gece boyu -20 °C' de muhafaza edilir. Daha sonraki aşama olarak bu RNA örneğimizin yıkama işlemi gerçekleştirilir. -20 °C' den alınan örnek üzerine 1 ml %75'lik etanol eklenerek işleme başlanır. 14.000 rpm hızla 5 dk santrifüj edilir ve dikkatli bir şekilde süpernatant kısım alınıp atılır. Kalan pelet kısmının ise alkolden arınması için ependorf kapağı açık bırakılarak 5 dk hava ile teması sağlanır ve kurutulur. Kurumuş olan pelet üzerine 30 µl RNaz bulundurmeyen steril su eklenerek çözdürülür. Çözdürülmüş olan bu son ürün 10-15 dk kadar 56 °C' de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası elde edilmiş olan RNA örneklerimiz -80 °C' de muhafaza edilir.

Elde etmiş olduğumuz RNA örneklerinin konsantrasyonlarını ve saflığını ölçebilmek için nanodrop ölçüm cihazı kullanılır. Bir nükleik asit örneği kullanıldığı için 260 nm dalga boyunda absorbans alınır. 230 nm dalga boyundaki absorbans sonuçları örneklerde kontaminasyon bulunduğunu gösterir. 260/230 oranı nükleik asitler için saflığı belirler ve RNA ölçümleri için ~ 2,0 olarak belirtilir.

3.1.2.8. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için kullanılan WizScript™ cDNA Sentez Kiti (yüksek kapasiteli) içerikleri;

-WizScript™ RTase (reverse transcriptase)

-10X Reaction Buffer

-RNase Inhibitor (ribonükleaz inhibitör)

-20X dNTP mix

-Random hexamer (rastgele primerler)

-RNase free water

cDNA'nın RNA şablonlarından verimli bir şekilde sentezlenebilmesi için kullanılan kitte rekombinant ribonükleaz inhibitör RNA şablonunu etkili bir şekilde korur. Çalışma standart protokole uygun bir şekilde gerçekleştirilir. Toplam 10 ng ~ 5 µg miktarındaki RNA için 2X'lik reaksiyon karışımı totalde 10 µl olarak hazırlanır. Biz çalışmamız için 1 µg total RNA kullandık.

2X'lik reaksiyon içeriği;	10X Reaction Buffer:	2 µl
	20X dNTP mix:	1 µl
	Random hexamer:	2 µl
	WizScript™ RTase:	1 µl

RNase Inhibitor: 0,5 µl

RNase free Water: 3,5 µl

Total olarak 10 µl olan reaksiyon karışımı çalışmaya alınıncaya kadar buz üzerinde bekletilir.

İkinci hazırlıkta da bu 2X'lik reaksiyon karışımının üzerine kullanılacak RNA örneklerinden 10 µl ekleyerek pipetleme yapılır. Ardından düşük devirli kısa süreli bir santrifüj yapılır. Son olarak inkübasyon dört adım takip edilerek 25°C' de 10 dk, 37°C' de 120 dk, 85°C' de 5 dk ve -20°C' de uzun süreli olarak gerçekleştirildi.

3.1.2.9. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR-Kantitatif PCR)

Hedeflenmiş olan bir DNA molekülünü fazla miktarda elde edebilmek ve aynı zamanlı olarak ölçüm alabilmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte DNA bağlayıcı boyalar reaksiyonu izlemek için floresan haberciler olarak ışığa ile yol gösterirler. Bu floresan ışınması her DNA çoğaltılması döngüsünde ürün birikimiyle artar.

Floresans ölçümleri baz alınarak yapılan bir çalışmadır. Floresan sinyalinin alınabilmesi için çalışma karışımının içerisine ışımaya verici solüsyonlar/boyalar (sybr-green vb.) eklenir. Kullanılan boya çalışılan örnek ile bağlanarak örnek miktarı arttıkça ortama daha fazla floresan ışımaya yayar. Çoğaltılan örnek ile doğru orantılı bir şekilde artan floresan ışımaya solüsyon sayesinde çalışma sırasında örneklerin saptanması da herhangi bir ek çalışmaya ihtiyaç duyulmadan kısa sürede yapılabilir. Çalışma esnasında sıcaklık, süre ve çalışma programı aynı zamanlı olarak izlenebilir.

Reaksiyon karışımının hazırlanması için kullanılan RealAmp™ SYBR qPCR Master mix protokolüne uyularak deney düzeneği kurulmuştur.

Kullanılan bileşenler;

2X SYBR qPCR Master mix (2X konsantrasyonda) : 10 µl

Kullanılacak DNA örneği : ~0.5-10 % cDNA

Forward primer : 0.2 ~ 1

Reverse primer : 0.2 ~ 1

Nuclease free water : karışım 20 µl' ye tamamlanır.

Biz çalışmamızda cDNA üretmek için 1 µg RNA örneği kullandık.

Kullanılan örneklerin primer sekansları;

GLT-1 forward AACAAATATGCCCAAGCAGGT

GLT-1 reverse CTCCCAGGATGACACCAAAC

β-aktin forward AACTGGGACGACATGGAGAA

β-aktin reverse GAAGGTCTCAAACATGATCTG

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örneklerin yükleneceği PCR plate/plaka kurulumu aşamasına geçilir. Reaksiyon karışımı her bir örnek başına 20 µl olacak şekilde hazırlanarak PCR plate/plaka kuyucuklarına eşit ve homojen şekilde dağıtılır. PCR plate/plaka üzeri şeffaf bir filmle kapatılır ve kuyucuklardaki hava kabarcıkları kısa süreli santrifüjlenerek yok edilir.

Aynı zamanda örnekler için standart olması adına dört referans (R1, R2, R3, R4) kullanılır. Referanslar seri dilüsyon yöntemi kullanılarak dilüe edilir. Referans R1 20 µl hazırlanan cDNA örneğinin 180 µl dH₂O ile tamamlanması sonucu hazırlanır. Devamındaki referanslar; R1'den 50 µl alınan örnek 150 µl dH₂O ile tamamlanarak R2, R2'den 50 µl alınan örnek 150 µl dH₂O ile tamamlanarak R3, R3'den 50 µl alınan örnek 150 µl dH₂O ile

tamamlanarak R4 şeklinde oluşturulur. Hazırlıklar tamamlandıktan sonra PCR programlaması ayarlanır.

PCR programlaması için başlıca qPCR çalışma prensibi şöyledir;

İlk basamak çift zincirli DNA' yı ayırıp tek zincirli hale getirmek için örneklerin yüksek sıcaklığa (95°C) maruz bırakılmasıdır. Bu sıcaklık PCR'da kullanılan Taq polimeraz enziminin dayanabileceği en yüksek sıcaklık olarak genellenir. Bu aşama 'Denatürasyon' olarak isimlendirilen basamaktır.

İkinci basamak ise tek zincirli halde bulunan DNA molekülüne kullanılan primerlerin bağlanma aşamasıdır. 'Annealing/Bağlanma' olarak isimlendirilir. Kullanılan sıcaklık değeri 60 °C'dir. Bu aşamada Taq polimeraz enzimi işlemi başlatıp dNTP'lerin DNA'ya bağlanmasında ve uzamaya geçmesi aşamasında önemlidir.

Son basamak dNTP'lerin bağlanmış olduğu DNA dizisinin uzaması aşamasıdır. 'Extension/Uzama' olarak isimlendirilir. Burada kullanılan sıcaklık değeri 72 °C'dir.

Bütün bu basamakların gerçekleşmesi sırasında reaksiyon karışımı içerisinde bulunan, floresan ışıklı boyanın örneklerle birleşimi sonucu elde edilen sinyal oluşumu ile örnek (cDNA) konsantrasyonlarının belirlenmesi sağlanır. Basamaklar yaklaşık 35-45 döngü olacak şekilde gerçekleştirilir. Çoğaltılacak olan örnek (cDNA) miktarının döngüdeki ilk önemli artışı döngü eşik değerini (C_T threshold cycle) verir. Eşik elde edebilmek için ihtiyaç duyulan döngü sayısı 'threshold cycle' ya da C_T değeri olarak isimlendirilir.

Kullanılan qPCR programlaması;

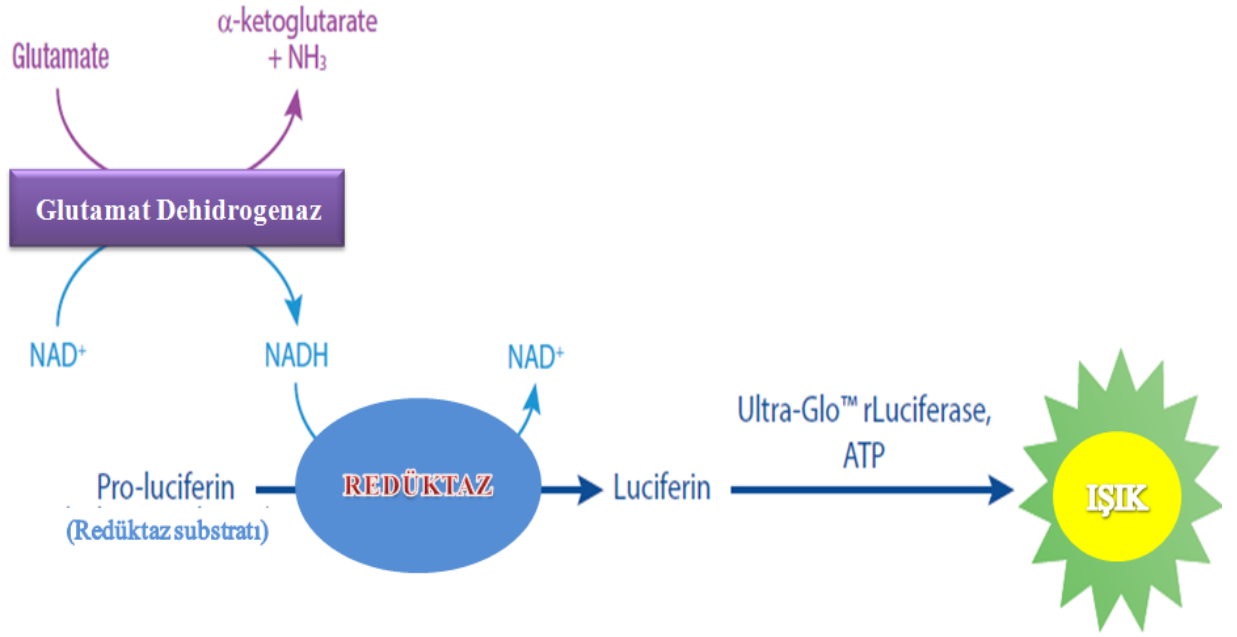
<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	
95°C	10 dk	
95°C	15 sn	} 45 döngü
60°C	20 sn	
72 °C	30 sn	
4 °C	∞	

3.1.2.10. Glutamat assay

'The Glutamate-Glo™ Assay' kiti kullanılmıştır. Glutamate-Glo™ Assay, memeli hücre kültürü ortamındaki glutamat konsantrasyonlarının değişikliklerini ölçmek için kullanılır. Bu testte kullanılan örneklerdeki glutamatın hızlı, seçici ve hassas bir şekilde

algılanması için biyoluminesans ölçüm sistemi kullanılır. Bir biyoluminesan NADH tespit ile glutamat oksidasyonunu ve NADH üretimini eşleştirir.

Glutamat dehidrojenaz, α -ketoglutarat ve NADH üretmek için glutamat ve NAD^+ kullanır. NADH varlığında, bir pro-luciferin Redüktaz Substratı, Redüktaz tarafından, daha sonra ışık üretmek için Ultra-Glo™ Rekombinant Luciferase tarafından kullanılan bir luciferin'e dönüştürülür (Şekil 11).



Şekil 11. Glutamate-Glo™ Assay prensibinin şematik diyagramı (The Glutamate-Glo™ Assay' den birebir kullanılmıştır)

Glutamat dehidrojenaz, glutamatın NAD^+ 'nın NADH 'ye indirgenmesiyle oksitlenmesini katalize eder. NADH varlığında Redüktaz enzimatik bir pro-luciferin Redüktaz Substratını luciferin'e indirger. Luciferin, Ultra-Glo™ rLuciferase ve ATP kullanılarak bir lusiferase reaksiyonunda tespit edilir ve üretilen ışık miktarı, numunedeki glutamat miktarıyla orantılıdır.

Bölüm 3.1.2.1.3'deki şekilde anlatıldığı gibi hücre sayımı ve ekimi yapılır. Ertesi gün mediumları değiştirilen hücrelerin MPP^+ ile muamelesi bölüm 3.1.2.2'de belirtildiği üzere yapılır. Kontrol ve MPP^+ muamelesi yapılacak olan bütün örnekler sayısınca 1,5'luk endorflar içine 98 μl PBS eklenir (daha uzun süreler inkübasyon sağlanabilmesi için). Deney dört farklı saat aralıklarında gerçekleştirilir. MPP^+ uygulaması yapılır yapılmaz

hemen örneklerden 2'şer µl alınarak önden hazırlanmış ve içinde 98 µl PBS bulunan ependorflara eklenir ve -20 °C' ye kaldırılır. Bu sonuç 0. saat olarak işaretlenecektir.

Daha sonra örnekler tekrar etüve tam 12 saat için inkübasyona bırakılır. Süre sonunda etüvden alınan örnekler ikinci düzenek için yeniden hazırlanan içinde 98 µl PBS bulunan ependorflara 2'şer µl alınarak eklenir ve -20 °C' ye kaldırılır. Bu sonuç 12. saat olarak işaretlenecektir.

Örnekler tekrar etüve 24. saat inkübasyonu için bırakılarak süre sonunda üçüncü düzenek için yeniden hazırlanan içinde 98 µl PBS bulunan ependorflara 2'şer µl alınarak eklenir ve -20 °C' ye kaldırılır.

Son olarak etüve alınan örnekler 48. saat inkübasyonu için bekletilir. Süre sonunda işlemler dördüncü düzenek için tekrarlanır.

Tablo 6. Glutamat ölçümü için reaktif solüsyonunun hazırlığı

Bileşenler	Reaksiyon Başına Kullanılacak Miktar	5ml' de kullanılacak miktar
Luciferin Detection Solution	50µl	5ml
Reductase	0.25µl	25µl
Reductase Substrate	0.25µl	25µl
Glutamate Dehydrogenase	1.0µl	100µl
NAD	1.0µl	100µl

Tablo 6'da belirtilen karışım bileşenleri Luciferin hariç buz üzerinde tutulur. Kit içerisinde ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılması için 10 mM'lık 50 µl Glutamat bulunur.

Glutamat assay için özel olarak beyaz plate (biyoluminesans ölçüme uygun) kullanılır. -20°C' de muhafaza edilen bütün örneklerden beyaz plate kuyucuklarına 50 µl olarak saat düzeneklerine uygun şekilde aktarılır. Önden hazırlanmış olan Glutamat Reaktif Solüsyonundan da örnekler üzerine 50 µl eklenir. Örnekler dışında boş bir kuyucuğa pozitif

kontrol olması için glutamat eklenir. Plate elle 30-60 sn kadar çalkalanır ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Süre sonunda lüminesans cihazında ölçüm alınır.

3.2 İstatistik

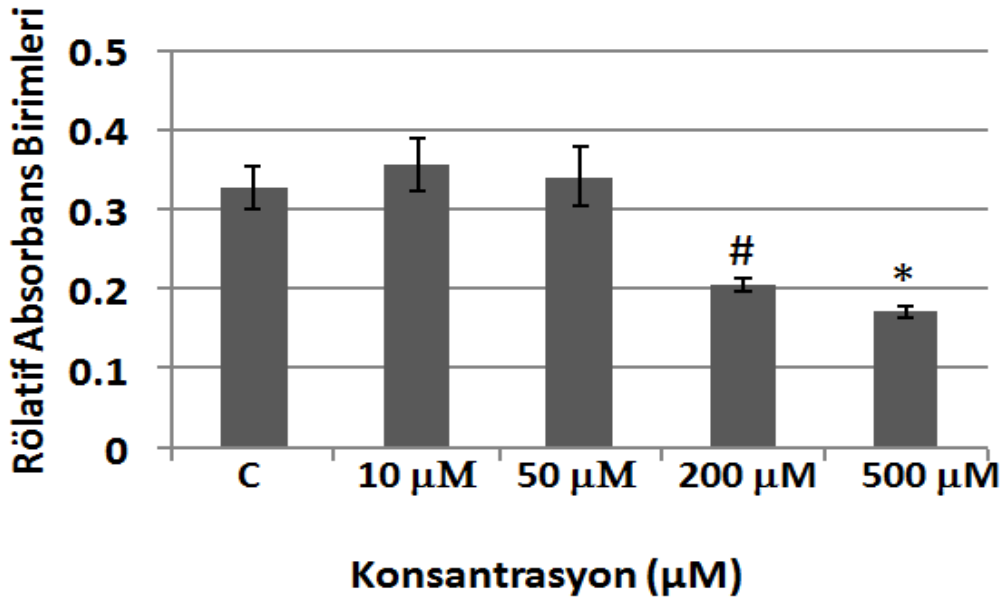
Çalışma sonuçlarının istatistiksel analizleri için Prism 5-GraphPad Software (Inc. San Diego, USA) kullanıldı. İki grup arasındaki ortalama farkın anlamlı olup olmadığını belirlemek adına kullanılan bir analiz tekniği olan t-test (parametreleri için tür eşit ise eşleştirilmemiş ve iki örnekle eşit olmayan varyans) veriler üzerine uygulandı. Çalışmada anlamlı olan farklar * $p < 0.05$ değeri ile belirtildi ve hata çubukları SEM (ortalamanın standart hatası) ile belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. MTT Testi Ölçüm Sonuçları ve Değerlendirilmesi

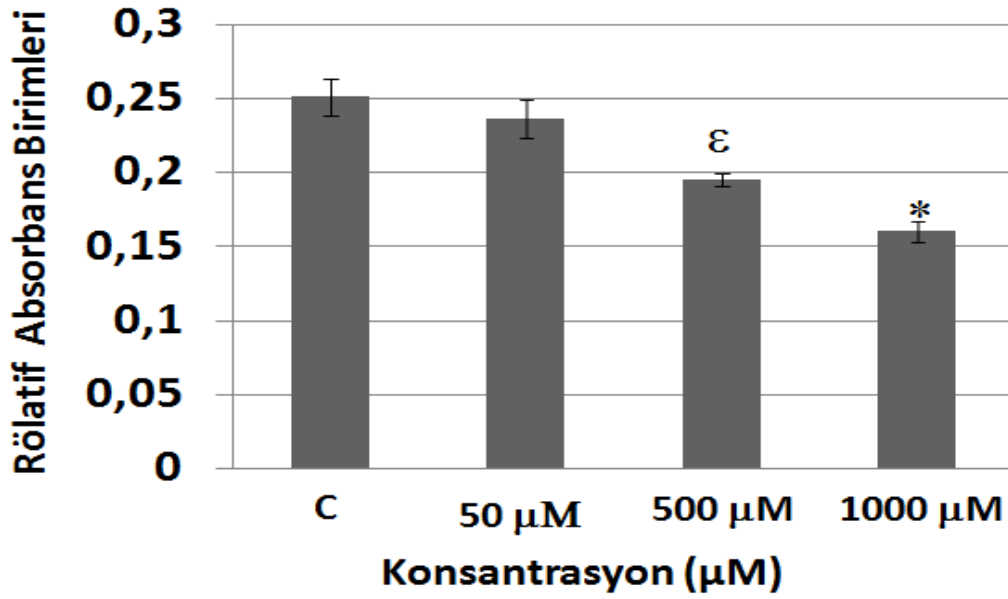
MPP⁺'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini gözlemleyebilmek adına yapılan bu çalışmada, kullanılan iki farklı hücre hattı 24 saat boyunca 10 µM, 50 µM, 200 µM ve 500 µM, 1000 µM dozlarındaki MPP⁺ ile muamele edilir ve MTT testi uygulanır. İstatiksel olarak anlamlı fark gösteren örnek çalışmaları * ya da # işareti ile belirtilmiştir. Hata çubukları SEM'i (Standard Error of the Mean) göstermektedir.

N2A hücrelerinde, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş 200 µM (Kontrol ve 200 µM için #p=0,002502<0.05) ve 500 µM (Kontrol ve 500 µM için *p=0,000661<0.05) gözlenmiştir. Bundan sonraki deneylerde 500 µM kullanılmaya karar verilmiştir (Şekil 11).



Şekil 12. N2a hücreleri üzerinde MPP⁺ uygulamasının hücre canlılığına olan etkisi #p=0,002502<0.05 , * p=0,000661<0.05

IHA hücrelerinde, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş 500 μM (Kontrol ve 500 μM için $\epsilon p=0,002718<0.05$) ve 1000 μM (Kontrol ve 1000 μM için $*p=0,000374<0.05$) gözlenmiştir. Bundan sonraki deneylerde 1000 μM kullanılmaya karar verilmiştir (Şekil 12).



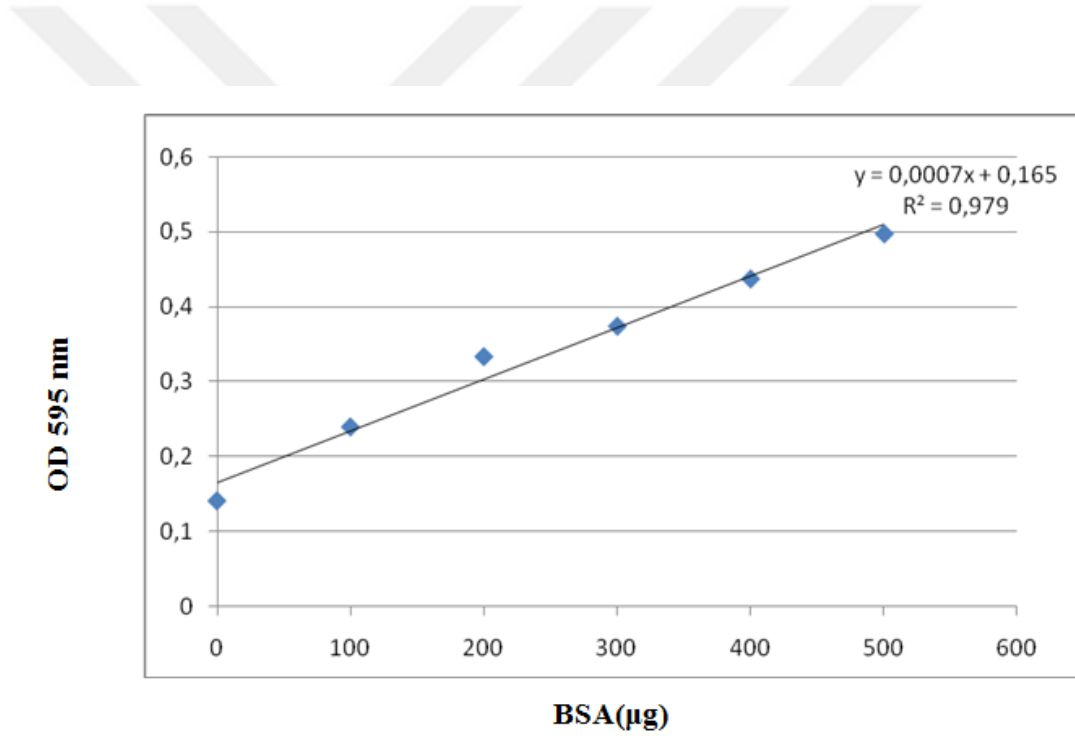
Şekil 13. IHA hücreleri üzerinde MPP⁺ uygulamasının hücre canlılığına olan etkisi

$\epsilon p=0,002718<0.05$, $*p= 0,000374<0.05$

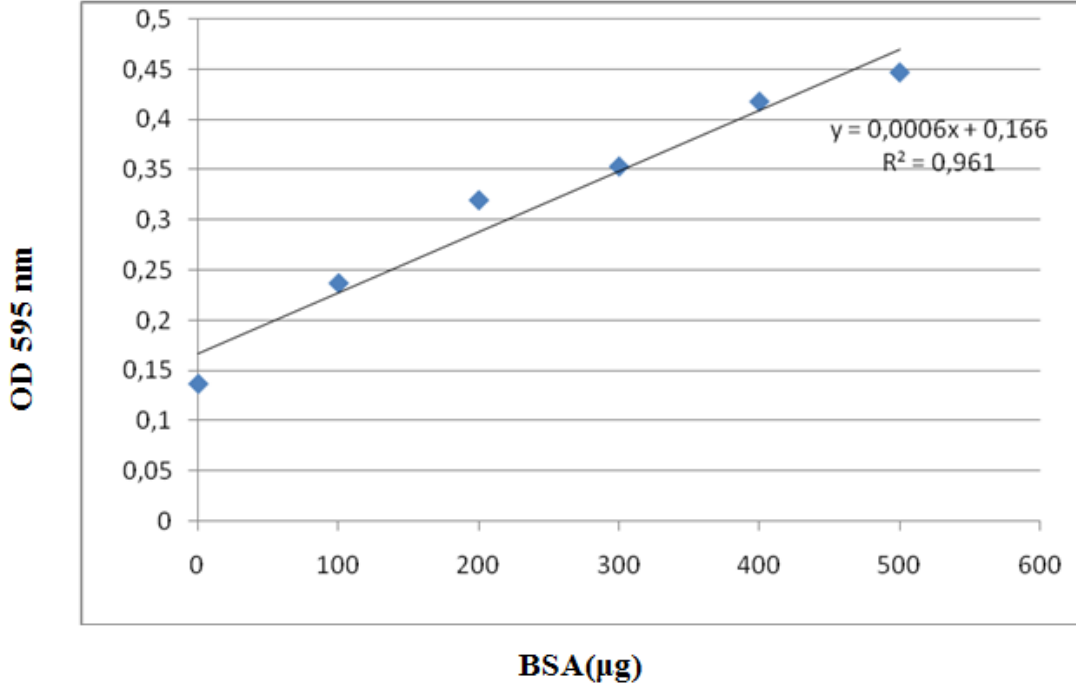
4.2. Western Blot Çalışma Sonuçları ve Değerlendirilmesi

4.2.1 Bradford Tahlili Ölçüm Sonuçları, Grafikleri ve Değerlendirmeleri

Abcam Protein Quantitation Kit protokolüne göre hazırlanmış olan çalışmada protein miktar hesaplamaları 595 nm dalga boylu spektrofotometre ölçüm sonuçlarına göre değerlendirilerek yapılır. OD (Optical Density)/BSA (bovine serum albumin) oranlaması protokoldeki R^2 denklemi kullanılarak grafik üzerinde gösterilir. İki hücre hattı için de protokole göre hazırlanan standart değerlerinin grafik üzerindeki doğrusal eğrileri Şekil 13 ve 14 de gösterildiği gibidir.



Şekil 14. N2a hücrelerinin bradford tahlilindeki standart veri grafiği



Şekil 15. IHA hücrelerinin bradford tahlilindeki standart veri grafiği

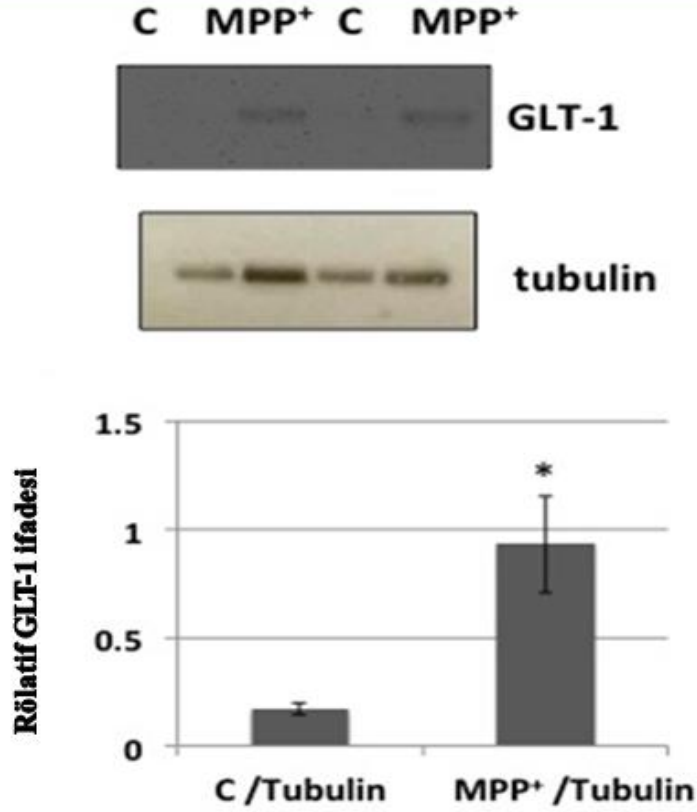
Çalışma denklem sonuçlarına göre hesaplanan örnek konsantrasyonları Western Blot jel yüklemesi için kullanılacak protein miktarlarının µg/µl değerlerini verir.

4.2.2. Western Blot Çalışması İle Hücre Hatlarındaki GLT-1 Proteininin belirlenmesi

Kontrol ve MPP⁺ ile muamele edilmiş hücre hatlarından protein izole edildi. Bradford tahlili ile hücre hatlarındaki GLT-1 protein miktarlarının tayin edilmesinin ardından Western Blot için her kuyucuğa 70 µg protein olacak şekilde oranlanarak jele yükleme yapıldı. Ortaya çıkan membran görüntülerinden Image J programı kullanılarak kuantifikasyon yapıldı (Şekil 15).

N2a hücre hattı için yapılan çalışmada GLT-1 protein bantları membran üzerinde tespit edilememiştir. Sonuç olarak N2a hücre hattı için GLT-1 mRNA seviyelerini hem kontrol hücre gruplarında hem de MPP⁺ uygulanmış hücre gruplarında saptayabilmek adına qPCR çalışması planlanmıştır.

Kontrol ve MPP⁺ ile muamele edilmiş IHA hücre hattındaki GLT-1 protein ifadesi ve kuantifikasyonu Şekil 15'te gösterilmiştir ve GLT 1 ifadesinin MPP⁺ uygulaması ile arttığı burada görülmektedir.



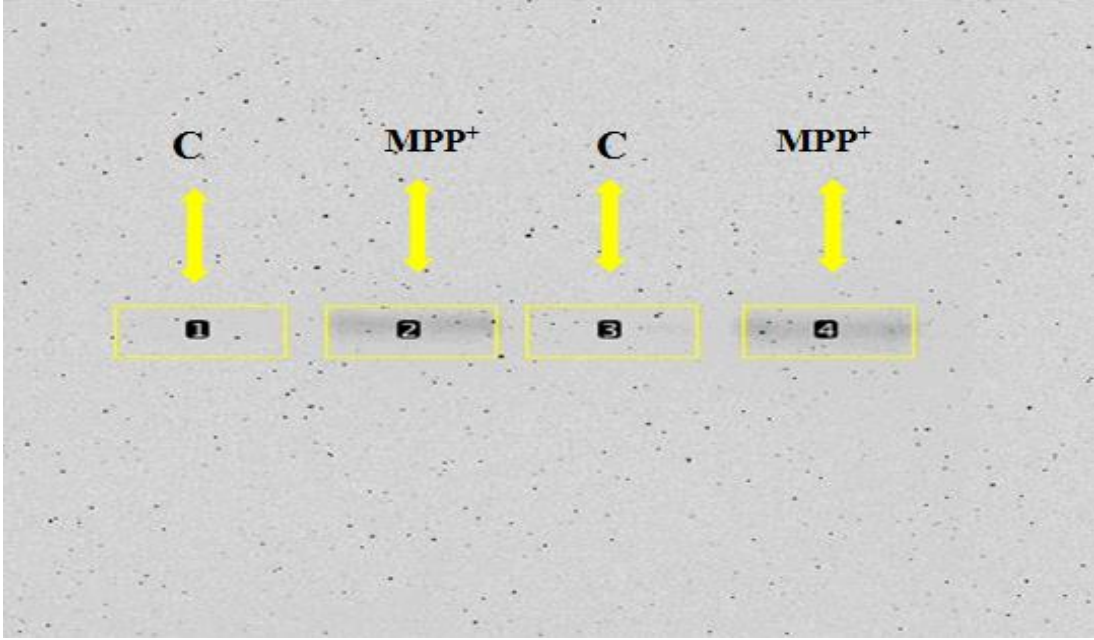
Şekil 16. Kontrol ve MPP⁺ ile muamele edilmiş IHA hücre hattında GLUT-1 ifadesi ve kuantifikasyonu. C:kontrol hücreleri, MPP⁺ : MPP⁺ toksin uygulanmış hücreler, C/Tubulin ve MPP⁺/ Tubulin: GLUT-1 ifadesinin Tubuline oranı *p=0,0390<0.05

4.2.3 Western Blot Çalışmasının Ardından Elde Edilen Bantların Kuantifikasyonu

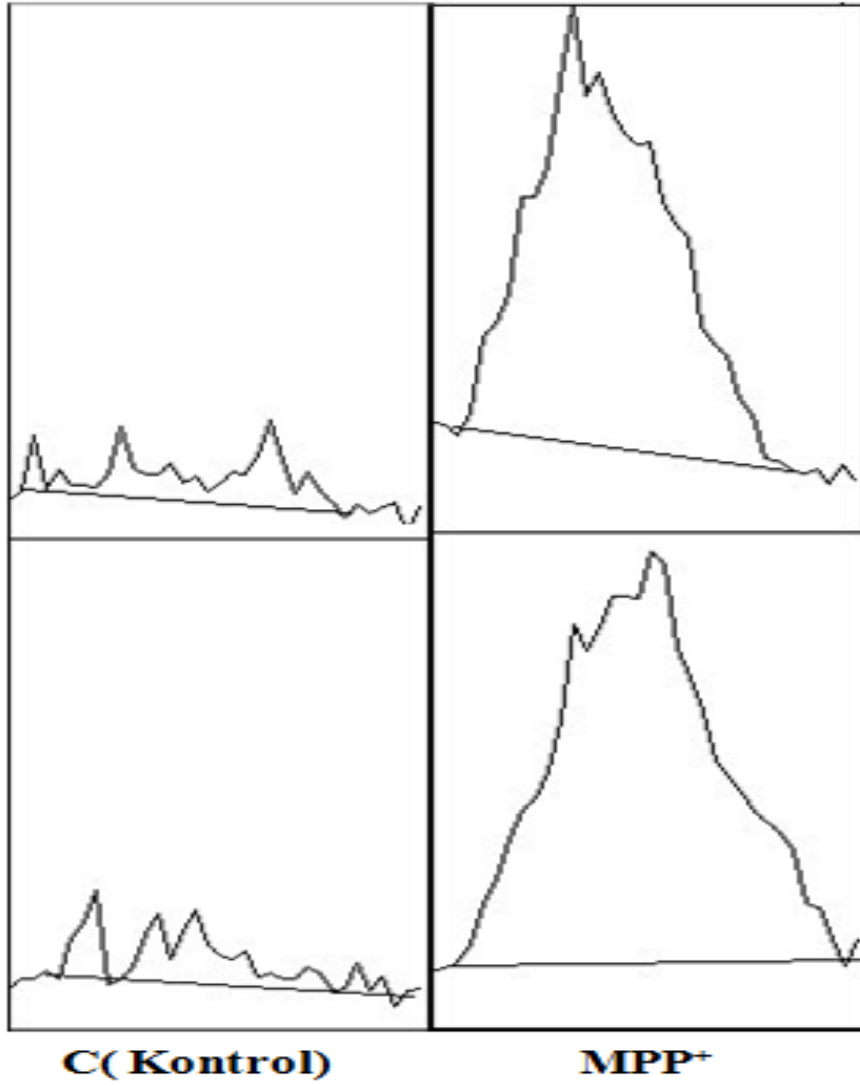
Tablo 7. GLUT-1 ve Tubulin protein bantlarına karşılık olan kuantifikasyon değerleri. (C: kontrol hücreler, MPP⁺: toksin uygulanmış hücreler)

	GLT-1	Tubulin	GLT-1/Tubulin	Örnek	Ortalama
C (kontrol)	1,230,054	6,254,267	0,19667437		
MPP ⁺	9,683,439	13,719,48	0,70581677	C (kontrol)	0,16755885

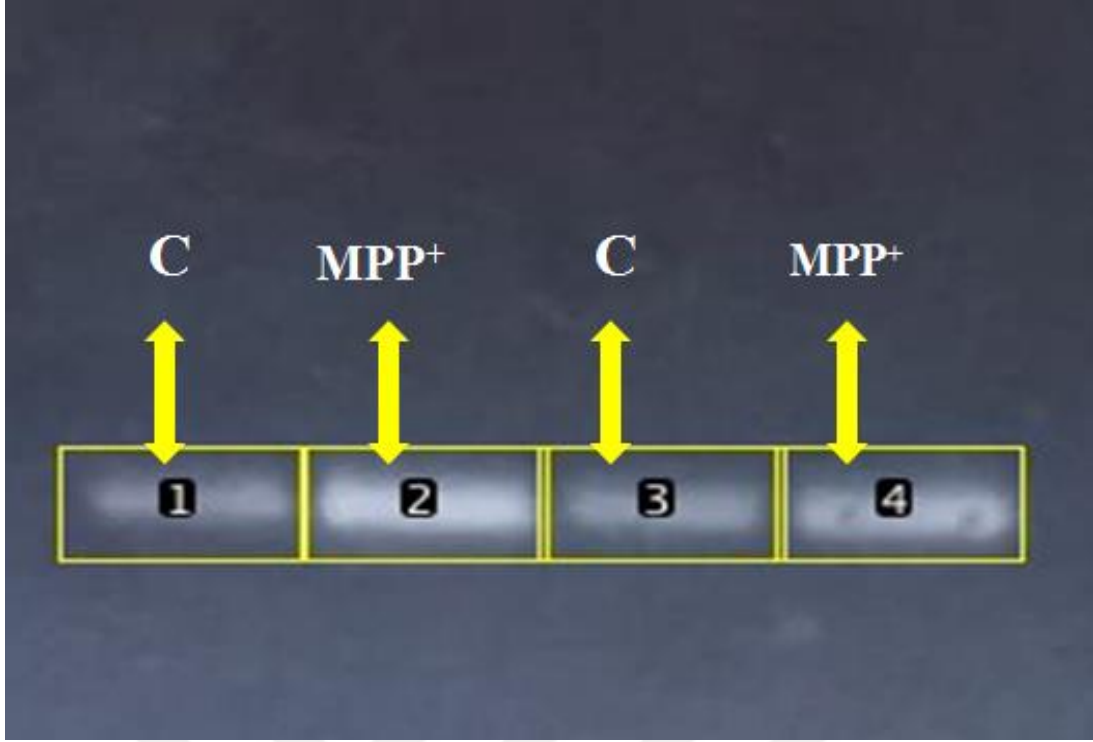
C (kontrol)	1,011,669	7,307,459	0,13844334	MPP⁺	0,93051497
MPP⁺	11,929,146	10,326,359	1,15521318		



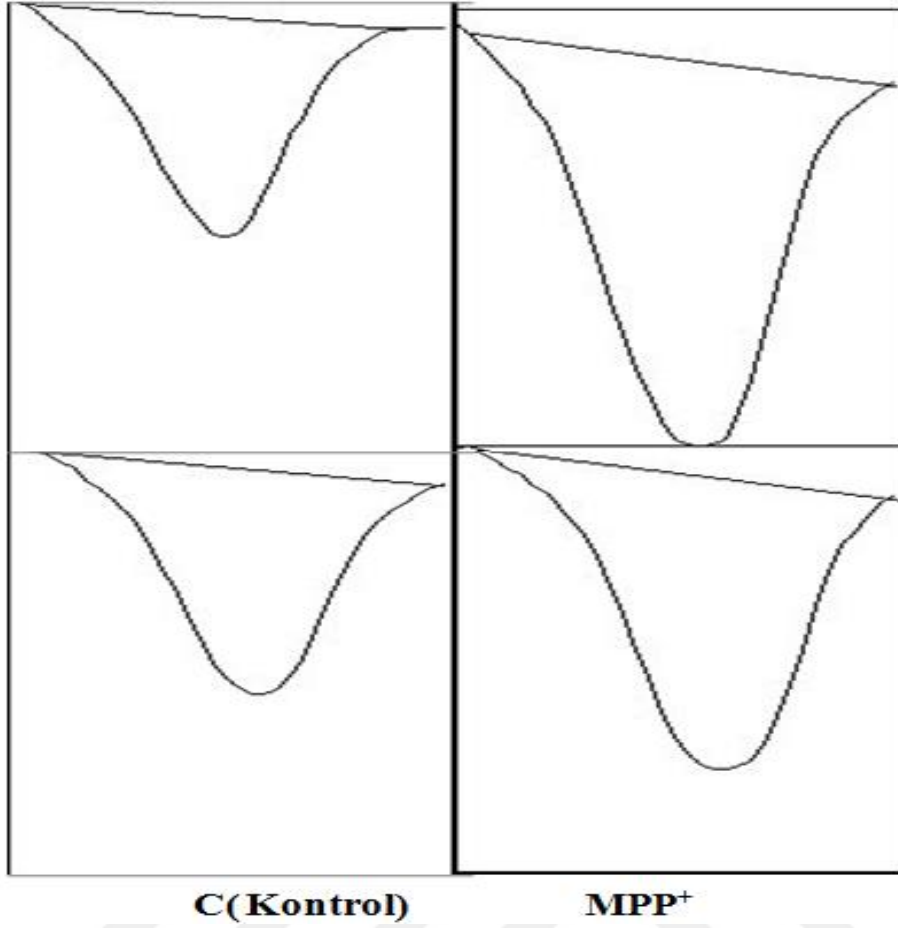
Şekil 17. IHA hücre hattında western blot ile elde edilen GLT-1 bantlarının Image J programı ile belirlenmesi. (C: kontrol hücreler, MPP⁺: toksin uygulanmış hücreler)



Şekil 18. Şekil 16’da belirtilen bantlar için tepe (peak) grafikleri (C: kontrol hücreler, MPP⁺: toksin uygulanmış hücreler) Üstteki kontrol tepe grafiği 1. kuyucuktaki kontrol örneğine, alttaki kontrol tepe grafiği 3. kuyucuktaki kontrol örneğine aittir. Üstteki MPP⁺ tepe grafiği 2. kuyucuktaki MPP⁺ örneğine, alttaki MPP⁺ tepe grafiği 4. kuyucuktaki MPP⁺ örneğine aittir.



Şekil 19. IHA hücre hattında western blot ile elde edilen Tubulin bantlarının Image J programı ile belirlenmesi. (C: kontrol hücreler, MPP⁺: toksin uygulanmış hücreler)



Şekil 20. Şekil 18’de belirtilen bantlar için tepe (peak) grafikleri (C: kontrol hücreler, MPP⁺: toksin uygulanmış hücreler) Üstteki kontrol tepe grafiği 1. kuyucuktaki kontrol örneğine, alttaki kontrol tepe grafiği 3. kuyucuktaki kontrol örneğine aittir. Üstteki MPP⁺ tepe grafiği 2. kuyucuktaki MPP⁺ örneğine, alttaki MPP⁺ tepe grafiği 4. kuyucuktaki MPP⁺ örneğine aittir.

4.3. Real Time (Gerçek Zamanlı) veya QPCR (Kantitatif PCR) Sonuçları

Çalışma için ekilmiş, çoğaltılmış ve belli gruplarına toksin uygulanmış olan nöroblastoma hücre hattından kontrol örneklerinin ve MPP⁺ uygulanmış örneklerin total RNA miktarları için RNA izolasyonu yapılır (bölüm 3.1.2.7’de anlatıldığı üzere). Total RNA’nın konsantrasyonu nanodrop cihazı ile ölçülerek kaydedilir. Nanodrop ölçümü için toplamda 1 ya da 2 µl örnek alınarak cihaza yüklenir. Sonuç için örneğin konsantrasyon değeri ve 260/230 oranı dikkate alınarak örnekteki saflık değeri de göz önünde bulundurulur. Kaydedilen konsantrasyon değerleri; C: 12825,2 ng/µl - MPP⁺: 1810,6 ng/µl.

qPCR çalışmalarında örnek miktarının artışı aynı zamanlı gözlemleyebilmek için floresan kaynaklı boya solüsyonu kullanılarak ortaya çıkan ışımaya sinyali ile elde edilen değerler örneklerle paralel meydana gelir. Çoğaltılacak olan örnek miktarının döngüdeki ilk önemli artışı döngü eşik değerini (C_T treshold cycle) verir. Eşik değeri elde edebilmek için ihtiyaç duyulan döngü sayısı ‘treshold cycle’ ya da C_T değeri olarak isimlendirilir.

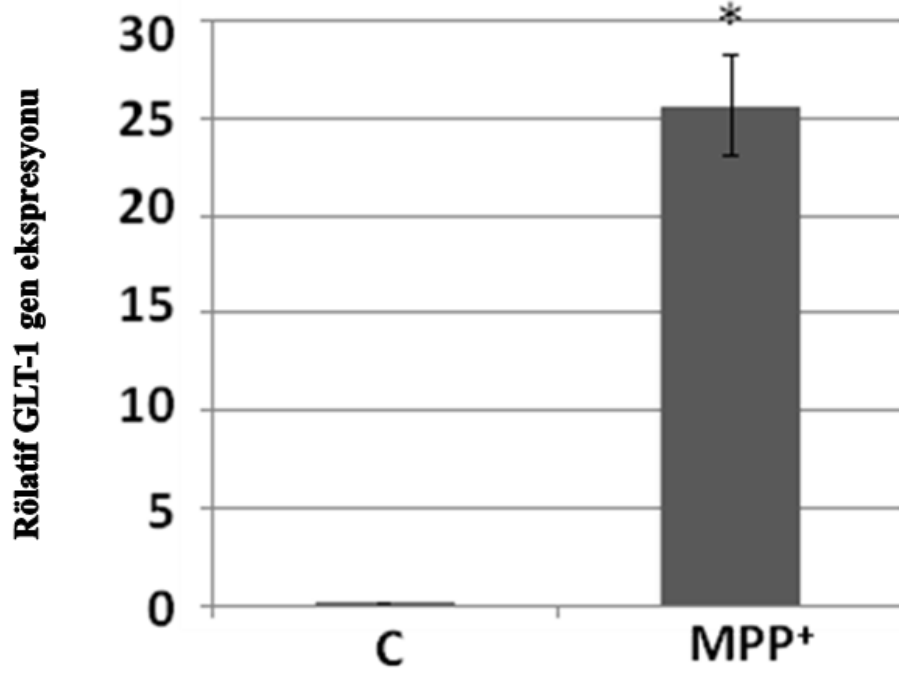
C1, C2, C3 kontrol örneklerinin üç tekrarlı çalışma sonuçları ve MPP⁺ 1, MPP⁺ 2, MPP⁺ 3 toksin uygulanmış örneklerin üç tekrarlı çalışma sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. N2a hücrelerine uygulanan qPCR çalışması sonucu örneklerin C_T (eşik) ve rölatif mRNA miktarı ölçüm değerleri.

	Ortalama C_T (eşik) değeri	D C_T	REL Q (Rölatif Miktar Ölçümü)	Örnek
Aktin	17,8086154	15,6258558	0,19776467	C1
GLT-1	33,4344711			
Aktin	17,3740702	16,7343702	0,09171758	C2
GLT-1	34,1084404			
Aktin	17,6584174	15,9498132	0,15798935	C3
GLT-1	33,6082306			
Aktin	22,2051668	8,39514573	29,7036156	MPP ⁺ 1
GLT-1	30,6003126			
Aktin	22,0716686	8,56469663	26,4100614	MPP ⁺ 2

GLT-1	30,6363653			
Aktin	22,7199866	8,91015466	20,7862517	MPP ⁺ 3
GLT-1	31,6301413			

Hazırlanan total RNA'dan 1 µg kullanılarak cDNA sentezlendi ve sonrasında qPCR yapıldı (şekil 20). N2A hücrelerinde, MPP⁺ muamelesi sonucunda, GLT-1 mRNA seviyesinin arttığı gözlemlendi.



Şekil 21. N2a hücre hattı için kontrol (C) ve MPP⁺ uygulanmış gruplarda GLT-1 mRNA oranları karşılaştırılması. *p= 0,00030526<0.05

4.4. Glutamate Assay Sonuçları ve Değerlendirilmesi

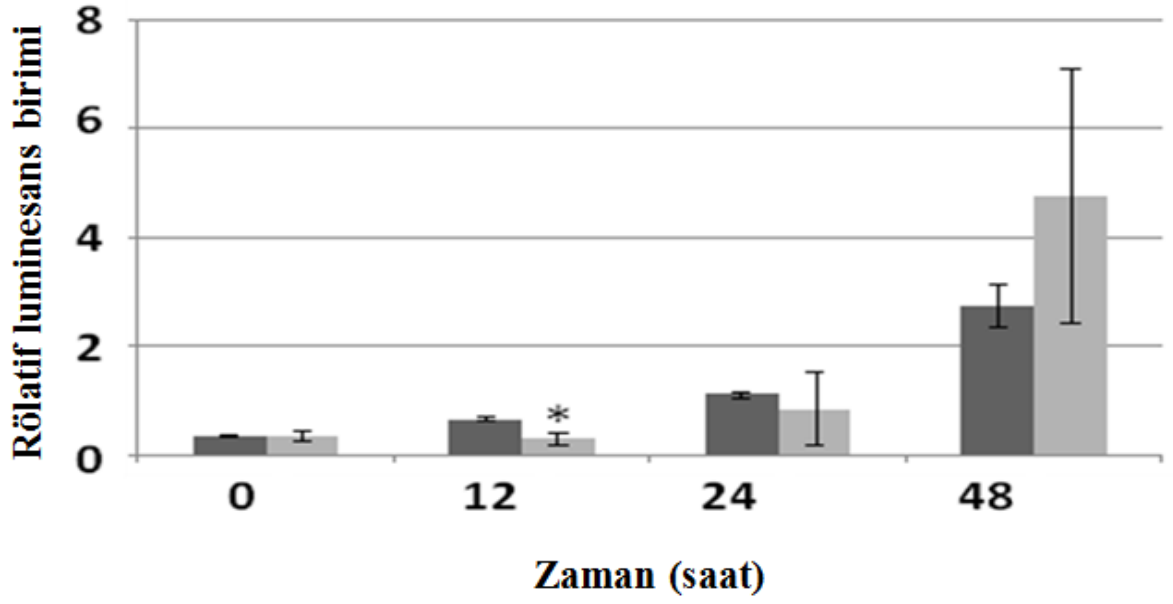
Hem N2A hem de IHA hücre hatlarında MPP⁺ muamelesi sonrası hücrelerin dış ortama salgıladığı glutamat seviyelerini ölçmek için glutamat assay kullanılır. Glutamat assay deneyi tamamlandıktan sonra lminometre ile ölçülen değerler kullanılarak Şekil 21 ve 22’de yer alan grafikler çizildi.

12 saat zaman noktasında, MPP⁺ muamelesi yapılmış N2A hücrelerinde salınan glutamat miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir Şekilde düşük gözlendi. 24 saat noktasında glutamat seviyeleri arasındaki bu fark ortadan kalkmıştır ve 48 saat noktasında MPP⁺ muamelesi yapılmış N2A hücrelerindeki glutamat salınımı kontrole göre artma yatknılığında olmuştur (Şekil 21).

Benzer Şekilde, IHA hücrelerinde 12 saat noktasında, MPP⁺ ile muamele edilmiş hücrelerdeki glutamat salınımının kontrol hücrelerinden daha düşük olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan bu düşüş, glutamat miktarındaki azalmaya yatknılığı göstermektedir. 24 saat noktasında bu fark kalmamıştır ve 48 saat noktasında MPP⁺ muamemesi görmüş hücrelerde glutamat seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artmıştır (Şekil 22).

Görüldüğü üzere her iki hücre hattında da MPP⁺ muamelesi sonucu elde ettiğimiz glutamat birikimi ölçüm sonuçları biribiri ile örtüşmektedir ve birbirini desteklemektedir.

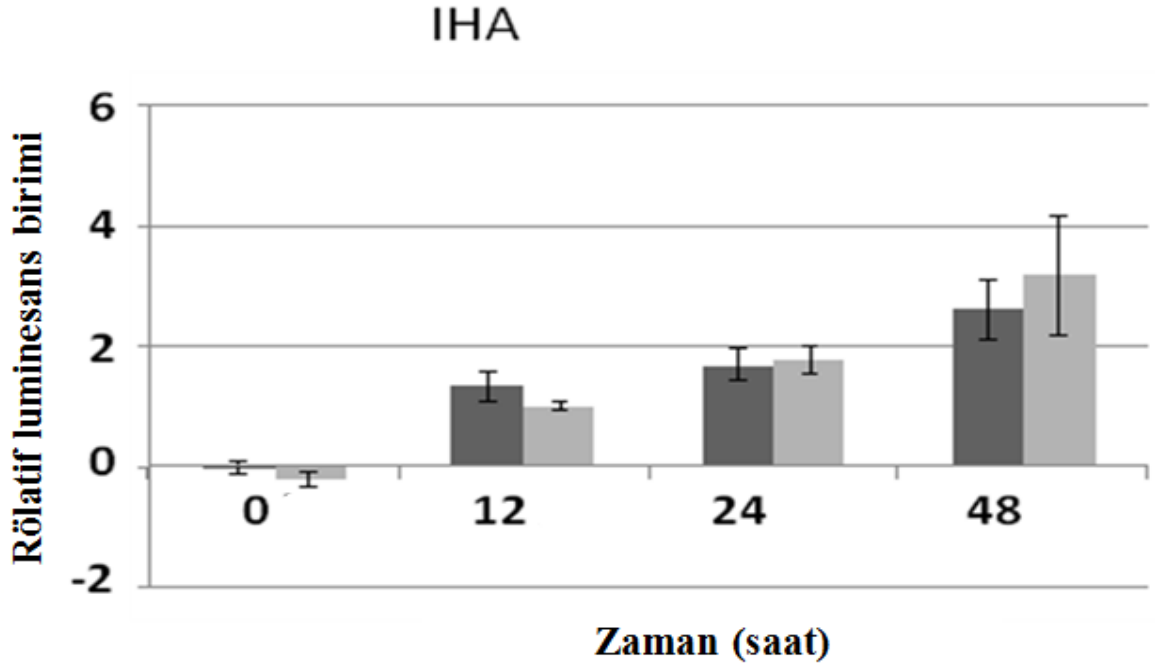
N2A



Koyu : Kontrol

Açık : MPP⁺-muamelesi

Şekil 22. N2A hücre hattına MPP⁺ muamelesinin ardından yapılan glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi. 12 saat noktasındaki p değeri *p= 0,01203078<0.05



Koyu : Kontrol

Açık : MPP⁺-muamelesi

Şekil 23. IHA hücre hattına MPP⁺ muamelesinin ardından yapılan glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

MTT testinde, N2A hücrelerinde 200 μM ve 500 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı düşüş görmemize rağmen, 500 μM çalışma konsantrasyonu olarak seçtik. Bunun nedeni protein ya da RNA ifadesi gibi bazı moleküler değişikliklerin yüksek konsantrasyonlarda daha iyi görülmesiydi. Ayrıca literatürde, MPP⁺ muamelesi genelde buna benzer konsantrasyonlarda yapılmaktadır. IHA hücrelerinde de aynı şekilde 500 μM ve 1000 μM 'de anlamlı düşüş görmemize rağmen 1000 μM çalışma konsantrasyonu olarak seçilmiştir. IHA hücreleri daha dayanıklı hücreler olmasından ve 500 μM 'a göre daha düşük hücre canlılığı oranı gösterdiği için, 1000 μM konsantrasyonu tercih edilmiştir. Moleküler parametrelerde değişiklikleri daha kolay gözlemleyebilmek için 500 μM seçilmemiştir. Seçtiğimiz konsantrasyon literatür ile uyumludur.

IHA hücreleri, N2A hücrelerinde GLT-1 protein ekspresyonu gözlemlenemediği için kullanılmıştır. Astrositler (glia hücreleri), nöronlara oranla çok daha fazla miktarda glutamat taşıyıcılarını ifade etmektedir (Soni ve ark, 2014). Bu nedenle IHA hücrelerinde daha kolay gözlenebilmiştir. Ancak IHA hücrelerinde dahi normal şartlar altında GLT-1 ifadesi az gözlenmektedir. Nedeni, glutamat salınımını uyaran bir durum olmadığı müddetçe GLT-1'in ubiquitine olarak degrade edilmesidir (Susarla ve Robinson, 2008). Ancak MPP⁺ nedeni ile eksitotoksisite durumu olduğu için GLT-1 ifadesi artmıştır ve western blot ile görüntülenebilmiştir. N2A hücrelerinde western blot ile protein ifadesinin görüntülenememesinin nedeni ifade azlığının yanı sıra küçük bir olasılıkla antikor problemi de olabilir. Aynı antikor IHA hücrelerinde çalışmış olmasına karşın farklı bir antikorun N2A hücrelerinde daha başarılı çalışacağı olasılık dahilindedir. Sonuç olarak, bu sebeple, N2A hücrelerinde GLT-1 gen ekspresyonuna yani mRNA ifadesine kantitatif PCR (qPCR) ile bakılmıştır.

Sonuçlarımız, MPP⁺ muamelesi sonucunda eksitotoksisitenin artabileceğini göstermektedir ve hücre yaşama mekanizmasını devreye sokmak için otomatik olarak GLT-1 miktarını arttırmaktadır. Salınan glutamat miktarını incelediğimizde, her iki hücre tipinde 48 saat noktasında MPP⁺ muamelesi yapılmış hücrelerde artmaya yatkınlık gözlenmiştir. 12 saat noktasında, MPP⁺ muamelesi yapılmış hücrelerdeki glutamat miktarı, kontrole göre, N2A hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, IHA hücrelerinde ise azalmaya yatkınlık gösterir şekilde düşmüştür. 24 saat noktasında ise bu fark ortadan kalkmıştır. Bunun nedeninin GLT-1 mRNA seviyesinin N2A hücrelerinde 25 kat civarı ve GLT-1

protein seviyesinin IHA hücrelerinde yaklaşık olarak 10 kat civarı artması olabileceği düşünüldü. Bu dramatik artış fazla glutamati hemen toplayarak hücreleri normal duruma geçirmiş olabilir. Bir diğer ihtimal ise, hücreler muamele edilen konsantrasyondaki MPP⁺ verilince, ilk 12 saat içinde ölmesi nedeniyle salınan glutamat seviyesi 12 saat noktasında azalmış olabilir. Daha sonra ise hücre bölünmesiyle seviye eşitlenmiştir ve salınımda fark kalmamıştır. Fakat yine de hücreler bekledikçe medyum değiştirilmediği için glutamat seviyesi 48 saatte artmış olabilir. Burada 12 saat öncesi bir zaman noktası kullanırsak hücreler ölmeden yakalayarak hücre sayısı etkisini bertaraf ederek glutamat salınımindaki farkı görebiliriz.

Hücreye yapılan herhangi bir stres, strese cevap mekanizmalarını aktive eder. MPP⁺ toksininin hücreye verilmesi de bir streştir ve bu mekanizmalarla birlikte glutamat salınımını aktive etmiştir. Bu stres sonucu, görevi glutamati absorbe etmek olan GLT-1'in ifadesi artmıştır. Tabii ki artan GLT-1 miktarı bazen bu stresle başetmek için yeterli olmayabilir. Ancak nörodejeneratif hastalıkların ortak moleküler yollarından biri olan eksitotoksisite Parkinson hastalığının da altında yatan moleküler nedenlerden biridir. Bu nedenle çalışmamızda olduğu gibi hücresel modeller ile eksitotoksisitenin moleküler mekanizmasının araştırılması ileride yeni ilaç hedeflerinin gelişmesine yardımcı olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız nöronal ve glia olmak üzere iki hücre tipinde (N2A ve IHA) MPP⁺'nin eksitotoksik bir strese yol açarak yaşam (pro-survival) stres cevabı mekanizmalarını tektiklediğini göstermektedir. Bunlardan birisi de fazla glutamatın absorbe edilmesinden sorumlu olan GLT-1'dir. Hücre canlılığını anlamlı bir şekilde düşüren MPP⁺ konsantrasyonlarında GLT-1 protein ifadesi IHA hücrelerinde, mRNA ifadesi de N2A hücrelerinde artmıştır. GLT-1 ifadesinin artması eksitotoksisiteyi engelleyecektir. MPP⁺ glutamat salınımını arttırmış ancak hücre ölümüne de yol açtığı için 12 saat noktada glutamat salınımı kontrole oranla azalmıştır. 12 saat noktada GLT-1 ifadesinin yüksekliğinin de glutamat birikimini düşürmüş olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın devamında daha düşük konsantrasyonda MPP⁺ kullanarak ya da 12 saat zaman noktası öncesi bir inkübasyon süresinde glutamat birikimi ölçülerek hücre ölümü gerçekleşmeden önce biriken glutamat miktarları tespit edilip karşılaştırılabilir.

Eksitotoksitenin moleküler mekanizmasının araştırılması, bu çalışmada hücrel olarak modellediğimiz Parkinson hastalığının moleküler mekanizmasının aydınlanmasında ve ilaç hedeflerinin geliştirilmesinde önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Amalric M.** Targeting metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol* 2015,20, 29-34.
- Amara SG, Fontana AC.** Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 2002,41 (5), 313-318.
- Arundine M, Tymianski M.** Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003,34 (4-5), 325-337.
- Badisa RB, Darling-Reed SF, Soliman KF.** The protective role of D-glucose against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): induced mitochondrial dysfunction in C6 astroglial cells. *Neurochem Res* 2010,35 (9), 1413-1421.
- Benarroch EE.** Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology* 2010,74 (3), 259-264.
- Bjornsen LP, Hadera MG, Zhou Y, Danbolt NC, Sonnewald U.** The GLT-1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter is essential for glutamate homeostasis in the neocortex of the mouse. *J Neurochem* 2014,128 (5), 641-649.
- Blandini F.** An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Funct Neurol* 2010,25 (2), 65-71.
- Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R.** The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci* 2017,40 (6), 358-370.
- Bove J, Perier C.** Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2012,211, 51-76.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K.** Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004,318 (1), 121-134.
- Cedarbaum JM, Gancher ST.** (1992). *Neurologic Clinics Parkinson's Disease* (Vol. 10). United Kingdom: Elsevier.
- Choi SJ, Panhelainen A, Schmitz Y, Larsen KE, Kanter E, Wu M, Sulzer D, Mosharov EV.** Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) exposure. *J Biol Chem* 2015,290 (11), 6799-6809.
- Coyle JT, Puttfarcken P.** Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993,262 (5134), 689-695.
- Dauer W, Przedborski S.** Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003,39 (6), 889-909.

de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006,5 (6), 525-535.

DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P T* 2015,40 (8), 504-532.

Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013,62, 132-144.

Di Monte DA. The role of environmental agents in Parkinson's disease. *Clinical Neuroscience Research* 2001,1 (6), 419-426.

Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2018,46 Suppl 1, S30-S33.

Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ. Molecular chaperones in Parkinson's disease--present and future. *J Parkinsons Dis* 2011,1 (4), 299-320.

Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan FJRn. Epidemiology of Parkinson's disease. 2016,172 (1), 14-26.

Eriksen JL, Petrucelli L. Parkinson's disease--molecular mechanisms of disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004,1 (4), 399-405.

Ezza H, Khadrawy Y. Glutamate excitotoxicity and neurodegeneration. *Mol. Genet. Med* 2014,8 (4), 1747-0862.

Gegelashvili G, Bjerrum OJ. Glutamate transport system as a key constituent of glutamosome: Molecular pathology and pharmacological modulation in chronic pain. *Neuropharmacology* 2019, 107623.

Goodwani S, Saternos H, Alasmari F, Sari Y. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2017,77, 14-31.

Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med* 2008,12 (6A), 2263-2280.

Jagmag SA, Tripathi N, Shukla SD, Maiti S, Khurana S. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 2015,9, 503.

Jia M, Njapo SA, Rastogi V, Hedna VS. Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs* 2015,29 (2), 153-162.

Keane H, Ryan BJ, Jackson B, Whitmore A, Wade-Martins R. Protein-protein interaction networks identify targets which rescue the MPP+ cellular model of Parkinson's disease. *Sci Rep* 2015,5, 17004.

Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 2011,226 (10), 2484-2493.

Krug AK, Gutbier S, Zhao L, Poltl D, Kullmann C, Ivanova V, Forster S, Jagtap S, Meiser J, Leparc G, Schildknecht S, Adam M, Hiller K, Farhan H, Brunner T, Hartung T, Sachinidis A, Leist M. Transcriptional and metabolic adaptation of human neurons to the mitochondrial toxicant MPP(+). *Cell Death Dis* 2014,5, e1222.

Kumar Sahel D, Kaira M, Raj K, Sharma S, Singh S. Mitochondrial dysfunctioning and neuroinflammation: Recent highlights on the possible mechanisms involved in Traumatic Brain Injury. *Neurosci Lett* 2019,710, 134347.

Levite M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis. *J Neural Transm (Vienna)* 2017,124 (7), 775-798.

Lewis PA, Spillane JE. The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease. In: Parkinson's Disease. (Vol. Chapter 3). Academic Press, United Kingdom, 2018, s 83-115.

Lin CL, Kong Q, Cuny GD, Glicksman MA. Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med Chem* 2012,4 (13), 1689-1700.

Malik AR, Willnow TE. Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 2019,20 (22).

Martin LJ, Pan Y, Price AC, Sterling W, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Lee MK. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J Neurosci* 2006,26 (1), 41-50.

Masilamoni GJ, Smith Y. Metabotropic glutamate receptors: targets for neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Curr Opin Pharmacol* 2018,38, 72-80.

Mehra S, Sahay S, Maji SK. alpha-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2019,1867 (10), 890-908.

Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* 2016,90 (4), 675-691.

Milanese C, Tapias V, Gabriels S, Cerri S, Levandis G, Blandini F, Tresini M, Shiva S, Greenamyre JT, Gladwin MT, Mastroberardino PG. Mitochondrial Complex I Reversible S-Nitrosation Improves Bioenergetics and Is Protective in Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal* 2018,28 (1), 44-61.

Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018,18 (5), 21.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 1995,34 (1), 1-26.

Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease. *Med Clin North Am* 2019,103 (2), 337-350.

Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neurobiology of disease* 2018,109, 249-257.

Rueda CB, Llorente-Folch I, Traba J, Amigo I, Gonzalez-Sanchez P, Contreras L, Juaristi I, Martinez-Valero P, Pardo B, Del Arco A, Satrustegui J. Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochim Biophys Acta* 2016,1857 (8), 1158-1166.

Salinska E, Danysz W, Lazarewicz JW. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 2005,43 (4), 322-339.

Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 2001,24 (1-3), 107-129.

Schapira AH. Safinamide in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother* 2010,11 (13), 2261-2268.

Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004,318 (1), 215-224.

Schuler T, Mesic I, Madry C, Bartholomaeus I, Laube B. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* 2008,283 (1), 37-46.

Shachar T, Lo Bianco C, Recchia A, Wiessner C, Raas-Rothschild A, Futerman AH. Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. *Mov Disord* 2011,26 (9), 1593-1604.

Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 2007,51 (6-7), 333-355.

Shih J, Liu L, Mason A, Higashimori H, Donmez G. Loss of SIRT4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid. *J Neurochem* 2014,131 (5), 573-581.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000,25 (3), 302-305.

Soni N, Reddy BV, Kumar P. GLT-1 transporter: an effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 2014,127, 70-81.

Sonnewald U, Schousboe A. Introduction to the Glutamate-Glutamine Cycle. *Adv Neurobiol* 2016,13, 1-7.

Sun F, Deng Y, Han X, Liu Q, Zhang P, Manzoor R, Ma H. A secret that underlies Parkinson's disease: The damaging cycle. *Neurochem Int* 2019,129, 104484.

Susarla BT, Robinson MB. Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem Int* 2008,52 (4-5), 709-722.

Talepoor Ardakani M, Rostamian Delavar M, Baghi M, Nasr-Esfahani MH, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K. Upregulation of miR-200a and miR-204 in MPP(+)-treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. *Mol Genet Genomic Med* 2019,7 (3), e548.

Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012,483 (7390), 479-483.

Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev* 2013,93 (4), 1621-1657.

Wang B, Abraham N, Gao G, Yang Q. Dysregulation of autophagy and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 2016,5, 19.

Williams-Gray CH, Worth PF. Movement Disorders: Parkinson's disease. *Medicine* 2016,44 (9), 542-546.

Yokoi N, Fukata M, Fukata Y. Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012,297, 1-43.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Ak Ceylan
Uyruk : TC
Doğum yeri ve tarihi : Muş-Merkez-20/08/1992
Telefon : 05347121660
E-mail : ceylanak949@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora		
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Bölümü	
Lisans	Muş Alparslan Üniversitesi Biyoloji Bölümü	27.06.2014

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
15.03.2019-sürmekte	Manisa (Hafsa Sultan) Celal Bayar Üniversitesi	Biyolog