

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

N-METHYL-4-PHENYLPYRİDİNİUM İODİDE (MPP+) ARACILI
PARKİNSON HÜCRE MODELİNDE OTOFAJİ AKTİVATÖRÜ
FLUSPİRİLENİN ENDOPLAZMA RETİKULUMU STRESİNDEKİ İRE1
YOLAĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Merve AYAN TÜRELİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

N-METHYL-4-PHENYLPYRİDİNİUM İODİDE (MPP+) ARACILI
PARKİNSON HÜCRE MODELİNDE OTOFAJİ AKTİVATÖRÜ
FLUSPİRİLENİN ENDOPLAZMA RETİKULUMU STRESİNDEKİ İRE1
YOLAĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Merve AYAN TÜRELİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Pergin ATİLLA

ANKARA
2024

TEŞEKKÜR

Hem akademik hem de hayat tecrübeleriyle bana yol gösteren bilgisini ve deneyimlerini asla esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Pergin ATILLA'ya,

Tez projesi kapsamında kendi deneyimlerini ve yardımlarını benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Elif KARAKOÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Sevilay KARAHAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca beni destekleyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Eğitimim ve tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen Emrah TOSUN, Hava DUYGU, Hüseyin KONUKCU ve Meltem AVCI'ya,

Çalışmamıza Hızlı Destek Araştırma Projesi (THD-2023-20421) çerçevesinde finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Histoloji ve Embriyoloji uzmanlık eğitimim boyunca tecrübelerini, deneyimlerini ve desteklerini esirgemeyip yol gösteren kıdemlilerim Dr. Serkan TÜRELİ, Dr. İlker Levent ERDEM, Dr. Kübra Simay AYDIN AKKURT, Dr. Sefa Burak ÇAM'a,

Birlikte başladığımız uzmanlık eğitimi sürecinde beraber gülüp beraber ağladığımız, daima yanımda olan tez yoldaşım Dr. Erblina NİKSHİQİ'ye, odamızın Polyannası Dr. Rumeysa Havvanur HANELÇİ'ye ve mesaiyi keyifli kılan tüm asistan arkadaşlarıma,

Bugüne gelmemi sağlayan her daim arkamda olan ve her türlü fedakarlığı benim için yapan babam Ertuğrul AYAN'a, her derdimi anlattığım her seçimimi danıştığım ilk arkadaşım annem Nalan AYAN'a, beraber büyüyüp eğlendiğim yeri geldiğinde abla terörü estirip yeri geldiğinde arkadaşı olduğum hep iyi ki var dediğim kardeşim Alp AYAN'a hem akademik hem de kişisel hayatımdaki büyük desteğim olan eşim ve en iyi arkadaşım Serkan TÜRELİ'ye,

Uzmanlık eğitimim sürecince iyi dilekleriyle ve güzel sözleriyle bana destek olan herkese,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Merve Ayan Türel, N-Methyl-4-Phenylpyridinium Iodide (MPP+) Aracılı Parkinson Hücre Modelinde Otofaji Aktivatörü Fluspirilenin Endoplazma Retikulumu Stresindeki IRE1 Yolağına Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024. Dünya genelinde ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığının altında yatan birçok moleküler mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan biri de endoplazma retikulumu stresidir. Endoplazma retikulumu stresi üç adet sensör görevi yapan protein tarafından algılanarak endoplazma retikulumunda yapım veya yıkım ile ilişkili yolakları aktifleştirmektedir. Parkinson hastalığındaki bozukluk görülen bir başka moleküler mekanizma ise bozulmuş olan otofajidir. Otofaji bir hücre ölümü olmasının yanı sıra hasarlı organel, yanlış katlanmış protein gibi yapıları temizleyerek hücrede kurtarıcı bir görev üstlenmektedir. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak MPP+ toksini ile H4 insan nörogloma hücreleri ile oluşturulmuş Parkinson hastalığı modelinde ATG5 aracılı otofajiyi indükleyen Fluspirilenin, hücrelerdeki endoplazma retikulumu stresi sensörlerinden biri olan IRE1 üzerine etkisinin araştırılması için gözlemsel tanımlayıcı bir çalışma planlandı. Oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde otofajinin hücre canlılığına olan etkisi MTT testi ile belirlendi. Hastalıkta bozulan otofajinin ATG5 aracılı otofaji aktivasyonu ile geri döndürüldüğü LC3B immünohistokimyası ile gösterildi. Endoplazma retikulumu stresini belirlemek için yapılan pIRE1 immünohistokimyasında, pIRE1 immünoaktivitesi ELİSA yöntemi ile ölçülen total IRE1 seviyesi ile standardize edildiğinde ER stresinin arttığı saptandı. ER-Tracker boyaması ile endoplazma retikulumunun yapısının Parkinson hastalığı modelinde bozulduğu ve otofaji ile geri döndürüldüğü saptandı. Bu çalışma ile MPP+ toksin aracılı Parkinson hastalığı modelinde ATG5 aracılı otofaji ile IRE1 bağımlı endoplazma retikulumu stresi arasındaki ilişki ilk defa gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, N-Methyl-4-Phenylpyridinium Iodide, Endoplazma Retikulum Stresi, IRE1, Otofaji, ATG5

Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Hızlı Destek Araştırma Projesi (THD-2023-20421)

ABSTRACT

Tureli Ayan Merve, Investigation of the Effect of the Autophagy Activator Fluspirylene on the Ire1 Pathway in Endoplasmic Reticulum Stress in N-Methyl-4-Phenylpyridinium Iodide (Mpp⁺) Mediated Parkinson's Cell Model, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology Residency Thesis, Ankara, 2024. Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disease worldwide, has many underlying molecular mechanisms. One of these mechanisms is endoplasmic reticulum stress. Endoplasmic reticulum stress is detected by three proteins acting as sensors, activating pathways associated with synthesis or degradation in the endoplasmic reticulum. Another molecular mechanism observed in Parkinson's disease is impaired autophagy. Autophagy not only serves as a cellular death mechanism but also plays a salvaging role by clearing damaged organelles and misfolded proteins in the cell. In this study, we aimed to observe and describe the effect of Fluspirilene, which induces ATG5-mediated autophagy, on IRE1, one of the endoplasmic reticulum stress sensors, in a Parkinson's disease model created with MPP⁺ toxin on H4 human neuroglioma cells. We determined the effect of autophagy on cell viability in the Parkinson's disease model by using the MTT assay. The reversal of impaired autophagy with ATG5-mediated autophagy activation is detected by LC3B immunocytochemistry. By the pIRE1 immunocytochemistry used to detect the endoplasmic reticulum stress, after the standardization of pIRE1 immunoreactivity with the total IRE1 levels measured using the ELISA method, endoplasmic reticulum stress was found to be increased. With the ER-Tracker staining it is seen that the morphology of the endoplasmic reticulum was destroyed in the Parkinson's disease model, but restored with autophagy. With this study, in the MPP⁺ toxin-mediated Parkinson's disease model the relationship between ATG5-mediated autophagy and IRE1 mediated endoplasmic reticulum stress was shown for the first time .

Keywords: Parkinson's Disease, N-Methyl-4-Phenylpyridinium Iodide, Endoplasmic Reticulum Stress, IRE1, Autophagy, ATG5

Financial Support: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, Research Fund (THD-2023-20421)

İÇİNDEKİLER

T.C.	1
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	11
2. GENEL BİLGİLER.....	14
2.1. Sinir Sistemi Embriyolojisi	14
2.1.1. Nöral Tüp Gelişimi ve İleri Farklanması.....	14
2.1.2 Nöronların ve Gliaların Farklanması	15
2.2. Sinir Sistemi Histolojisi	16
2.2.1. Sinir Sistemine Genel Bakış	16
2.2.2. Sinir Dokusunun Hücreleri	17
2.3. Parkinson Hastalığı	25
2.3.1. Parkinson Hastalığı Klinik Bulguları.....	26
2.3.2. Parkinson Hastalığı Histopatolojisi	27
2.3.3. Parkinson Hastalığı Mevcut Tedaviler	28
2.4. Parkinson Hastalığı Modelleri.....	28
2.5. Endoplazma Retikulumu	34
2.5.1. Endoplazma Retikulumunun Yapısı ve Görevleri.....	34
2.5.2. α -sinüklein Proteininin Birikimi	37
2.5.3. Yanlış Katlanmış Protein Cevabı.....	38
2.6. Nöronlarda Hücre Ölüm Tipleri	40
2.7. Fluspirilen.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Deney Tasarımı	47
3.2. H4 İnsan Nörogloma Hücrelerinin Kültürü	48
3.3. Hücre Canlılığı için MTT Testinin Uygulanması	50
3.4. LC3B İmmünohistokimyası	52

3.5. Dozların Karşılaştırılarak Deney Gruplarının Oluşturulması	56
3.6. ER-Tracker Boyaması	56
3.7. pIRE1 İmmünotokimyası	57
3.8. Total Protein Ölçümü	57
3.9. ELİSA Deneyinin Yapılması	58
3.10. İmmünotokimya Deneyleri ve ER-Tracker Boyama Sonucu Elde Edilen Görüntülerin Image J ile Analizi	58
3.11. Verilerin Analizi.....	59
4. BULGULAR.....	61
4.1. MTT Hücre Canlılığı Deneyi	62
4.1.1. PH ve PHO grupları arasında hücre canlılığında farklılık saptanmamıştır..	62
4.2. LC3B İmmünotokimyası	63
4.2.1. PHO grubunda otofagozom sayısında artma görüldü.	63
4.2.2. PH grubunda LC3B immünoaktivitesi azalmıştır.	65
4.2.3. Otofaji indeksi PHO grubunda artmıştır.	66
4.3. pIRE1 İmmünotokimyası	68
4.3.1. pIRE1 immünoaktivitesi hücre temas bölgelerinde daha yoğun olarak izlendi.....	69
4.3.2. pIRE1 immünoaktivitesi PH ve PHO gruplarında artmıştır.	70
4.3.3. Endoplazma retikulumu stresi PHO grubunda azalmıştır.	71
4.4. ER-Tracker Boyaması	74
4.4.1. PH grubunda ER yapısı bozulmuştur.	74
4.4.2. Endoplazma retikulumunun hücredeki birim alandaki ortalama yoğunluğu PHO grubunda azalmıştır.	76
5. TARTIŞMA.....	78
6. KAYNAKLAR	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

6-OHDA	6-hidroksidopamin
ER	Endoplazma Retikulumu
gER	Granüllü Endoplazma Retikulumu
dER	Düz Endoplazma Retikulumu
ERAD	Endoplazma retikulumu aracılı yıkım
ERLAD	Endoplazma retikulumu-lizozom ilişkili yıkım
IRE1	İnositol-gerektiren Enzim Tip 1 (Inositol-requiring Enzyme Type 1)
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
MAO-B	Monoaminoksidaz B
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MPP+	N-methyl-4-phenylpiridinyum İyodür
PH	Parkinson hastalığı
PERK	Protein kinaz R-benzeri ER kinaz (Protein kinase R-like ER kinase)
pIRE1	Fosforile İnositol-gerektiren Enzim Tip 1 (Phosphorylated Inositol-requiring Enzyme Type 1)
UPR	Yanlış Katlanmış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response)

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 Parkinson Hastalığında görülen motor ve motor olmayan semptomlar	26
Tablo 2.2. Nörolojik hastalıkların modellenmesinde kullanılan hücre hatları avantaj ve dezavantajları	33
Tablo 2.3. Hücre ölümlerinin özellikleri ve belirteçleri	42
Tablo 3.1. Deney tasarımı	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çalışmanın hipotezi	12
Şekil 2.1. Sinir sisteminin sınıflandırılması	16
Şekil 2.2. Nöronun yapısı ve bölgeleri.....	18
Şekil 2.3. MPTP toksininin dönüştürülmesi ve etkinlik mekanizması	30
Şekil 2.4. Endoplazma Retikulumu stresi oluşumu ve etkileşimdeki yolaklar.....	35
Şekil 2.5. α -sinüklein proteininin bölgeleri ve işlevleri.....	37
Şekil 2.6. Proteinlerin yanlış katlanma aşamaları	38
Şekil 2.7. Endoplazma Retikulumu stres yolakları ve rol alan moleküller.....	40
Şekil 2.8. Otofajinin başlangıç, nükleasyon ve uzama aşamalarında rol alan moleküller	45
Şekil 2.9. Fluspirilenin etki mekanizması.....	46
Şekil 3.1. Deneyin iş akışı.....	47
Şekil 3.2. H4 nörogloma hücre hattı faz kontrast mikroskobu görüntüsü	49
Şekil 3.3.Farklı dozlarda MPP+ uygulaması sonucunda H4 hücre hattında hücre canlılığında değişimler.....	51
Şekil 3.4. Farklı dozlarda Fluspirilen uygulaması sonucu H4 hücre hattında hücre canlılığında değişimler.....	52
Şekil 3.5. MPP+'nin farklı dozları için gerçekleştirilen LC3B immünohistokimya işaretlemesi	54
Şekil 3.6. Fluspirilenin farklı dozları için gerçekleştirilen LC3B immünohistokimya işaretlemesi	55
Şekil 4.1. H4 nörogloma hücre hattı faz kontrast mikroskobu altında görüntüsü	61
Şekil 4.2. Gruplar arasında hücre canlılığı değişimleri.....	62
Şekil 4.3. LC3B immünohistokimya işaretlemesi	64
Şekil 4.4. LC3B immünohistokimya işaretlemesi	65
Şekil 4.5. LC3B floresan yoğunluğu ölçüm sonuçları	66
Şekil 4.6. Gruplarda otofaji indeksinin karşılaştırılması	68
Şekil 4.7. pIRE1 immünohistokimya işaretlenmesi.....	69
Şekil 4.8. pIRE1 immünohistokimya işaretlenmesi.....	70
Şekil 4.9. pIRE1 immünoaktivitesi ölçüm sonuçları	71
Şekil 4.10. Total IRE1'in total proteine oranı.....	72

Şekil 4.11. pIRE1/Total IRE1 oranının ölçümü.....	73
Şekil 4.12. ER-Tracker boyanması.	76
Şekil 4.13. ER-Tracker floresan yoğunluğu ölçüm sonuçları.....	77



1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı dünya genelinde ikinci sıklıkla görülen, ilerleyen motor kayıp ile demansın eşlik ettiği erken ve geç yaşlarda görülebilen yüksek morbiditeye sahip bir nörodejeneratif hastalıktır. Mevcut tedavisi hastalığın progresyonunu durdurmak üzerine olup küratif değildir. Hastalığın histopatolojik özellikleri yanlış katlanmış protein olan α -sinüklein birikimi, Lewy cisimcikleri oluşumu, taunun hiperfosforilasyonu ve bunların sonucunda meydana gelen nöron kaybıdır. Parkinson hastalığında bu histopatolojik bulguların oluşmasında birçok moleküler mekanizma etkilidir. Endoplazma retikulumu stresinde artma ve otofajide bozulma bu mekanizmalar arasında sayılabilmektedir.

Endoplazma retikulumu hücrede tübül ve sisternalardan oluşan çekirdekten sitoplazmaya kadar uzanan ribozom varlığına göre granüllü veya düz olarak adlandırılan dinamik bir organeldir. Protein sentezi ve katlanması, lipid sentezi, karbonhidrat metabolizması, vezikül trafiği gibi birçok görevi üstlenen endoplazma retikulumu Parkinson hastalığında hasar gördüğünde *endoplazma retikulumu stresi* aktifleşmektedir.

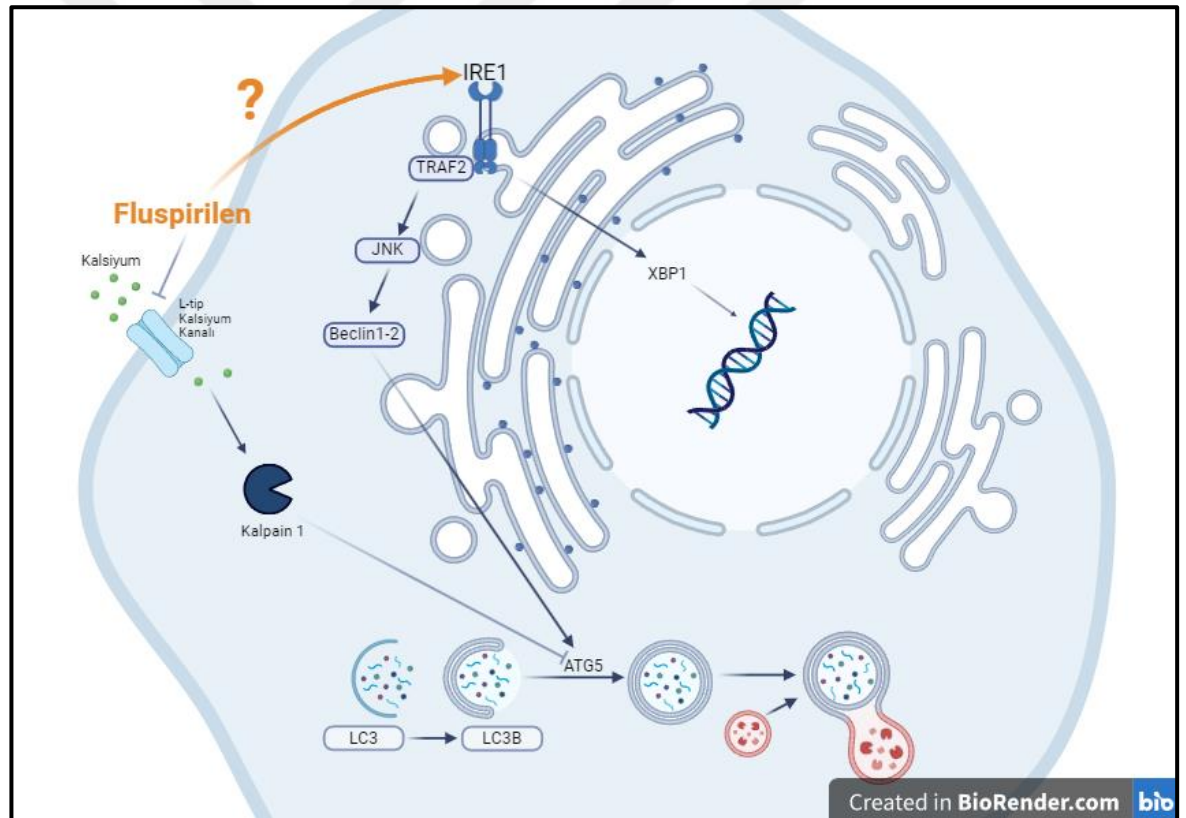
Endoplazma retikulumu stresinin *IRE1*, *PERK* ve *ATF6* olmak üzere üç sensör proteini ile algılanması ile yanlış katlanmış protein cevabı hücrelerde başlatılmaktadır. Bu süreç ise endoplazma retikulumunun yapım veya yıkım olaylarının aktifleşmesi ile sonuçlanmaktadır.

Endoplazma retikulumu stresi sonucunda aktifleşen *otofaji*, hücrede bu stresin azalmasını sağlayarak hücre ölümünü azaltabilir veya endoplazma retikulumu stresini azaltamadığı durumda hücreyi ölüme götürebilir. Aynı zamanda Parkinson hastalığında mutasyonlu genlerin bir sonucu olarak da bozulmuş bir otofaji mekanizması görev almaktadır. Bu bozulmuş mekanizmanın bazı otofaji aktivatörleri aracılığıyla düzenlenmesi hücrede endoplazma retikulumu stresini azaltarak nöron ölümünü engelleyebilir. Ancak literatürde toksin aracılı Parkinson hastalığı modelinde otofaji indüklenmesiyle endoplazma retikulumu stresi arasındaki ilişkiye ve endoplazma retikulumunun yapısındaki değişimlerine yönelik bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmanın hipotezi; Parkinson hastalığında otofajinin indüklenmesi endoplazma retikulumu stresini azaltır ve nöron canlılığını artırır (Şekil 1.1).

Çalışmanın araştırma soruları:

- Parkinson hastalığı modelinde otofaji indüklenerek hücre canlılığı artırılabilir mi?
- MPP⁺ aracılı Parkinson hastalığı modelinde otofaji bozulmuş mudur?
- Parkinson hastalığı modelinde endoplazma retikulumunun yapısında bozulma var mıdır, varsa otofaji aktive edilerek düzeltilebilir mi?
- Parkinson hastalığı modelinde otofaji indüklenerek endoplazma retikulumu stresi azaltılabilir mi?



Şekil 1.1. Çalışmanın hipotezi

Çalışmamızda endoplazma retikulumu stresini arttırdığı ve otofaji mekanizmasında bozulma yaptığı bilinen MPP⁺ (N-Methyl-4-phenylpyridinium Iodide) toksini aracılığıyla H4 insan nörogloma hücre hattında oluşturulan Parkinson hastalığı hücre

modelinde, Fluspirilen aracılığıyla indüklenmiş otofajinin endoplazma retikulumu stresinde IRE1 yolağına etkisinin araştırılması amaçlandı.

Bu çalışma sonucunda otofajinin indüklenmesi ile endoplazma retikulumu stres belirteçlerinde azalma, hücre canlılığında artış ve aynı zamanda endoplazma retikulumunun yapısında düzelme beklenmektedir. Bu çalışmada elde edilecek bulgular ile Parkinson hastalığının moleküler yolaklarının açıklanması ve tedavisine yeni bir bakış açısı getirilerek literatüre katkıda bulunulması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi Embriyolojisi

2.1.1. Nöral Tüp Gelişimi ve İleri Farklanması

Nöral sistemin gelişimi embriyoda üçüncü haftada başlamaktadır. İlk gelişen yapı olan nöral plak, altındaki notokordun TGF β (transforming growth faktör beta), SHH (sonic hedgehog), BMP (bone morphogenic protein) molekülleri aracılığıyla yüzey ektodermine indüklemesiyle meydana gelmektedir. Nöral plağın kranial bölgesi genişleyerek gelecekteki beyin veziküllerine, kaudal bölgesi ise medulla spinalise farklılaşmaktadır. Nöral plağın kenarları yukarı doğru kıvrılarak nöral katlantıları, ortasındaki oluk ise nöral oluğu oluşturmaktadır. Nöral katlantılar birbirine yaklaşarak kapanırken nöral tüp oluşmaktadır. Nöral tüp oluşurken kapanma beşinci somit seviyesinden başlayarak kranial ve kaudale ilerlemektedir. Kranial nöropor 25.günde kaudal nöropor ise 27.günde kapanmaktadır [1].

Oluşan nöral tüpün sefalik kısmında üç genişleme belirmektedir. Primer beyin vezikülleri; prozensefalon, mezensefalon ve rhombensefalon olarak adlandırılmaktadır. Veziküllerin gelişimi ile eş zamanlı olarak servikal ve sefalik katlanma ortaya çıkmaktadır. Servikal katlanma rhombensefalon ve medulla spinalis arasında iken sefalik katlanma mesensefalonda oluşmaktadır [2].

Gelişimin beşinci haftasında primer beyin vezikülleri beş tane sekonder beyin vezikülüne farklılaşmaktadır; prozensefalon telensefalon ve diensefalona, rhombensefalon metensefalon ve miyelensefalona farklılaşırken mesensefalon aynı isimle kalmaktadır. Oluşan her beyin vezikülü beyinde farklı bir yeri oluşturmaktadır.

- **Telensefalon;** beyin hemisferlerini
- **Diensefalon;** hipotalamus, talamus, optik vezikül ve nörohipofizi
- **Mesensefalon;** görme ve işitme ile ilişkili yolları
- **Metensefalon;** beyincik ve ponsu
- **Miyelensefalon;** medulla oblongatayı oluşturmaktadır.

Medulla spinalisin lümeni santral kanalı oluştururken, rhombersefalonun boşluğu dördüncü ventrikülü, diensefalon boşluğu üçüncü ventrikülü, beyin hemisferlerinin içindeki boşluk ise lateral ventrikülleri oluşturmaktadır [2].

2.1.2 Nöronların ve Gliaların Farklanması

Olgun sinir sisteminde bulunan çoğu hücrenin kökeni erken nöral tüpte oluşan multipotent nöroepitelyal kök hücrelere dayanmaktadır. Bu hücreler farklılaşmaya uğramadan önce simetrik mitoz bölünmeler geçirerek çoğalmaktadır. Sonrasında meydana gelen asimetric mitoz bölünmeler sonucu bir kısım hücre nöroepitelyal kök hücre olarak kalırken bir kısım hücre radyal öncül hücreye dönüşmektedir.

Radyal öncül hücre ilk başta simetrik mitotik bölünmeler geçirdikten sonra asimetric mitoz bölünmeye geçiş ile nörogenezi başlatmaktadır. Asimetric mitoz sonucu oluşan bir hücre radyal öncül hücre olarak kalırken diğer hücre iki yolu izleyebilir; direkt olarak nöroblastta farklılaşarak bir nöron oluşturabilmektedir veya ara progenitör hücreye farklılaşıp bölünerek iki nöroblastta dönüşebilmektedir [3].

En erken oluşan bipolar nöroblastların nöral tüpün lümen sınırına ulaşan ve eksternal sınırlayıcı membranına ulaşan iki adet ince sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır. Sitoplazmik uzantılarını çekerek unipolar nöroblastta dönüşen hücre, sitoplazmasında yeterli Nissl cisimciği biriktirdikten sonra birçok yöne doğru sitoplazmik uzantılar oluşturarak (akson ve dendritler) multipolar nöroblastlara farklılaşır. Farklanma sürecinde hücreler göç ederken aksonlar dendritlerden önce oluşur. [4].

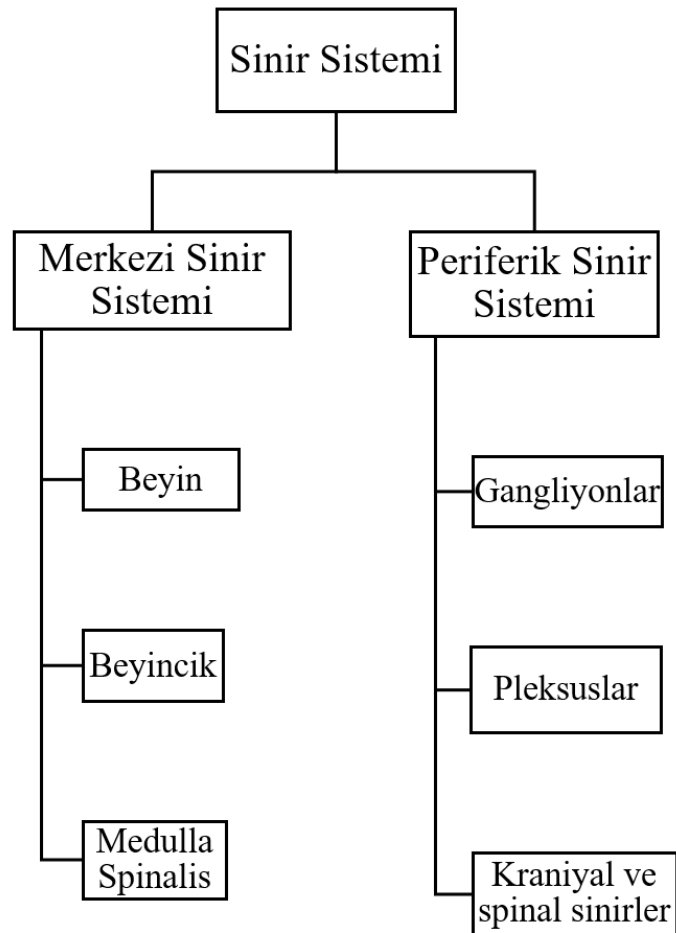
Radyal öncül hücrelerde nörogeneze ilerlemeyi sağlayan en bilinen molekül nöroregülün iken santral sinir sistemin farklı bölgelerinde çeşitli çevresel faktörler nöroregülünü baskılayarak bu yolu gliogeneze yönlendirirler. Bu olaya nöron-glia hücre dönüşümü denilmektedir. Etkili olan moleküllerden ve mekanizmalardan bazıları nükleer faktör I-A, SOX-9, OLIG-2 ve NOTCH sinyal yolağı aktivasyonudur. Bu nöron-glia dönüşümü sonrasında radyal öncül hücre astrosit ve oligodendrosite farklılaşmaktadır. Bu farklılaşmaya uğrayacak olan hücrelerde glial fibriller asit protein (GFAP) ekspresyonu görülmektedir. Radial glial hücreler tüm bu hücreleri

oluşturmanın yanı sıra santral kanalı döşeyecek olan ependim hücrelerine de farklıdır. Sinir sistemi hücrelerinin çoğu ortak bir kökeni paylaşmasına rağmen mikrogliya hücreleri sinir sistemindeki miyeloid kökenli hücrelerdir ve gelişmekte olan beyinde kan damarlarının girişiyle beraber bulunmaktadır [4, 5].

2.2. Sinir Sistemi Histolojisi

2.2.1. Sinir Sistemine Genel Bakış

Sinir sistemi merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılmakta olup merkezi sinir sisteminin elemanları beyin, beyincik ve medulla spinalis iken periferik sinir sistemi kranial ve spinal sinirler ile oluşturdukları pleksus ve gangliyonlardan (Şekil 2.1) oluşmaktadır [6].



Şekil 2.1. Sinir sisteminin sınıflandırılması

Sinir sistemi işlevsel olarak ise *somatik* ve *otonom* olarak ikiye ayrılmaktadır. Somatik sinir sistemi tüm vücudun duyuşal ve motor innervasyonunu sağlar, vücudun refleksler dıőındaki bilinçli kontrolünden sorumludur. Otonom sistem ise düz kasların motor innervasyonunu ile bezler ve kalbin iletim sistemi üzerinde etkilidir. Otonom sinir sistemi *parasempatik*, *sempatik* ve *enterik* olarak üç farklı alt gruba ayrılmaktadır [7].

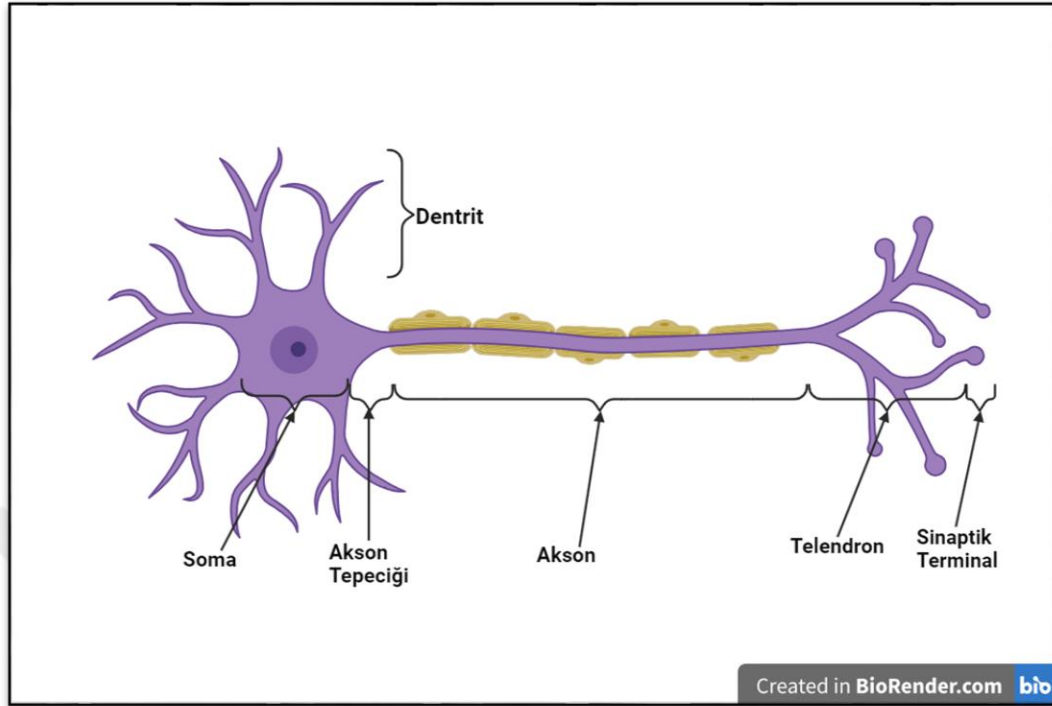
2.2.2. Sinir Dokusunun Hücreleri

Sinir dokusunun hücreleri *nöronlar* ve *glia hücreleri* olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Nöronlar sinirsel iletiyi algılama ve iletme görevine sahip iken nöroglia hücreleri nöronlara destek olmaktadır [6].

2.2.2.1. Nöronların Yapısal Özellikleri ve İşlevleri

5µm boyutundan 150µm boyutuna ulaşabilen hücrelerdir. Hücre gövdesi, dendrit ve aksondan oluşmaktadır. Nöronun hücre gövdesi *soma* veya *perikaryon* olarak da adlandırılmaktadır (Şekil 2.2) [6].

Nöron hücre gövdesi ve dendritler bilginin alınması ve işlenmesi ile ilişkili iken akson kısmı bilginin aktarılmasını sağlamaktadır [8]. Hücre gövdesi çekirdek, organeller ve çevreleyen sitoplazmadan oluşmaktadır. Nöronun perinükleer sitoplazması granüllü endoplazma retikulumu ve ribozomdan yoğun, ışık mikroskopunda bazofilik bir alan olarak görülen Nissl cisimlerini içermektedir. Nissl cisimleri ve Golgi kompleksi dendritlere uzanırken aksonda görülmemektedir [7].



Şekil 2.2. Nöronun yapısı ve bölgeleri

Dendritten aksona kadar devam etmekte olan endoplazma retikulumunun düz yüzü hipolemmal sisternayı oluşturur, granüllü yüz hücre gövdesinde devam eder. Akson tepeciği, soma ve akson arasında piramit şekilli ribozomdan fakir geçiş bölgesidir [7]. Bu bölgede endoplazma retikulumunun granüllü yüzü bulunmamakla beraber düz yüzü görülebilmektedir. Akson tepeciği diğer organeller bakımından da fakirdir [6].

Çekirdek yakınına yerleşmiş Golgi kompleksi protein sentezinin yoğun olduğu hücrelere özgü olarak gelişmiştir. Birçok mitokondriyon soma, dendrit ve aksona yayılmıştır. Nöron mitokondriyonları diğer hücrelere oranla daha uzundur ve kristalleri uzunlamasına yerleşir. Olgun nöronlarda sentriol, nöronun primer silyumunun bazal cisimciği ile ilişkilidir [6].

Nöronlar dendritleri aracılığıyla diğer nöronlardan ileti almaktadır. Dendritler hücre gövdesinden çıkan kısa, ince dallanan yapılardır. Nöron somasındaki gibi birçok organel içermekle beraber Golgi kompleksinden fakirdir. Çoğu nöron birçok dendrit

içermektedir. Dendritlerin yüzeyinde bulunan dendritik dikenler sinaps bölgeleri olarak işlev görür [6]. Dendritler miyelin kılıf ile kaplı değildir [7].

Akson, nöron gövdesinden akson tepciğinin devamında tek ince bir uzantı olarak çıkmaktadır. Bazı aksonlarda yan dallanma bulunabilmektedir. Akson uzunluğu 1mm veya daha uzun olabilmekle beraber aksonun kalınlığı nöronun türüne göre değişiklik göstermekte ve ileti hızını etkilemektedir [7].

Aksonun miyelin kılıfla sarılı olduğu ilk bölgeye *başlangıç bölgesi* adı verilmektedir. Elektron mikroskop ile incelendiğinde başlangıç bölgesinin aksosommasının nörofilaman ve mikrotübülden zengin olması, bu bölgenin akson kalınlığının belirlendiği yer olduğunu düşündürmektedir. Başlangıç bölgesi ileti sisteminin eksitator ve inhibitör uyarılarının aksiyon potansiyeli oluşturup oluşturmayacağını karar verildiği yer olma özelliğinden dolayı aksiyon potansiyeli tetikleme bölgesi olarak da adlandırılmaktadır [7, 9].

Nöronda tüm yapısal ve işlevsel proteinlerin gövdede sentezlendiği bilinmekle beraber son çalışmalar akson terminalinde poliribozomlardan oluşan periaksoplazmik plaklar aracılığıyla lokal protein sentezi yapıldığını ve bu proteinlerin nöronal hücre hafızasında yer aldığını göstermektedir [7].

Nöronlarda Sinyal İletimi

Nöronların komşu hücreler ile iletişim kurmasında sinapslar rol almaktadır. Sinapslar nöron-nöron, nöron-kas, nöron-bez arasında olabilmektedir. Nöronlar arasındaki sinapslar morfolojik olarak 3 sınıfa ayrılmaktadır [7].

- *Aksodendritik sinaps*; Akson ve dendritler arasındadır, dendrit dikenleri görülebilmektedir. Uzun süreli hafıza ve öğrenme ilişkili fonksiyonları beyinde üstlenmektedirler.
- *Aksosomatik sinaps*; Akson ve soma arasındadır.
- *Aksoaksonik sinaps*; Akson ve akson arasında görülen sinaps türüdür [7].

Sinaplar rutin hematoksilen eozin boyamada görünmemekle beraber gümüşleme metotları ile düğmeler şeklinde gösterilebilmektedir. Nöron başına düşen sinaps sayısı birkaç taneden on binlere kadar ulaşabilmektedir. Sinapslar elektriksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal sinapslar nörotransmitter moleküller aracılığı ile sinaptik yarıktaki gerçekleşmektedir. Elektriksel sinapslar ise iyonların hücreler arası gap junctionlar aracılığı ile geçişi ile gerçekleşmektedir [7].

Sinaptik terminal iletinin bir aksiyon potansiyeli oluşturması için özelleşmiş bölgedir. Presinaptik bölge, iletinin oluşturulduğu bölgeyi, postsinaptik bölge, iletinin alındığı bölgeyi temsil etmektedir. Presinaptik ve post sinaptik membranlar arasında sinaptik yarıktır bulunmaktadır [8]. Presinaptik bölge sinaptik vezikülleri oluşturma özelliğine sahiptir. Bu veziküller nörotransmitterleri içerir ve boyutları 30-100 nm arasındadır. Bu veziküllerin membranlar arasında alışverişi SNARE protein ailesi rol almaktadır [7].

Sinaptik aralıkta iletinin iletilmesinde voltaj bağımlı kalsiyum kanalları etkin görev almaktadır. Bu kanallar aracılığıyla aksiyon potansiyeli oluşumu sonucunda hücre dışından hücre içine kalsiyum akışı gerçekleşir böylelikle veziküllerin transportu, tutunması ve membranların birleşmesi ile iletim sonuçlanmaktadır [10]. Alternatif bir nörotransmitter transport yolu ise porositozdur. Porositozda farklı olarak kalsiyum varlığında vezikül ve presinaptik membranda geçici 1nm boyutlarında porlar oluşmaktadır. Veziküller içerisindeki nörotransmitter moleküller, post sinaptik membrandaki voltaj bağımlı iyon kanalları veya G protein aracılı reseptörlere bağlanmaktadır, bunun sonucunda nörotransmitterler ikinci mesajcıları aracılığıyla veya sadece kendileri etki göstermektedirler [7].

Nöron tipleri

Farklı tip nöronlar somalarından uzanan dendrit sayısına göre adlandırılmaktadır [8].

- *Multipolar nöronlar*; Somadan uzanan tek akson ve birçok dendrit bulunmakta olup soması poligonal şekillidir. Sinir sistemindeki çoğu nöron bu kategoridedir.

- *Bipolar nöronlar*; Bir adet akson ve bir adet dendritten oluşmaktadır. Görsel, işitsel ve vestibüler sistem nöronları bu gruptadır.
- *Psödownipolar (Unipolar) nöronlar*; Aksonları somalarına yakın olarak ikiye ayrılmaktadır. Bir kolu perifere uzanırken diğer kolu santral sinir sistemine uzanmaktadır. Kranial ve spinal sinirlerin gangliyonlarında lokalize olurlar, genellikle duyu nöronlarıdır [8].

Aksonal Transport

Nöron metabolizması için gerekli olan maddelerin hücre gövdesinde sentezlenerek akson ve dendritlere iletilmesine *aksonal transport* adı verilmektedir [7]. İleti yön olarak anterograd ve retrograd olarak ikiye ayrılırken hız olarak yavaş ve hızlı olarak iki kategoride değerlendirilmektedir. Anterograd transport maddelerin nöron gövdesinden akson veya dendritlere doğru olan taşınmadır, mikrotübül bağımlı motor protein olan kinezin ATP kullanarak görev yapmaktadır. Retrograd transport ise maddelerin akson veya dendritlerden nöron gövdesine iletilmesidir, mikrotübül bağımlı dynein proteini görev almaktadır [7].

Transport sistemleri ayrıca ileti hızına göre de hızlı ve yavaş olarak sınıflandırılmaktadır. Yavaş transport sistemi hücre iskeleti elemanlarının (tübülün, aktin, nörofilaman) anterograd transportu amacıyla kullanılmaktadır. Bu iletimin hızı günde 0.2mm ile 4mm arasında olmaktadır. Hızlı transport sistemi hem anterograd hem retrograd olabilmektedir, hızı günde 20mm ile 400mm arasındadır. Hızlı taşınmanın her yönünde ATP gerekmektedir. Anterograd hızlı transport veziküllerin, şekerler, aminoasitler gibi metabolik maddelerin, nükleik asit ve nörotransmitterlerin taşınımını sağlamaktadır. Retrograd hızlı transport farklı olarak sinir sistemine toksin ve virüslerin ulaşmasına sebep olmaktadır [7].

Nörotransmitter Moleküller

Beyinde işlev gösteren nörotransmitterler moleküller ester, amin, aminoasit, peptit veya serbest radikal formunda olabilmekte ve presinaptik kavşaktan post sinaptik membrana geçişi ile iletimi sağlamaktadırlar. Bir nörotransmitter birden çok türde

reseptör ile etkileşimde bulunabilmektedir. Reseptörler iyonotrofik (iyon kanalları), metabotrofik (G protein) olarak ikiye ayrılmaktadır [7].

- **Asetilkolin:** Ester yapılı bir moleküldür. İyonotrofik (nikotinik ACh-sodyum kanalı aracılı) ve metabotrofik (Muskarinik ACh- G protein bağımlı) reseptörler aracılığıyla etkinlik gösterir. Santral sinir sisteminde asetilkolin hafıza, uyarılabilirlik ve dikkat ile ilişkilidir [11].
- **Epinefrin, Norepinefrin:** Monoamin yapılı moleküllerdir. Metabotrofik (α - β adrenerjik- G protein bağımlı) reseptörler aracılığıyla etki gösterir. Adrenerjik sistem beyinde dikkat, uyarılabilirlik ve uzun dönem hafıza ile ilişkilidir [12].
- **Serotonin:** Monoamin yapısındaki serotonin beyinde uyku, açlık, hafıza ve öğrenme ilişkili birçok yolakta görev almaktadır. İyonotrofik (5HT₃- Na/K kanalı aracılı) ve metabotrofik (5HT_{1,2,4-7} - G protein bağımlı) reseptörler aracılığıyla etkilerini göstermektedir [7].
- **Dopamin:** Monoamin yapılıdır. Metabotrofik (D1, D2- G protein aracılı) reseptörleri aracılığıyla etki gösterir. Dopaminerjik nöron kaybı Parkinson hastalığındaki motor ve kognitif bozulma ile ilişkilidir [12].
- **GABA, Glutamin:** Aminoasit yapısında olan bu nörotransmitterler birbirlerine dönüşmektedir. GABA inhibitör etkilerden sorumlu iken glutamat eksitator etkilerden sorumludur. Her iki aminoasit için de iyonotrofik ve metabotrofik reseptörler mevcuttur [7].
- **Glisin:** İyonotrofik (GlyR-Cl kanalı aracılı) reseptörü bulunan aminoasit yapısındaki glisin beyinde inhibitör yollarda rol almaktadır [7].

Santral sinir sisteminde önemli yollarda rol oynayan bu nörotransmitterlerin yanı sıra küçük peptitler (Substans P, Enkefalinler, β -Endorfin) ve serbest radikal formdaki nitrik oksit de önemli rol üstlenmektedir.

Sinaptik kavşağa aktarılan nörotransmitterler görevlerini tamamladıktan sonra yıkılabilmekte veya geri alınabilmektedir. Nörotransmitterlerin %80'i geri alınarak hücre içinde yıkıma uğratılırken diğer kısmı ise sinaptik yarıktaki görevli enzimleri ile yıkıma uğramaktadır [7].

Hareket bozukluğu ve tremor ile ilerleyen Parkinson hastalığı nörotransmitterlerden biri olan dopaminin beyin bazı bölgelerinde yokluğu ve dopamin üreten nöronların ilerleyici kaybı ile karakterizedir [6].

2.2.2.2. Nöroglia hücrelerinin histolojisi

Sinir sisteminde nöronlardan 10 kat daha fazla sayıda nöroglia hücresi bulunmaktadır. Nöroglia hücreleri, nöronlara destek olmanın yanısıra, beyin omurilik sıvısının düzenlenimini, nörotransmitterlerin uzaklaştırılmasını, skar dokusu oluşturulmasını, gliotransmitter adı verilen nöronu destekleyici maddelerin salınımını gerçekleştirmektedir [6].

Santral sinir sisteminde bulunan nöroglia hücreleri astrosit, oligodendrosit, mikroglia ve ependimal hücre iken periferik sinir sisteminde schwann hücreleri bulunmaktadır [6].

Astrositler

Kan beyin bariyerini oluşturan bu hücreler en büyük nöroglia hücresidir, iki alt tipi bulunmaktadır.

- **Protoplazmik astrositler;** Santral sinir sisteminde gri maddede bulunurlar. Büyük bir çekirdeği, organelden zengin sitoplazması ve birçok uzantısı olan yıldız şekilli hücrelerdir. Uzantılarından bazılarında pediseller bulunmaktadır, bu pediseller pia-glia membranını oluşturmaktadır. Protoplazmik astrositler, beyin omurilik sıvısının içeriğinin düzenlenmesinde de etkin görev alır [6].
- **Fibröz astrositler;** Organel açısından daha fakir sitoplazmaya sahip bu hücrelerin uzantıları protoplazmik astrositlere oranla dallanmalar yapmaz ve daha uzundur [6].

Oligodendrositler

Santral sinir sisteminde miyelinin yapımından sorumlu olan hücredir. Hem gri madde hem de beyaz maddede bulunan granüllü endoplazma retikulumu, ribozom, Golgi ve

mitokondriyondan zengin sitoplazmanın yanı sıra astrositlere göre küçük bir çekirdeğe sahip olan hücrelerdir [7].

- **İnterfasiküler oligodendrositler;** akson demetlerinin yakınlarında bulunan bu hücreler miyelin ile aksonların izolasyonunu sağlarlar.
- **Satellite oligodendrositler;** yalnızca gri maddede bulunan bu hücreler büyük nöron somalarına yakın bulunurlar. Görevleri net bilinmemekle beraber çevresinde bulunduğu nöronların etrafındaki hücrelerarası sıvıyı düzenledikleri ve gerektiğinde interfasiküler oligodendrosite dönüşebildikleri düşünülmektedir.

Santral sinir sisteminde bir oligodendrosit birçok aksonu miyelin ile sarabilirken periferik sinir sisteminde bir schwann hücresi sadece bir aksonu miyelin ile sarabilmektedir [6].

Mikroglialar

Sinir sisteminin kemik iliği kökenli sitoplazmik uzantıları olan çekirdeği basık görümlü hücreleridir [7]. Santral sinir sisteminde uzaklaştırılması gereken maddeleri ve hasarlanmış yapıları fagosiyoz yolu ile uzaklaştırmaktadır. Patojenlerle aktiflenen bir mikroglia diğerlerini aktiflemek için interferon- γ salınımı yapar ve aynı zamanda T lenfositlere antijen sunar [6].

Ependim Hücreleri

Beynin ventriküllerini ve santral kanalı döşeyen, embriyolojik gelişimde nöroepitelden köken alan hücrelerdir. Kübik silli hücrelerdir. Silleri sayesinde beyin omurilik sıvısının hareketini sağlamaktadır. Ependim hücrelerini ventriküllerde farklılaşarak koroid pleksus yapımına katılmaktadır [6].

Özelleşmiş bir ependim hücresi tipi olan tanisit ise üçüncü ventrikülde bulunmaktadır, serbest yüzleri beyin omurilik sıvısıyla ilişki halinde olup beyin parankimine uzanan uzantıları mevcuttur [7].

2.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, dünya çapında 6 milyondan fazla insanı etkileyen ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Her yeni jenerasyonda bu sayı 2,5 kat artarak ilerlemektedir [13]. Hastalık prevalans değerleri değişkenlik göstermekle birlikte dünyada 80,6-187/100.000, Türkiye’de 111/100.000 olarak bildirilmiştir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmekle beraber genel olarak Parkinson hastalığı yıllık insidansının 4,5-21/100.000 arasında değiştiği bilinmektedir [14].

Birçok farklı sebebe bağlı Parkinson hastalığına benzer klinik özellikler görülmesine *parkinsonizm* adı verilmektedir [15]. Parkinson hastalığı farklı gen mutasyonlarından meydana gelebildiği gibi 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), annonasin gibi nörotoksik ajanlara maruziyet sonucunda nigrostriyal yolaktaki nöronların ölümü ile atipik parkinsonizm oluşabilmektedir. Mangan, trikloretilen, karbonmonoksit gibi zehirli gazlara toksik seviyede maruziyet sonucunda da Parkinson benzeri semptomlar ortaya çıkabilmektedir. Aile hikayesi Parkinson hastalığında önemli bir risk faktörüdür ve ailevi formlar hastalığın %5-%15’ini oluşturmaktadır [16].

Parkinson hastalığındaki genetik mutasyonlar sıralanacak olursa:

SNCA: α -sinüklein yapımından sorumlu olan esas genidir. α -sinüklein proteini; nörotransmitter salınımında sinaptik kavşakta SNARE kompleksi oluşmasında rol almaktadır. Genin mutasyonu otozomal dominant olarak aktarılmaktadır.

PRKN: Parkin proteinin yapımından sorumludur. Parkin proteini nöron metabolizmasında hasarlı mitokondriyonları temizler ve apoptozu engeller. Genin mutasyonu otozomal resesif olarak aktarılır.

PINK1: PINK1 proteini sentezleyen genidir. PINK1 proteini hasarlı mitokondriyonların temizlenmesinde rol alır. Genin mutasyonu otozomal resesif olarak aktarılır.

PARK7: DJ1 proteini sentezini sağlayan genidir. DJ1 proteini NF- κ B yolağında görev alır ve oksidatif strese nöronu korur. Genin mutasyonu otozomal resesif olarak aktarılır.

LRRK2: LRRK2 proteinini sentezler. Otofaji, vezikül trafiği ve ER-Golgi transportunda rol alır. Genin mutasyonu otozomal dominant aktarılır.

GBA: GCase1 proteininin sentezini sağlar. GCase1 proteini glikozilseramid ve diğer glikolipitlerin yıkımında görev almaktadır. Genin mutasyonu otozomal dominant aktarılır.

VSP35: VSP35 proteinin sentezini sağlar. Bu protein nöronlardaki retrograd transportta etkilidir. Genin mutasyonu otozomal dominant olarak aktarılır.

ATP13A2: ATP13A2 proteini sentezleyen genidir. ATP13A2 proteini otofagozom oluşumunda görev alır. Genin mutasyonu otozomal resesif aktarılır [17, 18].

2.3.1. Parkinson Hastalığı Klinik Bulguları

Hastalıkta genel olarak motor ve motor olmayan semptomların birlikte görülmektedir (Tablo 2.1). Motor semptomlar, bradikinezi ve tremor iken motor olmayan semptomlar ise depresyon, kabızlık ve uyku bozukluğu olarak kendini gösterir. Motor olmayan semptomlar hastalığın erken evrelerinde görülürken hastalık ilerledikçe yerini motor semptomlara bırakır. Hastalığın tanı kriterleri olarak anamnez hala altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır. Hastada bradikinezinin yanı sıra istirahat tremoru ve/veya rijidite birlikteliği ile Parkinson hastalığı tanısı konulmaktadır [15].

Motor Semptomlar	Motor Olmayan Semptomlar
Tremor	Koku almada azalma (Hiposmi)
Katılık (Rijidite)	Psikiyatrik Semptomlar (Depresyon, ansiyete, apati)
Bradikinezi/Akinezi/Hipokinezi	Demans
Postürde bozulma	Duyu bozuklukları
Yürüyüş bozuklukları	Genitoüriner semptomlar
Göz hareketlerinde bozulma	Gastrointestinal semptomlar
Maske yüz (Hipomimi)	Uyku bozuklukları
Yazıda bozulma (Mikrografi)	Kardiyovasküler semptomlar

Tablo 2.1 Parkinson Hastalığında görülen motor ve motor olmayan semptomlar [15, 16].

2.3.2. Parkinson Hastalığı Histopatolojisi

Hastalıkta görülen semptomların sebebi beyindeki substansiya nigranın pars kompakta bölgesindeki dopaminerjik nöron kaybı ve ona eşlik eden Lewy cisimcikleridir. *Lewy cisimcikleri*; Parkinson hastalığı için karakteristik nöron sitoplazmasında birikimlerdir [19]. Lewy cisimcikleri, Hematoksilen Eozin ile boyamada bir veya birden fazla küresel veya iğsi şekilli haloları olan eozinofilik yapılar olarak görülür. Fosforile α -sinükleinden zengin Lewy cisimcikleri immünohistokimyasal olarak α -sinüklein ile işaretlenmektedir ve bu işaretlenme cisimciklerin periferinde halo şeklinde görülür [20].

α -sinüklein 140 aminoasitten oluşan N terminali ve C terminale sahip SNCA geni tarafından kodlanan bir proteindir. Lizinden zengindir, amfipatik özelliğindedir ve nöronların sitoplazmasında bulunmaktadır [21]. Yapının C terminali yüksek negatif yüklüdür. N terminali ise sekonder α -helikal yapıda olup membrana bağlanmada görev almaktadır. N terminali aynı zamanda hidrofobik amiloid içermeyen bir bölgedir. Mutasyonlar ve translasyon sonrası modifikasyonlar sonucunda N terminalinde patolojik bir peptid konformasyonu olan β tabakalanma gerçekleşerek yanlış katlanmış α -sinükleinin dokuda birikmesine neden olur [19]. α -sinükleinin fizyolojik görevleri vezikül trafiğini kolaylaştırmak, sinaptik vezikül kümelenmesini sağlamak ve ekzositoz füzyon porunu genişletmektir [22].

Parkinson hastalığı, multisistem atrofi ve Lewy cisimcikli demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda α -sinükleinin kümelenerek birikmesi bu hastalıkların patogeneğinde α -sinükleini esas sorumlu protein haline getirmektedir [23]. α -sinükleinin yanlış katlanma sonucu hücrede birikmesi mitokondriyon, lizozom, endoplazma retikulumu ve hücre iskeletinde işlev bozukluğuna yol açmaktadır [19].

Hücrelerde endoplazma retikulumu, protein homeostazını dengelemede ana görevi üstlenmektedir. Bundan dolayı son on yılda birçok çalışma Parkinson hastalığında endoplazma retikulumunun rolünün araştırılmasına odaklanmaktadır. Parkinson hastalığındaki dopaminerjik nöron kaybı ve α -sinüklein birikimi endoplazma retikulumu stresi ile ilişkilendirilmektedir [24].

2.3.3. Parkinson Hastalığı Mevcut Tedaviler

Mevcut tedavi yöntemleri ile Parkinson hastalığı tedavi edilemeyen, progresyonu yavaşlatılmaya çalışılan bir hastalıktır. Hastalığın farklı yaşlarda, farklı gen mutasyonları ve farklı formlarının bulunmasından dolayı tedavide farklı yaklaşımlar izlenmektedir. Hayat tarzı değişiklikleri ve hareket bozukluğu, konuşma bozukluğuna yönelik terapiler tedaviye eklenmektedir. Tedavide ilk aşama farmakolojik tedavi olarak kaybolan dopaminin yerine koyulmasıdır. Bu aşamada karbidopa/levodopa veya dopamin agonistleri ile tedavi planlanmaktadır. Monoaminoksidaz B (MAO-B) inhibitörleri ve katekol-o-metil transferaz inhibitörleri ile dopamin tedavisinin etkinliği uzatılmaktadır. Bu tedaviler hastalığın motor semptomlarına etkili olmakla beraber hastadaki motor olmayan semptomlara ise hedefe yönelik tedaviler (depresyon hastasına trisiklik antidepresan başlanması gibi) planlanmaktadır [25].

Nöroprotektif tedavi seçenekleri olarak Parkinson hastalığında Selenjilin, Tokoferol, Azilect gibi ilaçlar ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar devam etmektedir. Dopamin tedavilerinin uzun dönemli yan etkilerine maruz kalan ve farmakolojik tedaviye cevap vermeyen hastalarda ise cerrahi tedavi seçeneği olarak derin beyin stimülasyonu (DBS) yapılmaktadır. DBS, beyinde talamus, globus pallidus ve subtalamik çekirdek üzerinde etki göstermektedir [25].

2.4. Parkinson Hastalığı Modelleri

Nörolojik hastalıklarda hastalardan doku eldesinin zorluğu araştırmacıları farklı modeller bulmaya yöneltmektedir. Parkinson hastalığının özelliklerini araştırmak yeni moleküler yollar keşfetmek veya yeni tedavi yolları bulmak için *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* modeller kullanılmaktadır [26, 27].

İn vivo Parkinson Hastalığı Modelleri

Hastalıkların araştırılmasında kullanılan yöntemlerden biri olan *in vivo* Latince “canlının içinde” anlamına gelmekte olup hastalık modellerinin hayvanlarda gerçekleştirilmesini ifade eder. Parkinson hastalığı modellenmesinde sıklıkla insan olmayan primatlar, kemirgenler, zebra balığı, *Caenorhabditis Elegans* ve *Drosophila* kullanılmaktadır [26].

Ex vivo Parkinson Hastalığı Modelleri

Latincede “canlının dışında” anlamına gelmekte olan ex vivo, canlının dokusunun bir kısmının canlı dışında hastalık modellenmesi için kullanılmasıdır. Ex vivo modeller, in vivo sonuçlara yakınlık ve dinamik bir şekilde hastalığın ilerleyişini izleme avantajlarını sağlamaktadır [28].

Nörodejeneratif hastalıklarda ex vivo modellere örnek olarak sıçan, fare veya postmortem insan beyinleri ile yapılan beyin kesit kültürleri örnek verilebilir [29].

İn vitro Parkinson Hastalığı Modelleri

“Camın içinde” anlamına gelen in vitro modeller etik kaygılar olmadan hastalığın moleküler yolaklarını (otofaji, apoptoz, oksidatif stress gibi) kültüre edilen hücrelerde anlamamızda önemli bir rol üstlenmektedir [30].

İn vitro modeller iki boyutlu kültür ve üç boyutlu kültür olarak ikiye ayrılmaktadır. İki boyutlu kültür platformları zemine hücrelerin tutunmasını sağlayarak tek tabakalı bir büyümeye ortam hazırlarken, üç boyutlu kültür platformlarında zemine tutunma bulunmamaktadır. Üç boyutlu kültür platformları mikroçevreyi daha iyi taklit eder, ancak iki boyutlu kültüre oranla daha maliyetli ve zaman alıcıdır [31].

Parkinson hastalığının modellenmesinde birçok hücre hattı kullanılmaktadır. Parkinson hastalarından elde edilen hücrelerden oluşturulan kültürlerde o hastadaki mevcut gen mutasyonunun oluşturduğu histopatolojik özellikler incelenebilir. Buna karşın SH-SY5Y, H4, PC12 gibi hazır satın alınan hücre hatlarına uygulanan genetik değişiklikler veya toksin aracılı değişiklikler ile Parkinson hastalığı taklit edilmektedir [32].

2.4.1. Nörotoksin Aracılı Parkinson Hastalık Modelleri

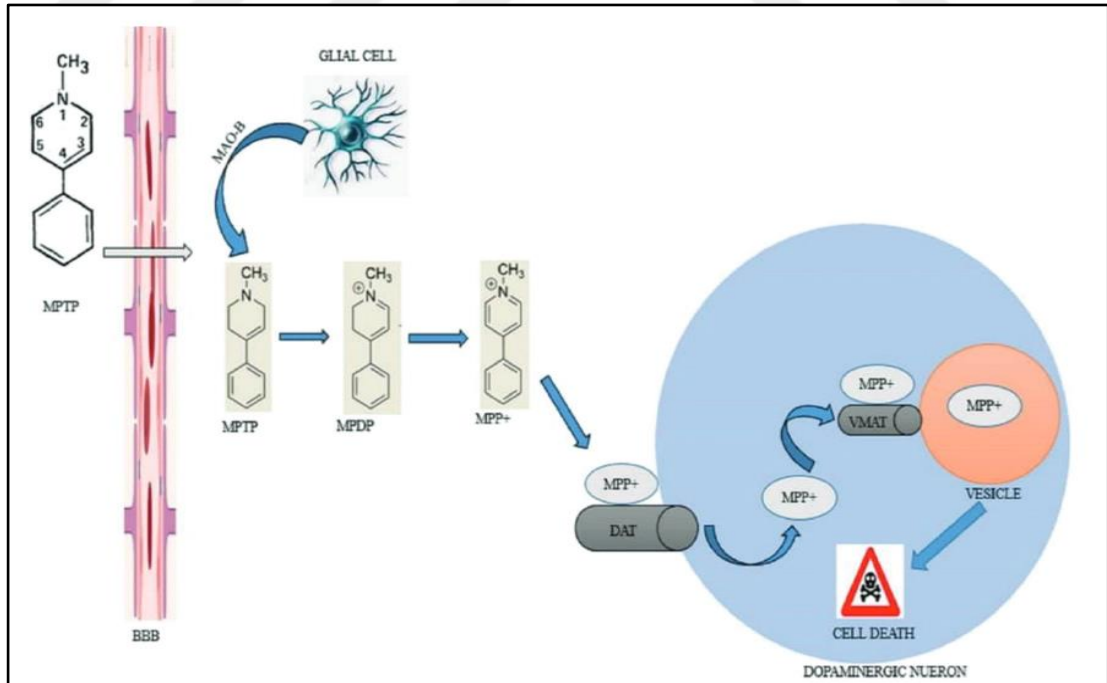
Toksinler aracılığı ile Parkinson hastalığı modelleri oluşturmada 6-hidroksidopamin (6-OHDA), MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), parakuat ve rotenon gibi birçok ajan kullanılmaktadır. Bu toksinler Parkinson hastalığının dopaminerjik nöron kaybı, Lewy cisimciği oluşumu gibi temel patolojik özelliklerini oluşturmaktadır [33].

6-Hidroksidopamin (6-OHDA)

Parkinson hastalığına ait ilk hayvan modellemesi 6-OHDA'nın intraserebral enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. 6-OHDA dopaminerjik nöronlarda kompleks 1 ve 4'ü etkileyerek mitokondriyon fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Lipit oksidasyonu ile başlattığı kaskat sonunda ise hücre içinde oksidatif strese sebep olmaktadır. 6-OHDA, hücrede ayrıca glutamin-glutamat siklusunu bozmaktadır [33].

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ve N-Methyl-4-phenylpyridinium Iodide (MPP+)

Parkinson hastalığı modeli oluşturmak için kullanılan en klasik toksin olan MPTP toksini, kan-beyin bariyerini geçerek glia hücreleri tarafından MAO-B enzimi ile MPP+ iyonuna dönüştürülür ve nörotoksisitesini MPP+ iyonu üzerinden gösterir. Oluşan MPP+ dopamin taşıyıcı proteinler tarafından seçici bir şekilde substantia nigra pars kompaktasındaki dopaminerjik nöronlara alınır (Şekil 2.3) [34]. Nöronlara alınan MPP+ toksini ise hücrede elektron transport zincirini bozarak serbest radikal oluşumu ile hücre ölümüne sebep olur [35].



Şekil 2.3. MPTP toksininin dönüştürülmesi ve etkinlik mekanizması

MPTP ve MPP+ toksinlerinin Parkinsonizm benzeri klinik oluşturması sadece sıçan ve farelerde değil insan, maymun, zebra balığı ve *Caenorhabditis Elegans*'ta da gsterilmiştir [35]. Hayvan modellerinde MPTP kullanımına bakıldığında; sıçanlar kan-beyin bariyerinde bulunan MAO enzimi ile MPTP toksinini beyine girmeden MPP+ toksinine çevirebildiği için MPTP toksinine dirençlidir. Fare modelinde ise böyle bir direnç bulunmamaktadır. Bundan dolayı MPTP toksini ile yapılacak olan Parkinson modellemesinde hayvan olarak sıçan tercih edilmesi önerilmemektedir [34].

MPP+, mitokondriyonda NADH dehidrogenaza bağlanarak elektron transport zincirini durdurmakta ve oksidatif strese sebep olmaktadır [33]. MPP+, oksidatif stres yolağında NADH oluşumunu inhibe ederek radikal oluşumunu arttırır. Oluşan radikaller hücrede α -sinüklein monomerleri oluşumunu arttırır ve agregasyon başlar. Ortaya çıkan toksik α -sinüklein oligomerleri hastalığın önemli işaretlerinden biri olan Lewy cisimciklerini oluşturur [35].

MPP+, aynı zamanda UPR yolağındaki genlerin ekspresyonunu da belirgin olarak arttırmaktadır. Bu yolaktaki gen ekspresyonundaki artış IRE1 α ve PERK (Protein kinase R-like ER kinase) aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. MPP+ uygulaması otofagozom oluşumunu arttırmakla beraber lizozomal aktivasyonu engellemektedir [36].

Parakuat

Parakuat, pentoz fosfat yolunu etkileyerek NADP (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) üretimini engellemektedir ve bunun sonucunda glutatyon-tiyoredoksin döngüsü bozulmaktadır. Parakuat aynı zamanda intrinsik apoptoz yolağına etki ederek Bcl-2 gen ekspresyonunu arttırarak sitokrom c salımına ve kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olmaktadır [33]. Dopaminerjik nöronlara verdiği hasar dopaminerjik transport proteinler üzerinden gerçekleşmektedir [32].

Rotenon

Bazı bitki köklerinden elde edilen doğal bir bileşik olan rotenon aslen tarım ilacı olarak kullanılmaktadır. Dopaminerjik nöronlarda mitokondriyon kompleks 1'i inhibe ederek

hücre içi reaktif oksijen radikalleri birikimine ve mitokondriyon disfonksiyonuna sebep olmaktadır [33].

Mangan

Havada, suda, toprakta ve yediklerimizde doğal olarak bulunan bir moleküldür. Fazla alımında Parkinsonizme benzeyen Manganizm tablosu görülmektedir. Dopamin, serotonin gibi birçok nörotransmitterin kofaktörü olarak görev almaktadır [32].

2.4.2. Transfeksiyon Aracılı Parkinson Hastalık Modelleri

Transfeksiyon, yabancı bir nükleik asit içeriğini hücreye yerleştirmeye sağlayan bir tekniktir. Gen ürünleri ve fonksiyonlarını araştırmak için hücre kültüründe sıkça kullanılır. İyi bir transfeksiyon için transfekte edilecek hücrenin kökeni ve kullanılacak nükleik asit çeşidi hedefe yönelik belirlenmelidir. Biyolojik, kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılmaktadır.

- Biyolojik metot; virüs aracılı transfeksiyon
- Kimyasal metot; kalsiyum fosfat, katyonik lipitler, manyetik bilyeler
- Fiziksel metot; mikroenjeksiyon, elektroporasyon, optik transfeksiyon örnek verilebilir [37].

2.4.3. Parkinson Hastalığı Modellemesinde Kullanılan Hücre Hatları

Hayvan modellerindeki etik kaygılar ve klinik denemelerdeki başarısızlıklar ve maliyetten kaynaklı sorunlar ve insan hastalıklarının hayvana uygulanmasında sorunlar araştırmacıları in vitro çalışmalara yönlendirmektedir. Farklı kökene sahip farklı hücresel özelliklere sahip birçok hücre hattı olmasına rağmen SH-SY5Y hattı en sık kullanılan hat olma özelliğini taşımaktadır, H4 hattı ise üretim ve uygulama kolaylığı ile öne çıkmakta iken hastalığın özelliklerini yansıtmak için en doğru hücreler hastalardan alınan iPSC hücreleridir (Tablo 2.2) [38].

Hücre Hattı	Hücre Türü	Avantajlar	Dezavantajlar
H4	İnsan nörogloma hücresi	Kolay üretim ve transfeksiyon	Dopaminerjik fenotip yokluğu
SH-SY5Y	İnsan nöroblastom hücresi	Nöron benzeri hücrelere dönüşüm	Farklı diferansiyasyon protokolleri
HEK 293	Ölümsüzleştirilmiş insan embriyonik böbrek hücresi	α -sinüklein agragasyon ve mutasyon çalışmalarında işlevsel	Nöron hücresi değil
PC12	Sıçan adrenal medullası kökenli feokromasitoma hücresi	Katekolamin salınımı	İnsan kökenli değil
LUHMES	Ölümsüzleştirilmiş insan embriyonik mezensefalon hücresi	3 boyutlu kültür sistemlerinde kullanımda	Transfeksiyon efektif değil
Primer Nöron Kültürü	Embriyonik kemirgen beyin dokusu	Genetik modellerde kullanışlı	Etik sorunlar Hücre varyasyonları
iPSC (İndüklenmiş pluripotent kök hücre)	Hasta kökenli	Kişiselleştirilmiş ilaç çalışmalarında etkin	Yüksek maliyet
Organoidler	Hasta kökenli	Birçok hücrenin doğal ortamını taklit edebilmekte	Yüksek maliyet ve uzun zaman

Tablo 2.2. Nörolojik hastalıkların modellenmesinde kullanılan hücre hatları avantaj ve dezavantajları

2.5. Endoplazma Retikulumu

2.5.1. Endoplazma Retikulumunun Yapısı ve Görevleri

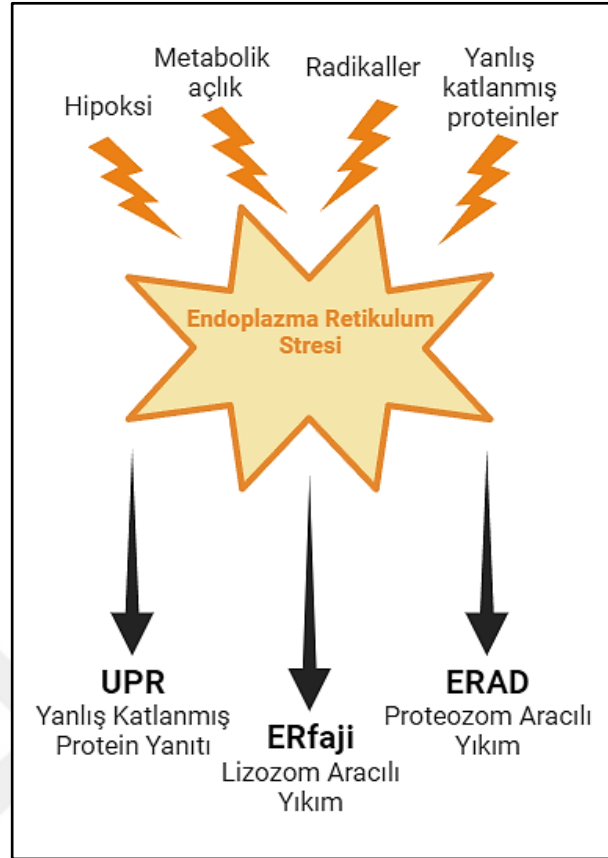
Endoplazma retikulumu sisterna ve tübül sisteminden oluşan çekirdek zarı ile devamlılık gösteren dinamik bir organeldir. Ribozom varlığına göre granüllü (gER) veya düz (dER) olarak isimlendirilmektedir [8]. Nöronlarda ışık mikroskopunda Cresyl Violet boyası ile granüllü endoplazma retikulumu Nissl cisimcikleri olarak görülür, geçirimli elektron mikroskobu ile hem granüllü hem düz endoplazma retikulumu incelenir [39].

Endoplazma retikulumu iki yaprak ve bu yaprakların ayırdığı iki kompartmandan meydana gelmektedir. Protoplazmik yaprak, sitozolik kompartman tarafında yer alırken ekzositoplazmik yaprak luminal yüzde bulunmaktadır, yani endoplazma retikulumunun içine bakmaktadır [8].

Endoplazma retikulumu yapısı çekirdek zarı ile devamlılık gösteren nükleer bölge, tübüller ve sisternalar olarak üç temel bölgeye ayrılmaktadır. Endoplazma retikulumunun sisternalarının düzenleniminden Climp63 proteini, tübüllerinin düzenleniminden ise retikulon proteinleri sorumludur ve bu proteinler endoplazma retikulumu zarına yerleşik olarak bulunmaktadır [40].

Endoplazma retikulumu hücrede kalsiyum depolanması, protein, lipid ve karbonhidrat metabolizması gibi birçok yerde görev alır ve mitokondriyon, lizozom, Golgi kompleksi gibi organellerle membranlar aracılığı ile iş birliği içindedir [41]. Granüllü endoplazma retikulumu salgılanacak veya membran yapısında yer alacak proteinlerin sentezini üstlenirken, düz endoplazma retikulumu lipid metabolizması, hormon sentezi ve detoksifikasyonda görev almaktadır [42].

Hücre metabolizmasının ihtiyaçlarına göre endoplazma retikulumu anabolik ve katabolik yollar üzerinden işlev göstermektedir. Metabolik açlık, yanlış katlanmış proteinler gibi etkenler endoplazma retikulumunda strese sebep olmaktadır (Şekil 2.4) [43].



Şekil 2.4. Endoplazma Retikulumu stresi oluşumu ve etkileşimdeki yollar

Protein Sentezi

Hücrede protein sentezi serbest ribozomlarda, granüllü endoplazma retikulumuna bağlı ribozomlarda ve mitokondriyonda gerçekleşir. Transkripsiyon, post-transkripsiyonel modifikasyonlar, translasyon ve post-translasyonel modifikasyonlar olarak dört aşamada proteinler son halini almaktadır.

- DNA'dan pre-mRNA oluşur (**Transkripsiyon**).
- Pre-mRNA'nın kesim sonucu intronları çıkarılıp, ekzonlar birleştirilir. 3' ucuna poli(A) kuyruğu, 5' ucuna metilguanozin şapkası takılarak sitoplazmaya geçer (**Post-transkripsiyonel modifikasyonlar**).
- Sitoplazmaya geçen mRNA serbest ribozomlara veya gER'deki ribozomlara bağlanır (**Translasyon**).
- Sentezi tamamlanan protein gER'da glikozilasyon, disülfid köprülerinin kurulması, hidrojen bağlarının oluşturulması gibi değişimlere uğrar (**Post-translasyonel modifikasyon**) [7].

Proteinlerin gER'a giriş yapabilmesi endoplazma retikulumundaki sinyal tanıyıcı peptit (signal recognition peptide-SRP) tarafından tanınabilen bir sinyal sekansına (peptit dizisi) sahip olması gerekir. SRP, 7S RNA'ya sahip bir ribonükleoproteindir. Sinyal sekansının, granüllü endoplazma retikulumundaki SRP ile tanınmasıyla proteinlerin girişine izin verilmektedir [44].

Granüllü endoplazma retikulumuna proteinler iki şekilde girer; gER'ye bağlı ribozomlarda sentezlenen proteinler ko-translasyonel translokasyon ile GER'a girerken, serbest ribozomlarda sentezlenen proteinler post-translasyonel translokasyon ile GER'ana girerler [44].

Endoplazma retikulumunda modifikasyona uğramış proteinler hücre içi vezikül trafiğinde sekretuar yolu izleyerek hedef bölgelere gönderilmeye hazır hale gelirler [44].

Proteinlerin Post-Translasyonel Modifikasyonu (Proteinlerin Katlanması)

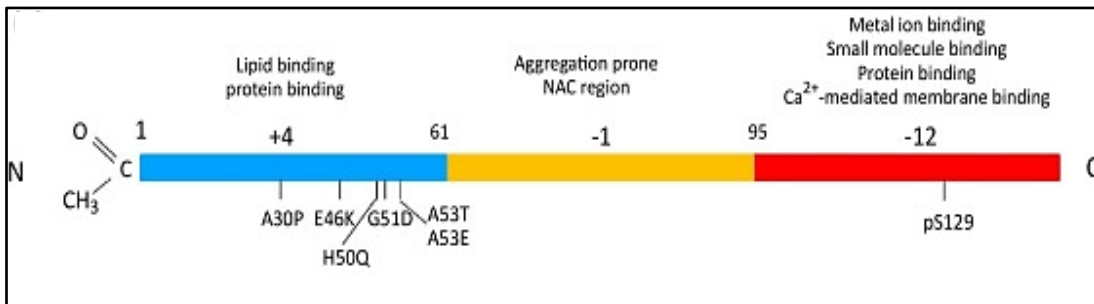
Proteinler daha az enerji ile daha stabil olabilmek ve işlev görebilmek için katlanırlar. Bu katlanma fizyolojik olabildiği gibi patolojik de olabilir. Patolojik katlanmış olan proteinler reseptörler tarafından tanınmazlar ve iş göremezler [45]. Doğru katlanmanın sağlanması için endoplazma retikulumunda birçok şaperon görev almaktadır. Bu şaperonlar doğru katlanmanın yanı sıra katlanma hızını da arttırarak etki göstermektedir. Katlanmakta olan proteinlerin kalite kontrolünde kalretikülin-kalnesin döngüsü ve proteinleri bu döngüye taşıyan UDP-glikoz glikoprotein glikoziltransferaz (UGGT1) rol almaktadır. Doğru katlanmış proteinler bu döngüyü tamamlayarak Golgi kompleksine yönlendirilmektedir [46].

Yanlış katlanmış proteinlerin sonucunda hücrede anabolik ve katabolik yollar aktifleşir. Yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) transkripsiyonel ve translasyonel mekanizmalar üzerinden anabolik olaylar ile gerçekleştirilir. Katabolik olaylar ise endoplazma retikulumu-lizozom ilişkili yıkım (ERLAD) ve endoplazma retikulumu aracılı yıkım (ERAD) ile gerçekleşir [47].

Endoplazma retikulumu aracılı yıkımda (ERAD), yıkım ubiquitin-proteozom yolağı ile gerçekleşirken, bu yol hatalı proteinlerin yıkımında yetersiz kaldığında ERLAD yoluna başvurulmaktadır. ERLAD mekanizmasında yıkım ERLAD reseptörleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu yolak ile proteozomal yıkıma dayanıklı proteinler endolizozomal kompartmanda yıkıma uğratılmaktadır [42]. UPR ve ERLAD arasındaki ilişki net olmamakla birlikte UPR'nin ERLAD'ı indüklediği gösterilmiştir [47].

2.5.2. α -sinüklein Proteininin Birikimi

Parkinson hastalığı ve multiple sistem atrofisini içinde barındıran *sinükleopatiler* adı verilen bir grup hastalıkta α -sinükleinin dokularda birikimi sonucu hastalıklar gelişmektedir. α -sinüklein 14 kDa ağırlığında SNCA geni ile kodlanan 140 aminoasitten oluşan bir proteindir. Nöron sitoplazmasındaki proteinlerin %1'ni oluşturmakta ve vezikül trafiğinde rol oynamaktadır. Proteinin N terminali tekrar eden sekanslardan oluşmakta ve lipit bağlanmasında rol oynamakta olduğu için agregat oluşturma potansiyelini göstermektedir. C terminalinde ise kalsiyum bağlanmasını sağlayan ve protein agregasyonunu inhibe eden non-amiloid kısım bulunmaktadır (Şekil 2.5) [48].

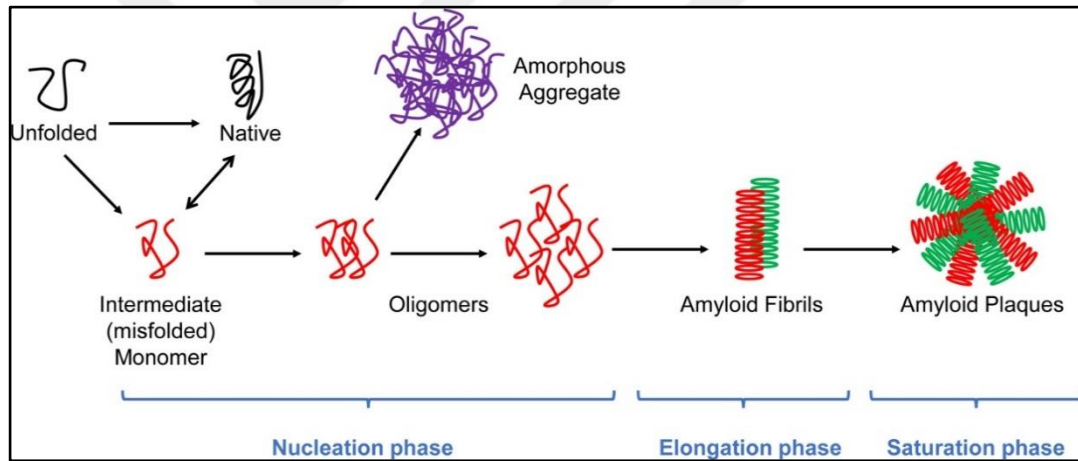


Şekil 2.5. α -sinüklein proteininin bölgeleri ve işlevleri

Yanlış katlanmış proteinler için en klasik model nükleasyon bağımlı polimerizasyon (Nucleation Dependent Polymerization- NDP) modelidir. Bu model 3 fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.6).

- **Nükleasyon fazı;** yanlış katlanmış proteinler kısa oligomerler ile rastgele birleşerek fibril için *merkez* oluştururlar. Bu faz peptit konsantrasyonu bağımlıdır.
- **Uzama fazı;** varolan oligomerlere monomerler eklenerek *amiloid fibriller* oluşur. Bu aşamada beta tabakalanma oluşmaktadır.
- **Saturasyon fazı;** fibriller kendi içlerinde organize olarak *plakları* oluşturur [49, 50].

α -sinükleinin fizyolojik konformasyonu düzensiz-monomerik veya alfa helikal-multimeriktir. Monomerik α -sinüklein, beta tabaklanma göstererek daha fazla monomeri biriktirerek *protofilamanları* ve *amiloid fibrilleri* oluşturmaktadır. Lewy cisimcikleri ise bu amiloid fibriller ile karakterizedir [51].



Şekil 2.6. Proteinlerin yanlış katlanma aşamaları

2.5.3. Yanlış Katlanmış Protein Cevabı

Hücrede yanlış katlanmış proteinlerin varlığında hücre homeostazının sağlanması için endoplazma retikulumu stresine yanıt olarak yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) oluşmaktadır. UPR yolağının aktifleşmesi sonucunda hücrede otofaji, apoptoz gibi birçok hücrel ölüm ve hayatta kalma yolları aktif hale gelir [52].

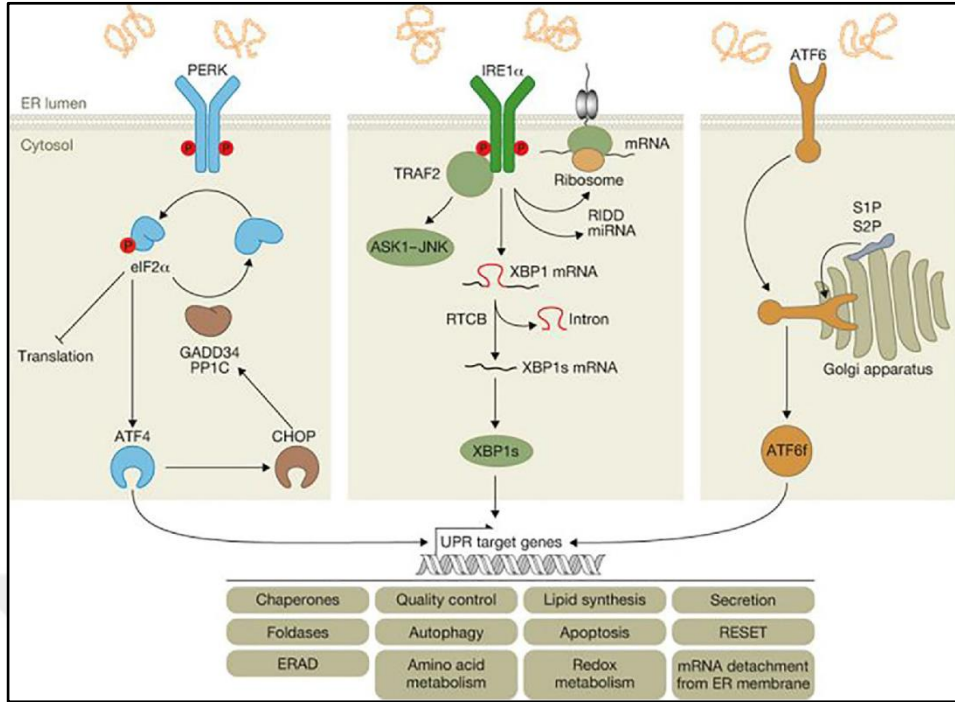
Endoplazma retikulumu stresi tetiklendiğinde endoplazma retikulumu membranına yerleşik olan üç adet stres sensörü olan PERK (Pankreatic Endoplasmic Retikulum Kinase), IRE1 α (Inositol-Requiring Enzyme 1), ATF6 (Activation Transcription

Factor 6) aktif hale gelir. PERK, eIF2 α 'yı (Initial Eukaryotic Translation Factor 2 α) fosforilleyerek protein translasyonunu durdurur ve ATF4'ü (Activation Transcription Factor 4) aktif hale getirir. ATF4 biyolojik yollarda birçok inhibitör ve aktivatör yolu tetiklemektedir [53].

IRE1 α , XBP1'i (X-box-binding protein1) aktif hale getirir. XBP1, protein katlanması ve yıkımı ilişkili birçok geni etkilemektedir. ATF6, aktif hale gelmek için Golgi organeline transfer edilir ve Golgi 'de konumlanan SP1 ve SP2 (site protease 1-2) proteazları ile kesilerek ATF6 fragment formuna dönüşür ve çekirdeğe geçer (Şekil 2.7) [53].

p-IRE1, aktif ATF6 α , p-PERK and p-eIF2 gibi UPR belirteçleri Parkinson hastalarında postmortem beyin dokularında bulunmaktadır. Çalışmalarda endoplazma retikulumu stres belirteçleri yanlış katlanmış proteinler olan α -sinükleinler ile ortak lokalizasyon göstermektedir [43].

iPSC kullanılarak SNCA triple gen transfeksiyonu ile gerçekleştirilen bir çalışmada elde edilen nöronal hücrelerin karşılaştırmalı gen ekspresyonu analizi sonuçlarına göre, yanlış katlanmış protein cevabının IRE1/XBP1 yolağını aktive ettiği belirlenmiştir [54].



Şekil 2.7. Endoplazma retikulumu stres yolları ve rol alan moleküller

2.5.3.1. Inositol-requiring Enzim Tip 1 (IRE1)

Yanlış katlanmış protein cevabının üç başlatıcı enziminden birisi olan IRE1, pro-survival ve pro-apoptik hücrel cevaplarda yer alan bir serin/treonin kinazdır. UPR'nin üç enziminden evrimsel olarak en iyi korunmuş olanıdır. Memelilerde iki adet IRE1 geni bulunmaktadır. IRE1 α tüm hücrelerde bulunurken, IRE1 β sadece bağırsak epitel hücrelerinde bulunmaktadır [55].

IRE1'in iki kısmı bulunmaktadır; N terminali endoplazma retikulumunun zarında yerleşiktir ve yanlış katlanmış proteinleri algılamaktadır, C terminali ise hücre sitoplazmada bulunarak UPR yanıtının başlatılmasında görev almaktadır. Aktivasyonla birlikte IRE1 α oligomerize olarak otofosforile olabilir hale gelmektedir ve otofosforilasyon sonucunda aktif hali olan pIRE1'e dönüşmektedir [55].

2.6. Nöronlarda Hücre Ölüm Tipleri

Nöronlarda hücre ölümü embriyolojik gelişim döneminde ve patolojik durumlarda gerçekleşmektedir. Nöronlarda apoptoz, nekroz, nekroptoz, partanatos, piroptoz, ferroptoz, otofaji ve paraptoz gibi birçok bilinen ölüm şekli bulunmaktadır (Tablo 2.3)

[56-59]. Nöronlardaki hücre ölümünü anlamak diğer hücrelerdeki ölümleri anlamaktan daha değerlidir çünkü çoğu hücrenin aksine olgun nöron hücreleri çoğalma ve DNA sentezi göstermemektedir. Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda hücre ölüm yollarını bilmek bu hastalıklar için geliştirilecek yeni tedavilere kapı aralamaktadır [60].

2.6.1. Apoptoz

Programlı bir hücre ölüm tipi olan apoptoz, inflamasyondan bağımsız gerçekleşen hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Hücre zarı son ana kadar bozulmamışken çekirdekte parçalanmalar oluşur. Oluşan bu parçalanmalar hücre içinde apoptoza spesifik olan “*apoptotik cisimcikleri*” oluşturmaktadır [59].

İntrensek ve ekstrinsek yollar ile gerçekleşen apoptozun belirteçleri olarak en sık kaspazlar kullanılmaktadır. Kaspaz 3 iki yolun da sonunda bulunurken kaspaz 9 intrinsek yolda, kaspaz 6, 7 ve 8 ise ekstrinsek yolda bulunmaktadır [61].

2.6.2. Nekroz

Nekroz, hücrenin besin, oksijen yetersizliği gibi patolojik nedenlere bağlı gerçekleşen programsız ölüm şeklidir. Hücrenin inflamasyon sonucu organellerinin şişmesi ve hücre zarının parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Nekroza özel belirteçler olmamakla birlikte hücre canlılığını göstermek için yapılan kalsein boyaması sıklıkla nekrozun saptanmasında kullanılmaktadır [59].

Ölüm Tipleri	Elektron Mikroskopik Özellikleri	İnflamasyon	Moleküler Belirteçler
Apoptoz	Hücre ve organel membranları son ana kadar korunur. Hücre membranında blebler sonrasında apoptik cisimler oluşur. Çekirdekte kromatin kümelenmesi görülür.	Yok	Kaspaz3 Kaspaz9
Nekroz	Hücre şişer ve membran bütünlüğü bozulur.	Mevcut	
Nekroptoz	Hücre şişer ve membran bütünlüğü bozulur.	Mevcut	RIPK1 RIPK2
Piroptoz	Hücre şişerek parçalanır.	Mevcut	Kaspaz 1 Gasdermin IL1 β
Ferroptoz	Küçük işlevsiz mitokondriyonlar gözlenir.	Yok	Oksidatif hasar belirteçleri
Paraptoz	Membran vakuolizasyonu, kromatin kümelenmesi geç evrede görülür.	Yok	IGFR1
Otofaji	Organeller ve/veya hücreler lizozom ile sarılır.	Yok	LC3 ATG proteinleri

Tablo 2.3. Hücre ölümlerinin özellikleri ve belirteçleri

2.6.3. Nekroptoz

Hem nekroza hem de apoptoza benzerliği dolayısıyla isimlendirilen nekroptoz, programlanmış fakat inflamasyon gözlenen bir hücre ölüm tipidir. Nekroza benzer şekilde hücre membranı parçalanması gözlenmektedir. Patolojik süreçler sonucu gerçekleşir [62]. Nekroptozla özgü olan RIPK (reseptör interact protein kinase) ailesi moleküler belirteçler olarak kullanılabilir [62].

2.6.5. Partanatos

Partanatos, PARP (Poli ADPriboz polimeraz) aracılığı ile gerçekleşen programlanmış nekroz tipidir. Stroke modellerinde PARP1 ve PARP2'nin inhibisyonu nöroprotektif etki sağlamıştır [60]. Moleküler belirteç olarak PAR gösterilmektedir [63].

2.6.6. Piroptoz

Kaspaz 1 aracılığı ile gerçekleşen programlı bir nekroz tipi olan piroptoz inflamazom kompleksinin oluşması ile karakterizedir. İskemik hipoksik nöron hasarlarında aktiflendiği bilinmektedir [60]. Kaspaz 1, Glasdermin D veya IL1 β piroptoz belirteçleri olarak kullanılmaktadır [64].

2.6.7. Ferroptoz

Son dönemdeki çalışmalar; demir bağımlı programlanmış bir nekroz tipi olan ferroptozun inhibisyonunun Huntington koresi ve Parkinson hastalığı tedavisinde yeri olabileceğini düşündürmektedir [60]. Ferroptoz elektron mikroskopik olarak küçük parçalanmış mitokondriyonlar ile karakterizedir. Ferroptoz belirteci olarak demirin meydana getirdiği lipit oksidasyonuna bakılmaktadır [65].

2.6.8. Paraptoz

Apoptoz ve nekrozdan farklı bir ölüm tipi olarak tanımlanan paraptoz sitoplazmik vakuoller ve IGFR'nin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. Ayrı bir ölüm şekli olup olmadığı hala soru işaretlerine yol açmakla beraber Alzheimer hastalığındaki granulovakuoler dejenerasyonla ilişkisi olup olmadığı araştırılmaktadır [60].

2.6.9. Otofaji

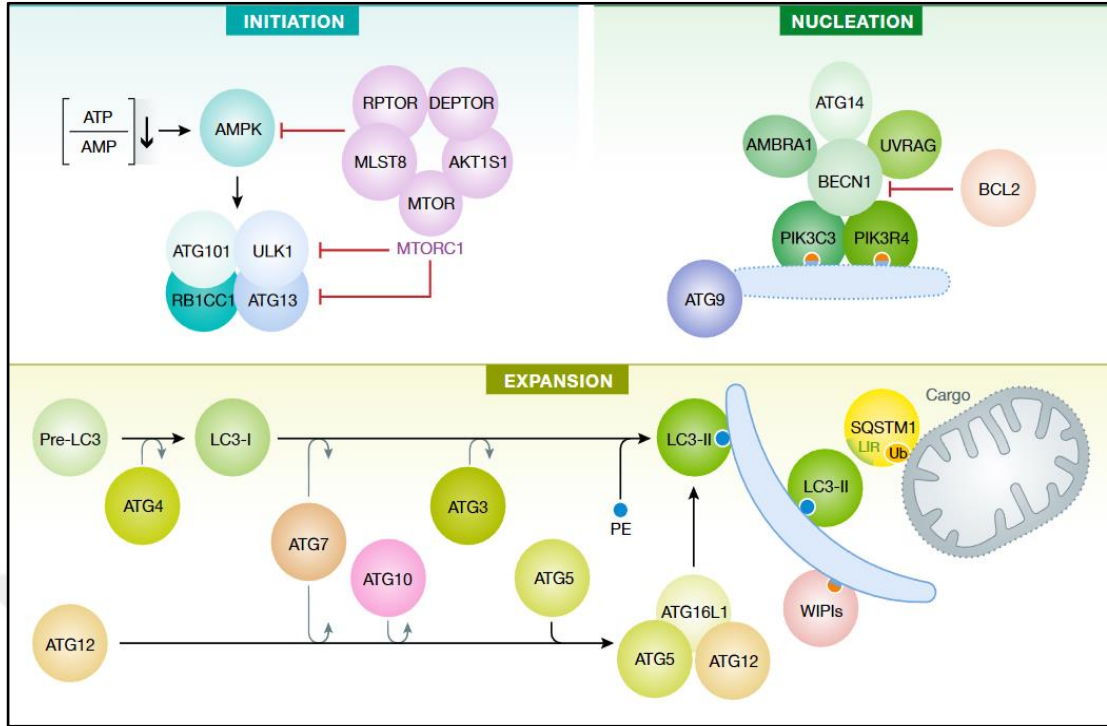
Otofaji, hücrelerin ölümünü engellemek için işleyen bir mekanizma olmasına rağmen yolağın aşırı çalışması durumunda hücre ölümüne sebep olabilmektedir. Otofaji genel hatlarıyla hücre içeriğinin lizozomlara yönlendirilmesi ile hücrenin hasarlı yapılarını temizlemesidir [60].

Otofaji, *makro-otofaji* ve *mikro-otofaji* olarak ikiye ayrılmaktadır. Makro-otofaji yıkılacak yapıların otofagozomla sarılmasıyla oluşurken, mikro-otofajide membranla sarılmaksızın yıkılacak yapılar lizozom membranı ile birleşmektedir [66].

Makro-otofaji ULK(unc-51-like autophagy-activating kinase) kompleksi aracılığıyla çift membran yapısı oluşumu ile başlayarak *membran uzaması* ve sırasıyla *otofagozom oluşumu*, otofagozomun lizozom ile birleşmesiyle *endozom oluşumu* ve içindeki yapıların *yıkımı* ile tamamlanır [60].

Otofaji mekanizması *başlangıç*, *nükleasyon* ve *genişleme* olarak üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.8).

- *Başlangıç aşaması* mTOR1'in (mechanistic target of rapamycin kinase 1) kontrolü altındadır. mTOR1, ULK1(unc-51-like autophagy-activating kinase 1) ve ATG13 (autophagy related protein 13) üzerinden inhibitör etki göstermektedir. Bu etkiyi AMPK (AMP-activated protein kinase) dengelemektedir. AMPK azalan ATP miktarına tepki olarak ULK1 ve BECN1'i (Beclin1) fosforillemektedir.
- *Nükleasyon aşamasında* ULK1, fosfatidilinozitol-3-kinaz aktivitesini multiprotein bir kompleks (BECN1, PIK3C3/VPS34 (phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit type 3), PIK3R4/VPS15 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4), ATG14, and NRBF2 (nuclear receptor binding factor 2)) üzerinden gerçekleştirmektedir.
- *Genişleme aşamasında* ATG ailesinden proteinlerin (ATG7-10-3-5) ubikutinlenme reaksiyonları sonucu LC3 proteini LC3-2 (LC3-B)'ye dönüşerek otofaji için reseptör haline gelmektedir. Oluşan otofagozom kapanarak lizozom birleşmekte *otolizozom* adını alarak yıkımı başlatmaktadır [67].



Şekil 2.8. Otofajinin başlangıç, nükleasyon ve uzama aşamalarında rol alan moleküller

Parkinson hastalığı ilişkili SNCA, LRRK2, GBA, ATP13A2, VPS35 gibi birçok gen hücrede otofaji mekanizmasında bozulmaya sebep olmaktadır. Bozulan otofaji mekanizmasını indüklemek birçok Parkinson hastalığı modelinde nöroprotektif etki sağlamaktadır [68].

Parkinson hastalığı oluşturulmuş hücre kültürü [69], fare [70] ve caenorhabditis elegans modellerinde [71] α -sinüklein kümelerinin otofaji ile temizlendiği gösterilmiştir. Otofajinin, endoplazma retikulumu stresi altında olan hücrede endoplazma retikulumu stresini azalttığını bildiren çalışmaların yanısıra Parkinson hastalığı Drosophila modelinde IRE1 α 'nın kronik aktivasyonunun JNK (Janus kinase) üzerinden nöronlarda otofajiyi arttırarak hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir [72, 73].

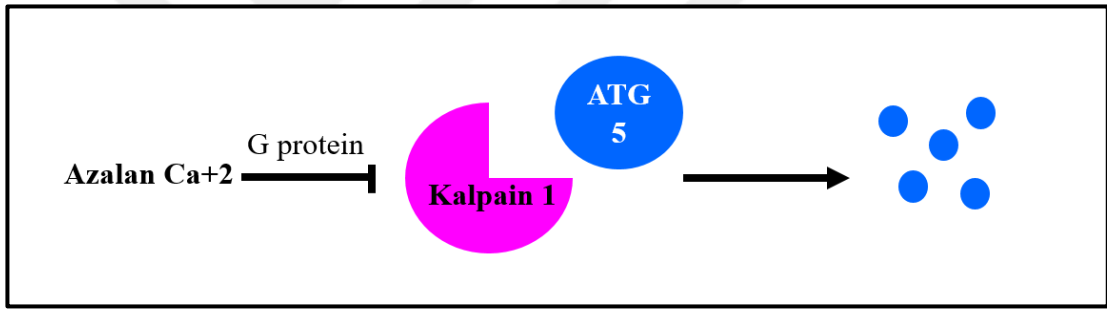
2.7. Fluspirilen

Şizofreni tedavisinde kullanılan L-tip kalsiyum kanal antagonisti antipsikotik bir ilaçtır. Hücre içi kalsiyum seviyesini düşürerek ATG5'in kalpain aracılı yıkımını ve

kalpain 1 üzerinden G protein aktivasyonunu engelleyerek otofajiyi artırıcı etki göstermektedir. (Şekil 2.9) [74].

Batten hastalığı (CLN3-Seroidlipofuskinosis) lizozomal depo hastalığında biriken agregatları fluspirilenin otofaji aracılığıyla temizlediği gösterilmiştir [75]. MCF7 hücre hattında da Fluspirilenin 20S proteozom aktivitesini artırarak α -sinükleinin yıkımını arttırdığı bildirilmektedir [76].

Fluspirilenin glioblastoma hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin bakıldığı bir çalışmada kullanılan tüm hatlarda (U251, SNB19, T98, U87) 2,5 μ M dozunda anti-proliferatif etkinlik göstererek hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir [77].

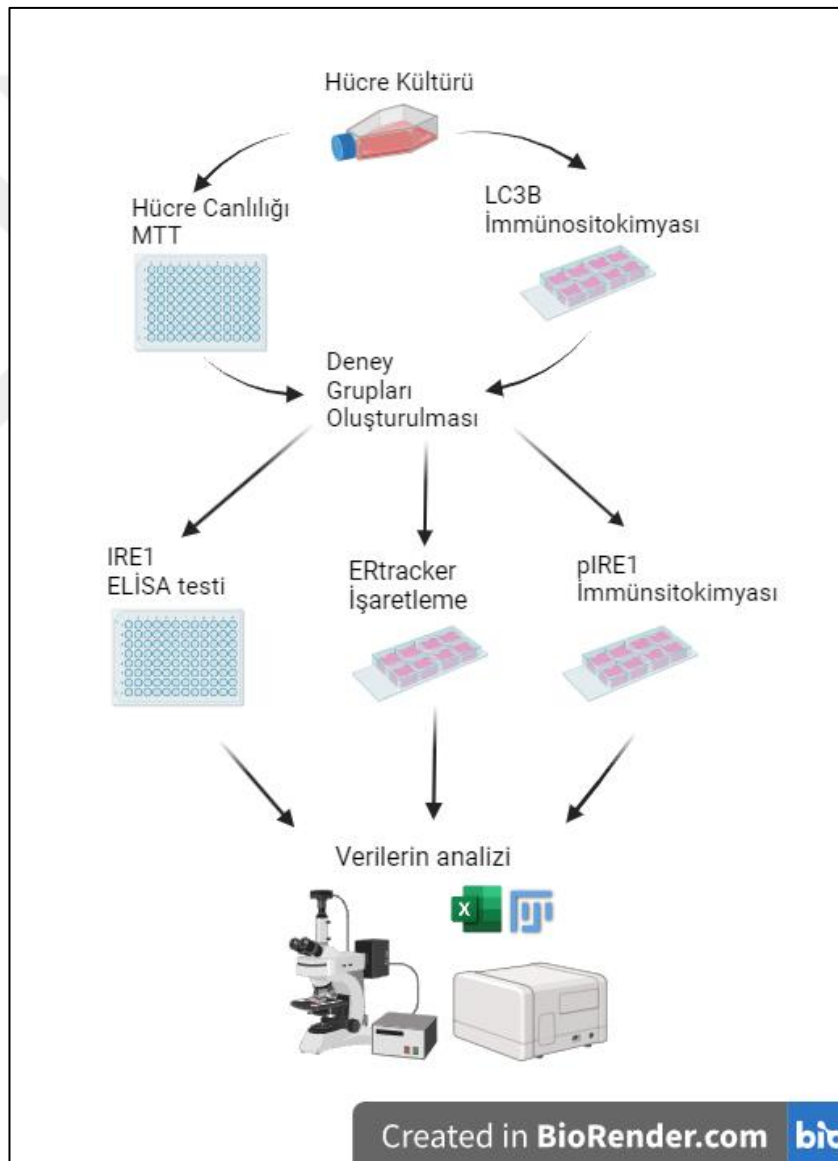


Şekil 2.9. Fluspirilenin etki mekanizması

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Tasarımı

Bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda deney ve kontrol gruplarını içeren gözlemsel bir çalışma planlanmıştır. Hipotezi test etmek amacıyla H4 insan nörogliona hücre hattına MPP+ toksini uygulanarak Parkinson modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu modelde otofaji aktivatörü Fluspirilen ile IRE1 aracılı endoplazma retikulumu stresi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Deneyin grupları ve tasarımı aşağıda verilmiştir (Tablo 3.1) (Şekil 3.1).



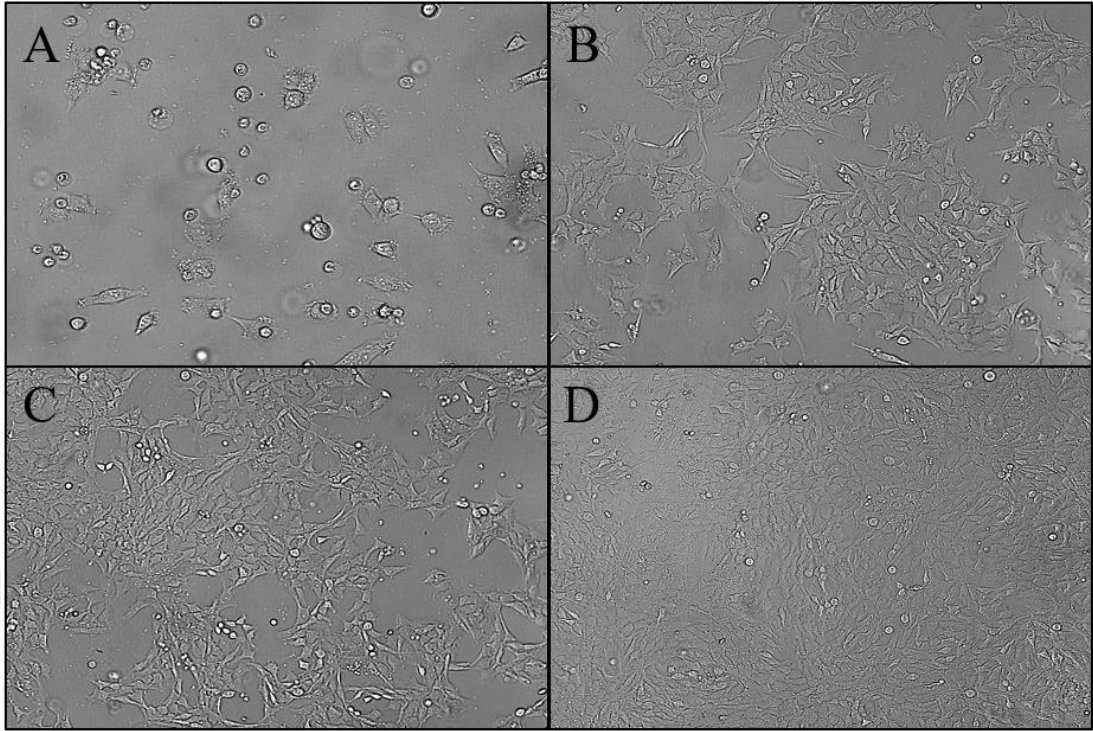
Şekil 3.1. Deneyin iş akışı

Gruplar	Hücre Hattı	MPP+ (1000µM, 24sa)	Fluspirilen (2,5 µM, 4sa)
Kontrol (K)	H4 insan nörogloma	-	-
Parkinson Hastalığı (PH)	H4 insan nörogloma	+	-
Otofaji (O)	H4 insan nörogloma	-	+
Parkinson Hastalığı+Otofaji (PHO)	H4 insan nörogloma	+	+

Tablo 3.1. Deney tasarımı

3.2. H4 İnsan Nörogloma Hücrelerinin Kültürü

H4 insan nörogloma hücreleri hızlı çoğalması, kolay üretilmesi, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması sebebiyle nörodejeneratif hastalık modellerinde sık kullanılan bir hücre hattıdır. H4 hücreleri sitoplazmik uzantıları olan ve bu nedenle farklı şekillerde gözlenen, büyük, bazıları çift çekirdekli tipik kanser hücreleridir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. H4 nörogloma hücre hattı faz kontrast mikroskobu görüntüsü; H4 nörogloma hücre hattı flask tabanına tutunmaya başlarken (A), %50 konfüle halde (B), %70 konfüle halde (C), %90 konfüle halde (D).

H4 insan nörogloma hücreleri (ATCC- Lot: 70008241), açılma protokollerine uygun olarak açıldıktan sonra laminar akımlı kültür kabinine alındı. mH4 insan nörogloma hücreleri T25 ve T75 flasklarda monolayer olarak kültüre edildi.

Hücreler için %10 FBS, %1 Penstrep ve yüksek glikozlu DMEM içeren besiyeri kullanıldı ve üç günde bir besiyeri değişimi yapıldı. H4 insan nörogloma hücreleri ortalama 6-7 günde flask tabanının %90'ını doldurdu.

%80-90 konflüens gösteren hücreler 5 dakika tripsin uygulamasından sonra kaldırıldı, santrifüjlenerek taze besiyeri ile pasajlandı. Deneyler hücrelerin 4. ve 5. pasajlarında gerçekleştirildi.

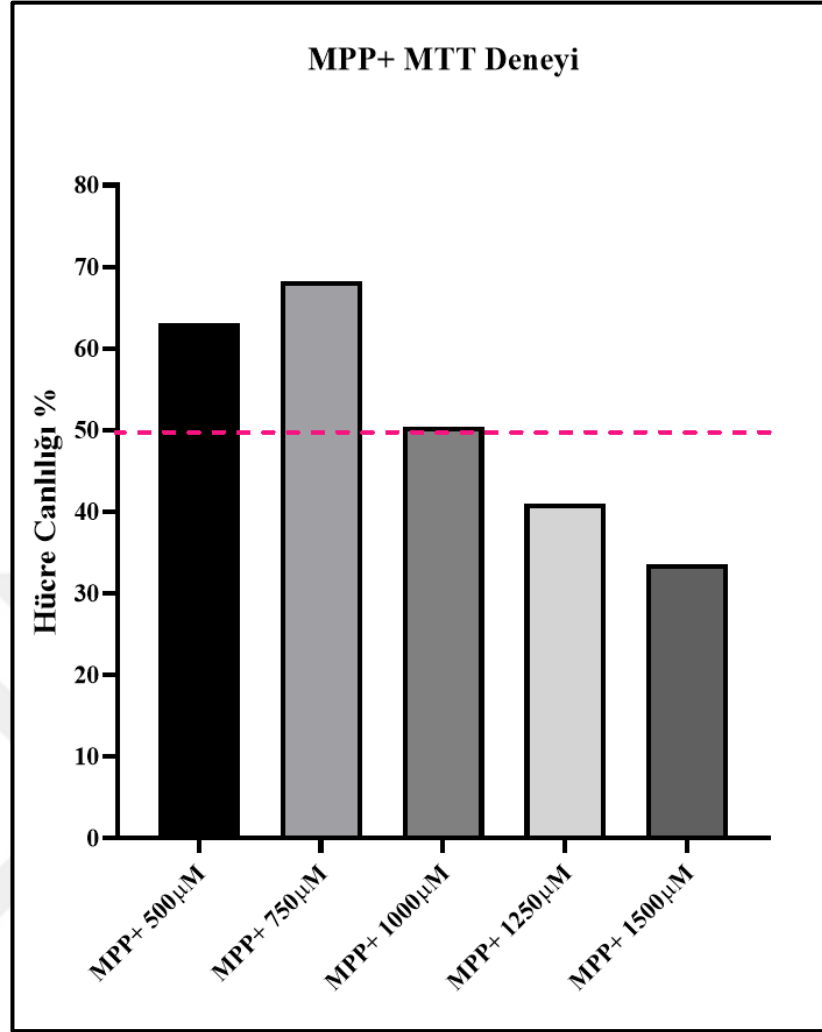
3.3. Hücre Canlılığı için MTT Testinin Uygulanması

MTT, hücre canlılığını ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Sarı renkli tetrazolyumun hücredeki NADPH aktivitesi sonucu mor renkli formazana dönüşmesi prensibine dayanmaktadır.

Her kuyuya 5.000 hücre olacak şekilde, 100'er µl besiyeri içeren 96 kuyulu plaklara hücreler ekildi. Hücrelerin tutunması için 24 saat beklendikten sonra deneye başlandı. MTT testi uygulamasında, 1:4 oranında seyreltilen MTT solüsyonundan her kuyuya 50'şer µl eklenerek 2 saat inkübatör şartlarında bekletildi. İnkübasyon sonunda MTT içeren besiyeri alınarak 150 µl ile MTT'nin aktivitesi durduruldu. Birkaç dakika flat shaker ile solüsyonun karışması sağlanırken kuyularda sarıdan mora renk dönüşümü gözlemlendi. 96 kuyulu plak 570nm'de Plate Readerda SoftMax Pro programında okutuldu.

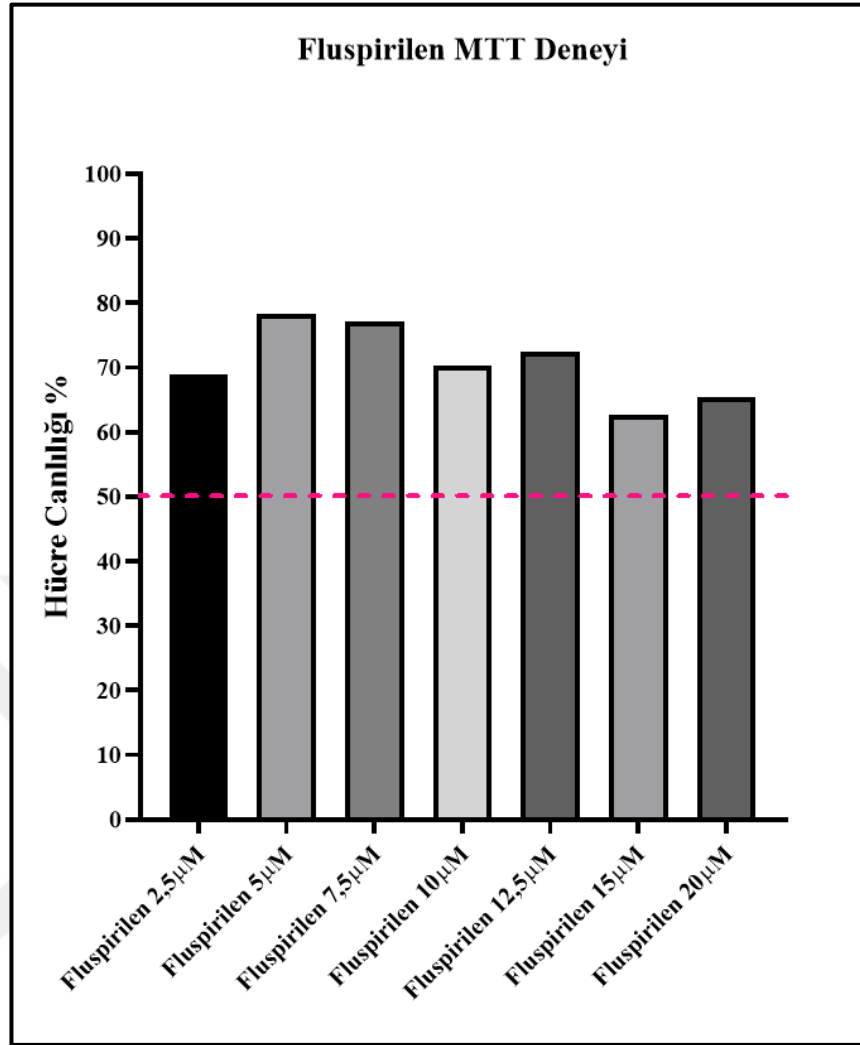
Bu çalışmada MTT testi, MPP+ ve Fluspirilenin farklı dozlarda uygulanması sonrasında hücre canlılıklarının değerlendirilmesi için yapıldı. MPP+ için literatür incelenmesi sonrasında inkübasyon süresi 24 saat [78], Fluspirilen için ise inkübasyon süresi 4 saat olarak belirlendi [79]. 96 kuyulu plakta tasarlanan deney üç tekrarla blank, kontrol ve belirlenen dozlarla oluşturulan gruplarla gerçekleştirildi.

MPP+ için 500-750-1000-1250-1500 µM dozlar hücre hattında denenerek MTT testi gerçekleştirildi. 1250 µM ve 1500 µM dozlarında hücre canlılığı %50 altında belirlendi, %50 ve üzerinde hücre canlılığının saptandığı 1000-1250-1500 µM dozlardan literatürdeki toksin çalışmaları göz önüne alınarak %50 canlılığın görüldüğü 1000 µM dozu deney için uygun görüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.3.Farklı dozlarda MPP+ uygulaması sonucunda H4 hücre hattında hücre canlılığında değişimler

Fluspirilen için 2,5-5-7,5-10-12,5-15-20 µM dozlar hücre hattında denenerek MTT testi gerçekleştirildi. Tüm dozlarda hücre canlılığının %50 üzerinde olduğu görüldü (Şekil 3.3). Hücre canlılığının %50'nin üstünde bulunduğu dozlardan literatürde H4 hattında otofajinin en yüksek seviyede görüldüğü Fluspirilen 2.5 µM dozu deney için uygun doz olarak belirlendi.



Şekil 3.4. Farklı dozlarda Fluspirilen uygulaması sonucu H4 hücre hattında hücre canlılığında değişimler

3.4. LC3B İmmünohistokimyası

Hücrelerde otofaji sürecinin başlangıç, ilerleme ve sonuçlanma aşamalarında birçok molekül görev almaktadır, sonuçlanma aşamasında görev alan LC3B molekülü otofagozom yüzeyindeki LC3'ün değişimiyle oluşmakta ve otofagozomun oluştuğunun göstergesidir.

İmmünohistokimya çalışması sekiz kuyulu, cam tabanlı chamberslidelarda gerçekleştirilmiş, primer antikor olarak Rabbit poliklonal LC3B (E-AB-65372 Elabscience) ve sekonder antikor olarak (Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) Elab Fluor®488) kullanılmıştır.

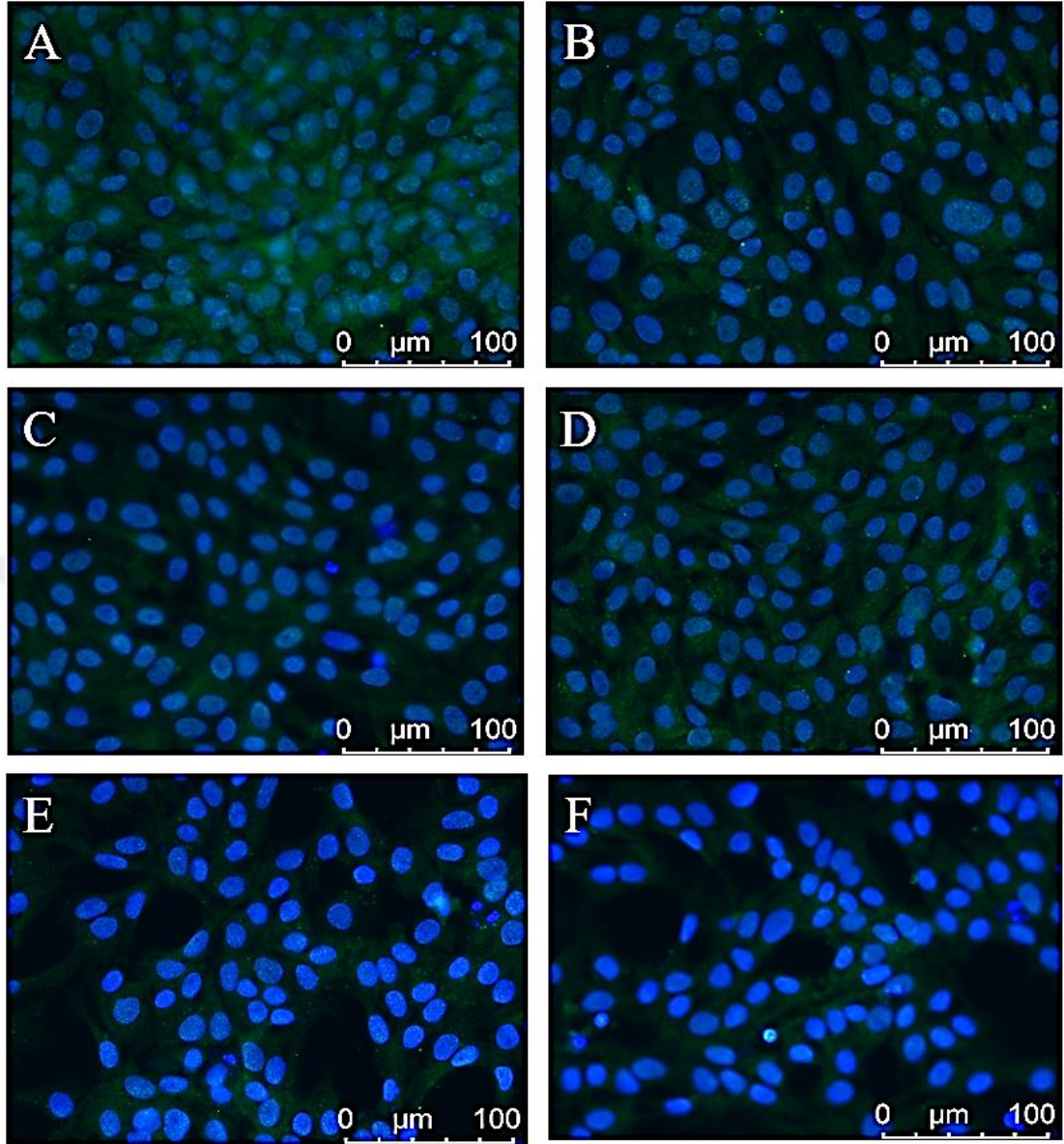
MPP+ için 500-750-1000-1250-1500 μ M dozlarda (Şekil 3.5), Fluspirilen için ise 2,5-5-7,5-10-12,5-15-20 μ M dozlarda (Şekil 3.6) gerçekleştirilen immünohistokimya deneylerinde kuyu başına ortalama 40.000 hücre ekilip bir gün tutunmaları beklendikten sonra deneye başlatıldı. MPP+ için literatür araştırması sonrasında inkübasyon süresi 24 saat, Fluspirilen için ise inkübasyon süresi 4 saat olarak belirlendi.

İnkübasyon süresi sonunda besiyeri atılarak hücreler üç kere beşer dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 5 dakika metanol ile tespit edildi.

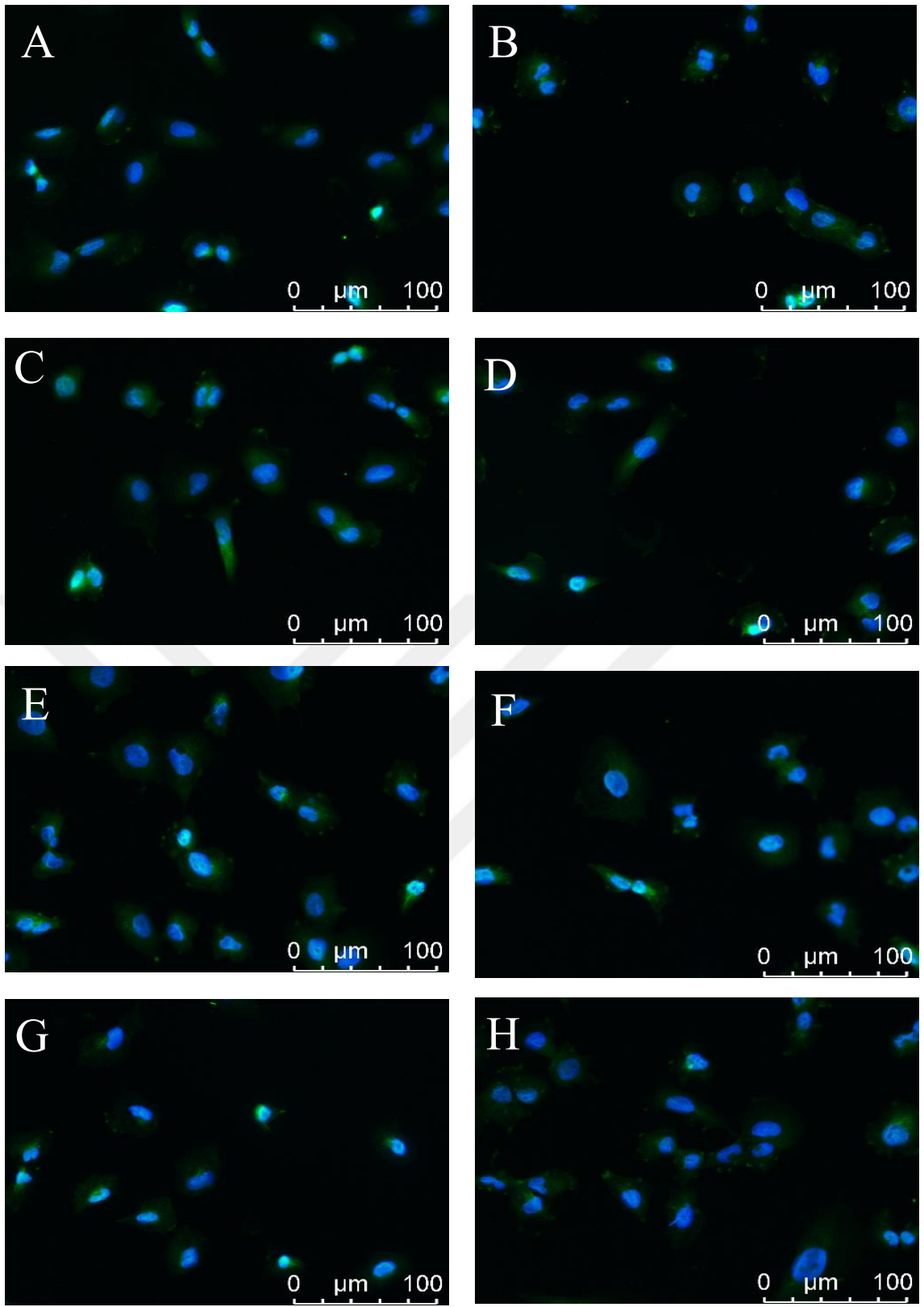
Tespit edilen hücreler üç kere beşer dakika PBS ile yıkandı. Hücrelerin permeabilizasyonu için üç dakika tritonX (10ml distile su içinde 10 μ l tritonX ve 0,01 gr sitrat) uygulandı. Hücreler tekrar üç kere beşer dakika PBS ile yıkandı.

Spesifik olmayan işaretlemeleri engellemek için hücreler 30 dakika boyunca %5 keçi serumu ile inkübe edildikten sonra serum alınarak LC3B primer antikorunda 1:500 konsantrasyonunda +4°de iki saat inkübe edildi.

Primer antikor alınarak hücreler yıkandı ve 1 saat süresince oda sıcaklığında 1:200 konsantrasyonunda sekonder antikorla inkübe edildi. Süre sonunda hücreler tekrar yıkanarak DAPI'li kapatma medyumunu ile kapatıldı.



Şekil 3.5. MPP⁺'nin farklı dozları için gerçekleştirilen LC3B immünohistokimya işaretleme (X400). Artan MPP⁺ dozlarında otofajinin azaldığı görülmekte: Kontrol (A), MPP⁺ 500μM (B), MPP⁺ 750 μM (C), MPP⁺ 1000 μM (D), MPP⁺ 1250 μM (E), MPP⁺ 1500 μM (F).



Şekil 3.6. Fluspirilenin farklı dozları için gerçekleştirilen LC3B immünositokimya işaretlemesi (X40). Fluspirilenin tüm dozlarında otofaji aktivasyonu görülmekte: Kontrol (A), Fluspirilen 2,5µM (B), Fluspirilen 5 µM (C), Fluspirilen 7,5 µM (D), Fluspirilen 10 µM (E), Fluspirilen 12,5 µM (F), Fluspirilen 15 µM (G), Fluspirilen 20 µM (H).

3.5. Dozların Karşılaştırılarak Deney Gruplarının Oluşturulması

Fluspirilen ajanının 2.5-5-7.5-10-12.5-15-20 μM dozları incelendiğinde otofajinin tüm dozlarda gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 3.6). Bu nedenle deneyler için hücre canlılığını en az etkileyen 2.5 μM dozunun kullanılmasına karar verildi.

MPP+ ajanının 500-750-1000-1250-1500 μM dozları incelendiğinde LC3B floresan yoğunluğunda azalma yani otofajinin inhibisyonu gözlemlendi (Şekil 3.5). Otofajideki inhibisyon, dozların artışı ile paralellik gösterirken hücre canlılığının %50 ve üstünde olduğu dozlar 500-750-1000 μM olduğundan dolayı literatürdeki bilgiler ışığında stresi oluşturacak fakat hücre canlılığını %50 altına düşürmeyecek olan en yüksek doz olan 1000 μM dozun deney için kullanılmasına karar verildi.

Sonuç olarak MTT ve immünohistokimya deneyleri sonucunda deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

- **Kontrol-** Sağlıklı H4 nörogloma hücreleri
- **Parkinson Hastalığı-** 1000 μM MPP+ uygulanmış H4 nörogloma hücreleri
- **Otofaji-** 2.5 μM Fluspirilen uygulanmış H4 nörogloma hücreleri
- **Parkinson Hastalığı+Otofaji-** 1000 μM MPP+ ve sonrasında 2.5 μM Fluspirilen uygulanmış H4 nörogloma hücreleri

3.6. ER-Tracker Boyaması

ER-Tracker Green (ThermoFisher 504/511 nm) boyası canlı ve tespit edilmiş hücrelerde ER görüntülenmesini sağlayan yeşil floroforlu bir boyadır. Boyanın içeriğindeki glibenclamide ER'de bulunan ATP'ye duyarlı K^+ kanallarının sülfonilüre reseptörlerine bağlanır.

ER-Tracker Green boyası firma önerileri doğrultusunda 200nM konsantrasyonda hazırlandı. Chamberslide üzerine kuyu başına ortalama 40.000 hücre ekilerek deney grupları oluşturuldu. Hücreler PBS ile üç kere yıkandıktan sonra %4 formaldehit ile 37°C 'de 2 dakika tespit edildi. Tekrar PBS ile iki kere daha yıkanan hücreler hazırlanan boya ile 37°C 'de 30 dakika inkübe edildikten sonra yıkandı ve DAPI'li mounting medium ile kapatıldı.

3.7. pIRE1 İmmünohistokimyası

Endoplazma retikulumu stresinin reseptörlerinden olan IRE1'in aktif hali fosforile formu olan pIRE1'dir. pIRE1 immünohistokimyası için primer antikor olarak Rabbit poliklonal Phospho-IRE1 (Ser724) (#AF7150 Affinity Biosciences) ve sekonder antikor olarak Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (Elab Fluor®488) kullanıldı.

Sekiz kuyulu chamberslide üzerine kuyu başına ortalama 40.000 hücre ekilerek 24 saat tutunması sağlanan hücrelerde deney grupları oluşturuldu. Tutunması gerçekleşen hücrelerin besiyeri alındıktan sonra üç kere beşer dakika PBS ile yıkandı. Sonrasında hücreler metanol ile 5 dakika tespit edildi.

Tespit edilen hücreler üç kere beşer dakika PBS ile yıkandı. Hücrelerin permeabilizasyonu için üç dakika tritonX (10ml distile su içinde 10µl tritonX ve 0,01 gr sitrat) uygulandı. Hücreler tekrar üç kere beşer dakika PBS ile yıkandı.

Spesifik olmayan işaretlemeleri engellemek için 30 dakika boyunca %5 keçi serumu ile bekletildikten sonra serum alınarak 1:100 konsantrasyonunda primer antikorda +4°de gece boyu inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda primer antikor alınarak hücreler PBS ile üç kere beşer dakika yıkandı ve 1 saat süresince oda sıcaklığında 1:200 konsantrasyonunda sekonder antikorla inkübe edildi.

Süre sonunda hücreler PBS ile üç kere beşer dakika yıkanarak DAPI'li kapatma medyumunu ile kapatıldı.

3.8. Total Protein Ölçümü

ELİSA ile ölçülecek olan Total IRE1'in standardizasyonu için kuyulardaki total protein ölçülerek Total IRE1'e oranlandı. Deney için seçilen dozlarla (MPP+ 1000 µM, Fluspirilen 2,5 µM) T25 flasklarda %80-90 konfluent olan hücrelerde deney grupları oluşturuldu. Ortalama 10⁶ hücre her grupta total protein ölçümü için kullanıldı.

Hücreler kazınarak fiziksel olarak flasklardan kaldırıldı. Hücrelerin kaldırılmasında hücrelerdeki protein miktarını etkilemesi sebebiyle tripsin kullanılmadı. 1200 rpmde 5 dakika santrifüjlendikten sonra oluşan pelete 250µl RİPA buffer, proteaz inhibitörü ve fosfataz inhibitörü buz üzerinde eklenerek 13000 rpmde 30 dakika santrifüjlendi.

Santrifüj sonrası üstte kalan lizat alındı. Lizattan her kuyuya 20µl konularak 3 tekrar ile total protein ölçümü BCA kiti (ABP Bioscience P011) ile 96 kuyulu plakta firma protokolleri doğrultusunda gerçekleştirildi ve 562nm dalga boyunda Softmax Pro Plate Reader ile okutuldu.

3.9. ELİSA Deneyinin Yapılması

Deney için seçilen dozlarla (MPP+ 1000 µM, Fluspirilen 2,5 µM) T25 flasklarda %80-90 konfluent olan hücrelerde deney grupları oluşturuldu. Ortalama 10⁶ hücre her grupta Total IRE1 ELİSA ölçümü için kullanıldı.

Hücreler DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile kazınarak flasklardan kaldırıldı. 1200 rpmde 5 dakika santrifüjlendikten sonra oluşan pelete 250µl RİPA buffer ve proteaz inhibitörü ve fosfataz inhibitörü buz üzerinde eklenerek 13000 rpmde 30 dakika santrifüjlendi.

Santrifüj sonrası üstte kalan lizat alındı. Lizattan her kuyuya 200µl konularak 3 tekrar ile IRE1 ELİSA testi (ELK 4393) 96 kuyulu plakta firma protokolleri doğrultusunda gerçekleştirildi ve 450nm dalga boyunda Softmax Pro Plate Reader ile okutuldu.

3.10. İmmünohistokimya Deneyleri ve ER-Tracker Boyama Sonucu Elde Edilen Görüntülerin Image J ile Analizi

Görüntülemeye hazır hale getirilen hücreler Leica DM6000 B floresan mikroskobu ile değerlendirilerek Leica DCF7000 T kamera ile fotoğraflandı. DAPI ve FITC kanalından görüntüler kaydedildi. Her grupta 5 alandan X40 ve X63lük objektifler ile görüntüler alındı.

3.11. Verilerin Analizi

İmmünotokimya işaretlemelerde görüntüler analiz için ImageJ 1.53j programına aktarıldı. Hücre başına düşen düzeltilmiş ortalama ışımaya yoğunluğu için her gruptan 25 hücrede *Düzeltilmiş Hücredeki Toplam Floresan Yoğunluğu (Corrected Total Cell Fluorescence ,CTCF)* hesaplandı:

Entegre Yoğunluk – (Seçilen hücrenin alanı X Arka planın ortalama floresans yoğunluğu)

Total protein testinin analizleri Excell ile gerçekleştirildi. Protein konsantrasyonları ve karşılık gelen absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafikten denklem ve R² değerleri elde edilerek her kuyuda absorbansa karşılık gelen protein konsantrasyonu bulundu.

Total IRE1 ölçümü için ELİSA analizleri Excell ile gerçekleştirildi. Elisa sonuçları hesaplanırken total IRE1 standardizasyonu için her bir kuyunun IRE1 değeri o kuyudaki total proteine oranlanarak yüzdelik değerler hesaplandı ve grafiğe döküldü.

$$\text{IRE1 konsantrasyonu} / \text{Total Protein konsantrasyonu} \times 100$$

Hücrelerde IRE1 ilişkili endoplazma retikulumu stresini yorumlayabilmek için IRE1'in aktif formu olan pIRE1 seviyelerinin gruplar arasında standardizasyonu yapılmıştır:

$$pIRE1(AU) / \text{Total IRE1}(ng/ml) \times \text{Total Protein}(mg/ml) \times 1000$$

LC3B immünotokimya işaretlemesinde otofaji indeksi için her gruptan 10'ar alan fotoğraflandı. Her alanda otofaji görülen hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak otofaji indeksi yüzdesi hesaplandı.

$$\text{Otofaji İndeksi \%} = \frac{\text{Alandaki Otofagozom görülen hücre sayısı}}{\text{Alandaki toplam hücre sayısı} \times 100}$$

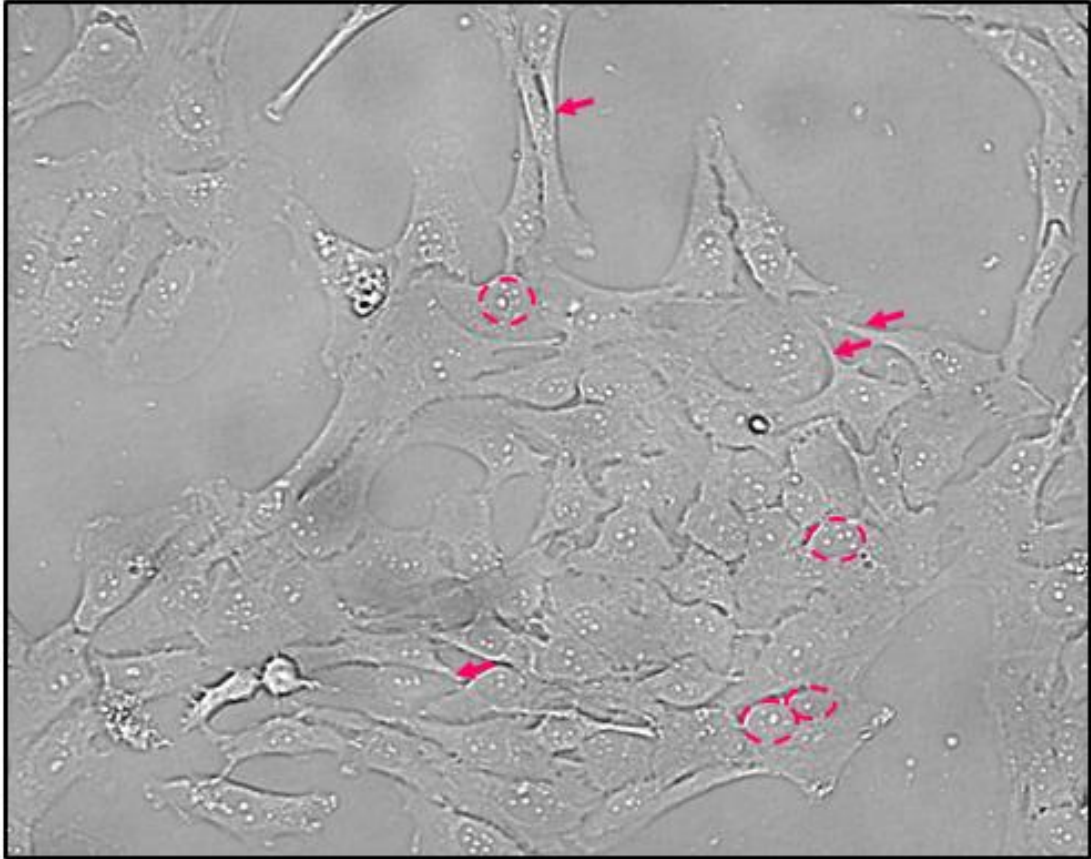
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS ver.25 yazılımı kullanıldı. Gruplar için her deneyde düzeltilmiş p değerleri hesaplandı ve p<0,05 anlamlı kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde non-parametrik test olan Kruskal-Wallis, parametrik değerlerin hesaplanmasında Tukey ve Games Howell testleri kullanıldı. Gruplar

arasında ikili karşılaştırma testi yapıldı. Sonuçların grafiklendirilmesi için GraphPad Prism 8 programı kullanıldı.



4. BULGULAR

H4 nörogloma hücre hattı insan kökenli bir kanser hattı olup hücreler nöron benzeri uzantılarla karakterizedir, uzantıları sayesinde flask tabanına ve diğer hücelere tutunması oldukça güçlüdür.



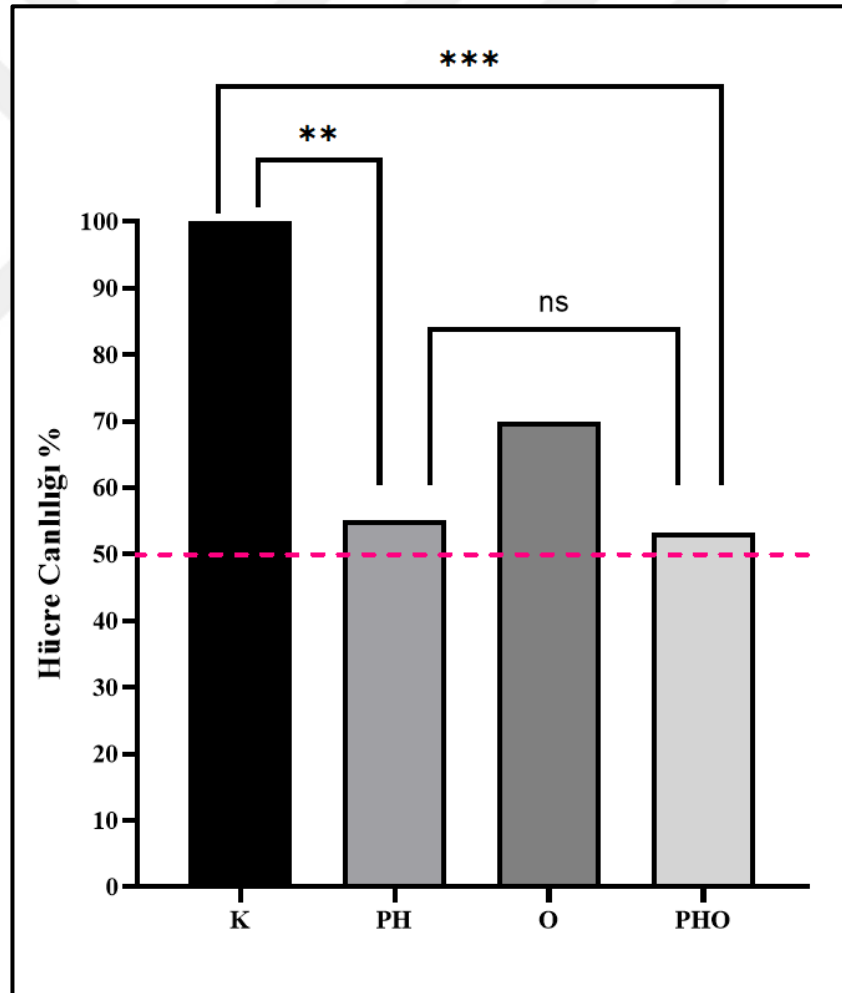
Şekil 4.1. H4 nörogloma hücre hattı faz kontrast mikroskobu altında görüntüsü. Çift çekirdek veya tek çekirdek daire içinde gösterilmiş, nöron benzeri uzantıları oklar ile gösterilmiştir. (X200)

H4 hücreleri büyük ökromatik çekirdeklere sahip, belirgin çekirdekçikleri olan ve sitoplazmalarında granülleri bulunan hücrelerdi. Kanser hücresi özelliğinden dolayı hızlı mitotik aktivite göstermekteydiler ve bazı hücrelerin iki çekirdekli olduğu dikkati çekti. Epitelyal karakterde olan H4 hücreleri konfluent olduğunda kaldırım taşı görünümünde olarak izlendi, hücreler sitoplazmik uzantılarını korumakta idi (Şekil 4.1).

4.1. MTT Hücre Canlılığı Deneyi

4.1.1. PH ve PHO grupları arasında hücre canlılığında farklılık saptanmamıştır.

MTT hücre canlılığı deneyi sonucunda oluşturulan deney gruplarında hücre canlılığı ortalamaları Parkinson Hastalığı grubunda %55.1, Otofaji grubunda %69.9 Parkinson Hastalığı + Otofaji grubunda ise %53.3 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırma sonuçlarında Kontrol-Parkinson Hastalığı ($p=0,0032$) ve Kontrol-Parkinson Hastalığı + Otofaji ($p=0,0009$) grupları arasında anlamlı fark bulundu. Parkinson grubu ve Parkinson Hastalığı + Otofaji grubu arasında hücre canlılığında anlamlı fark görülmemiştir (Şekil 4.2). (Grupların standart sapmaları Parkinson Hastalığı:8.085, Otofaji: 3.784, Parkinson Hastalığı+Otofaji: 6.362 olarak bulunmuştur.)



Şekil 4.2. Gruplar arasında hücre canlılığı değişimleri; Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaji (O), Parkinson Hastalığı + Otofaji (PHO).

4.2. LC3B İmmünohistokimyası

Otofaji belirteci olan LC3B immünohistokimyası sonrası kontrol ve deney gruplarında LC3B immünoaktivitesi ölçüldü ve otofagozom indeksi hesaplandı.

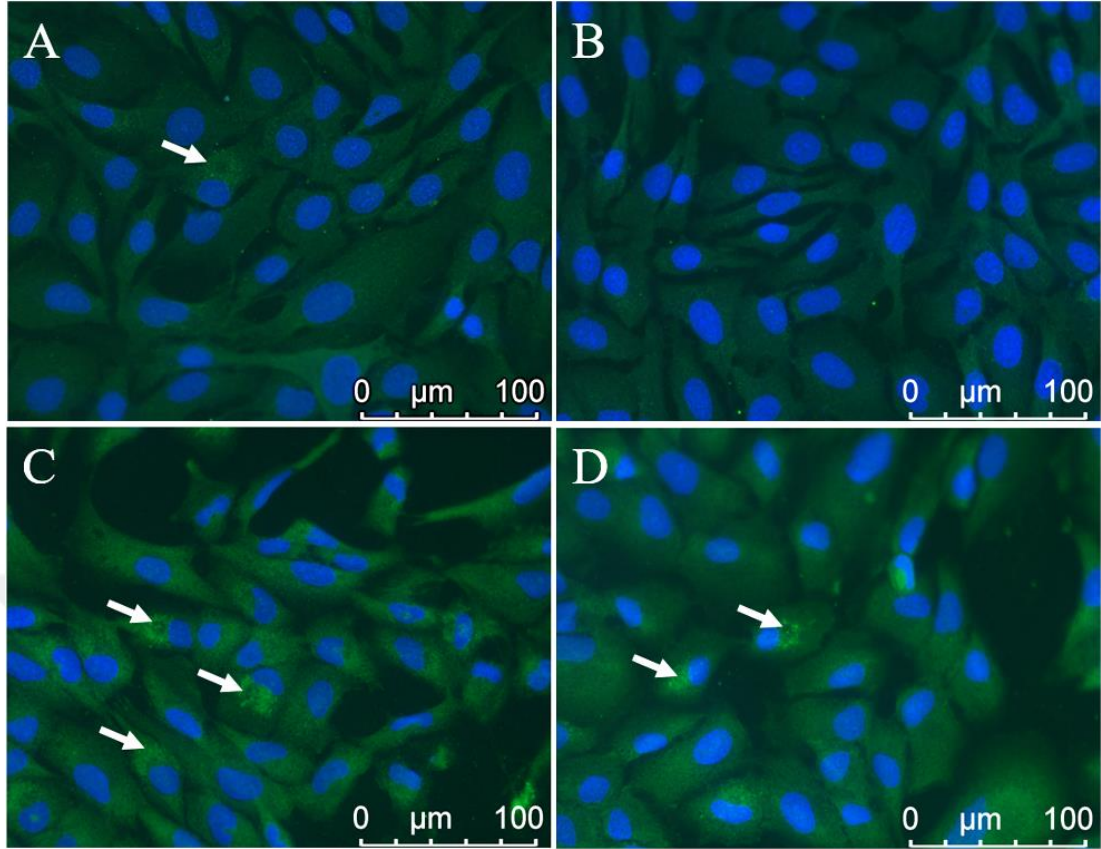
4.2.1. PHO grubunda otofagozom sayısında artma görüldü.

Kontrol grubundaki hücrelerin sitoplazmik uzantılarının birbirleri ile temas halinde oldukları, ökromatik çekirdeklere sahip oldukları gözlemlendi. Kontrol grubunda hücrelerin bazılarında az sayıda otofagozomlar izlendi (Şekil 4.3A, Şekil 4.4A).

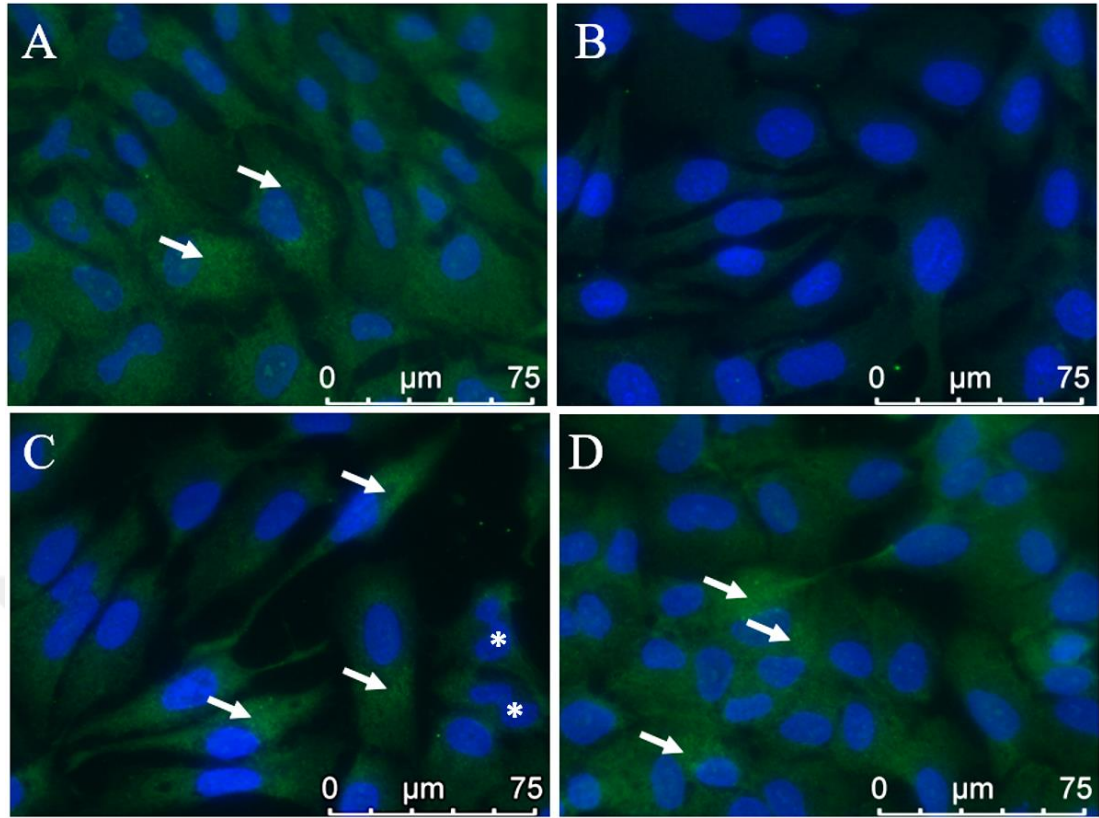
Parkinson Hastalığı grubunda kontrol grubuna göre LC3B immünoaktivitesinde ve otofagozom görülen hücre sayısında azalma gözlemlendi. Bu gruptaki hücrelerde, hücrelerin hacimlerinde azalma gözlenirken daha iğsi görünüme sahip oldukları görüldü. Hücrelerin çekirdeklerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmadı (Şekil 4.3B, Şekil 4.4B).

Otofaji grubunda kontrol grubuna göre otofagozom içeren hücre sayısında artış gözlemlendi. Bu gruptaki hücrelerin çekirdeklerinde otofajiye bağlı parçalanma ve şekil değişiklikleri izlendi. Hücrelerin görünüşleri ve sitoplazmik uzantıları kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 4.3C, Şekil 4.4C).

Parkinson Hastalığı+Otofaji grubundaki hücrelerde Parkinson Hastalığı grubuna göre otofagozom içeren hücre sayısında artma gözlemlendi. Hücrelerin şekilleri kontrol grubundaki hücrelere benzerdi, hücreler çok sayıda nöron benzeri sitoplazmik uzantıya sahipti ve bu uzantılar aracılığıyla birbirleri ile bağlantılı oldukları görüldü. Hücrelerin çekirdeklerinde şekil bozukluğu gözlenmedi. Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda Otofaji grubuna benzer sayıda otofagozom görüldü (Şekil 4.3D, Şekil 4.4D).



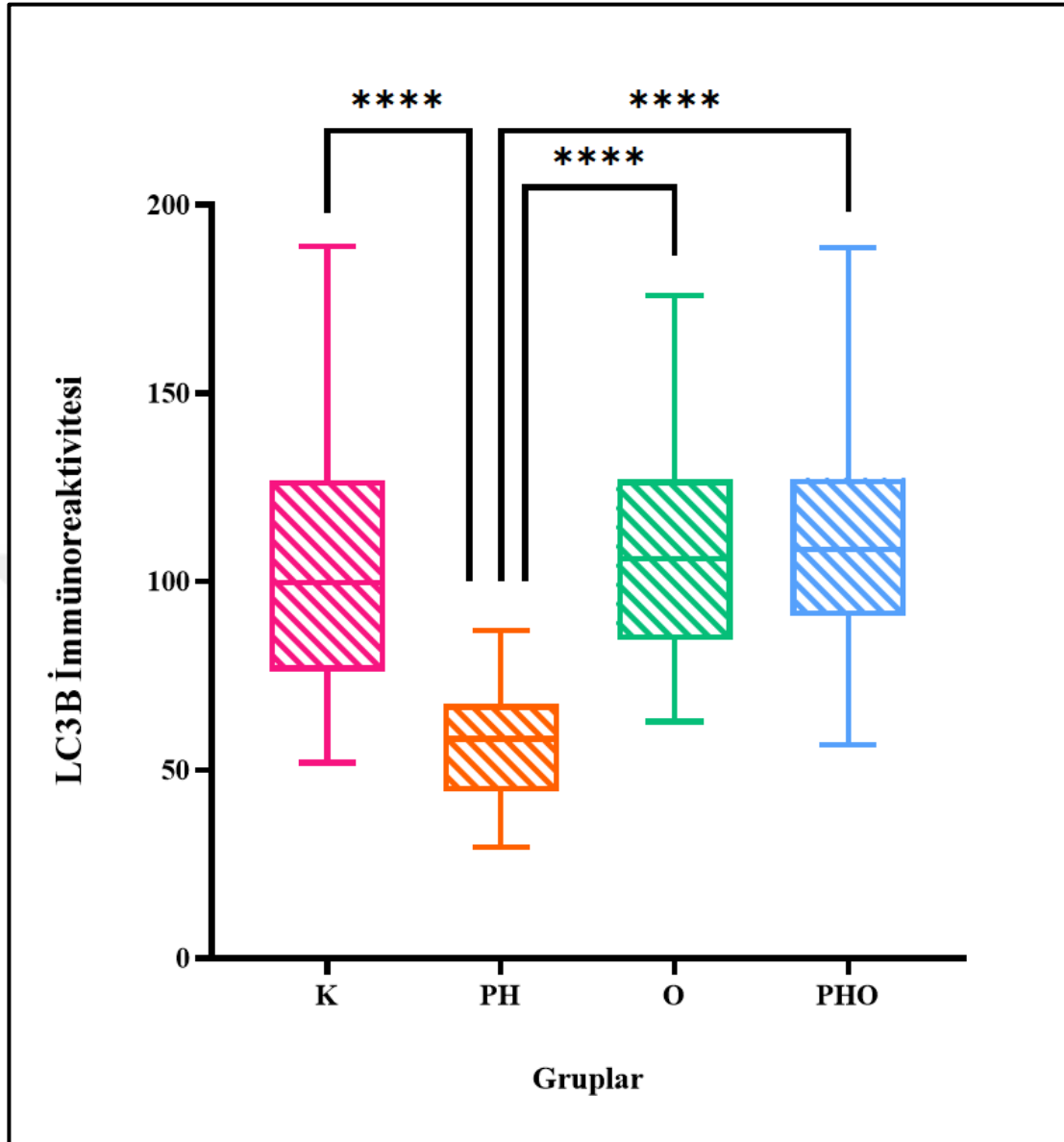
Şekil 4.3. LC3B immünohistokimya işaretlemeşi. Kontrol (A), Parkinson Hastalığı (B), Otofaji (C), Parkinson Hastalığı+Otofaji (D) (X400). Otofagozomlar oklar ile gösterilmiştir.



Şekil 4.4. LC3B immünohistokimya işaretlemesi. Kontrol (A), Parkinson Hastalığı (B), Otofaji (C), Parkinson Hastalığı+Otofaji (D) (X630). Otofagozomlar oklar ile gösterilmiştir. Otofaji grubunda çekirdekte parçalanmalar (yıldız) vardı.

4.2.2. PH grubunda LC3B immünoaktivitesi azalmıştır.

LC3B immünoaktivitesi ölçümlerinin sonucunda Parkinson grubunda tüm gruplara göre LC3B immünoaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. Parkinson Hastalığı-Kontrol ikili karşılaştırması $p=0,00$, Parkinson Hastalığı-Otofaji $p=0,00$, Parkinson Hastalığı- Parkinson Hastalığı+Otofaji grupları ikili karşılaştırması $p=0,00$ olarak bulundu. (Grupların standart sapmaları Kontrol:35.22, Parkinson Hastalığı:15.87, Otofaji:27.96, Parkinson Hastalığı+Otofaji:32.51 olarak bulunmuştur.) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. LC3B floresan yoğunluğu ölçüm sonuçları; Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaji (O), Parkinson Hastalığı + Otofaji (PHO)

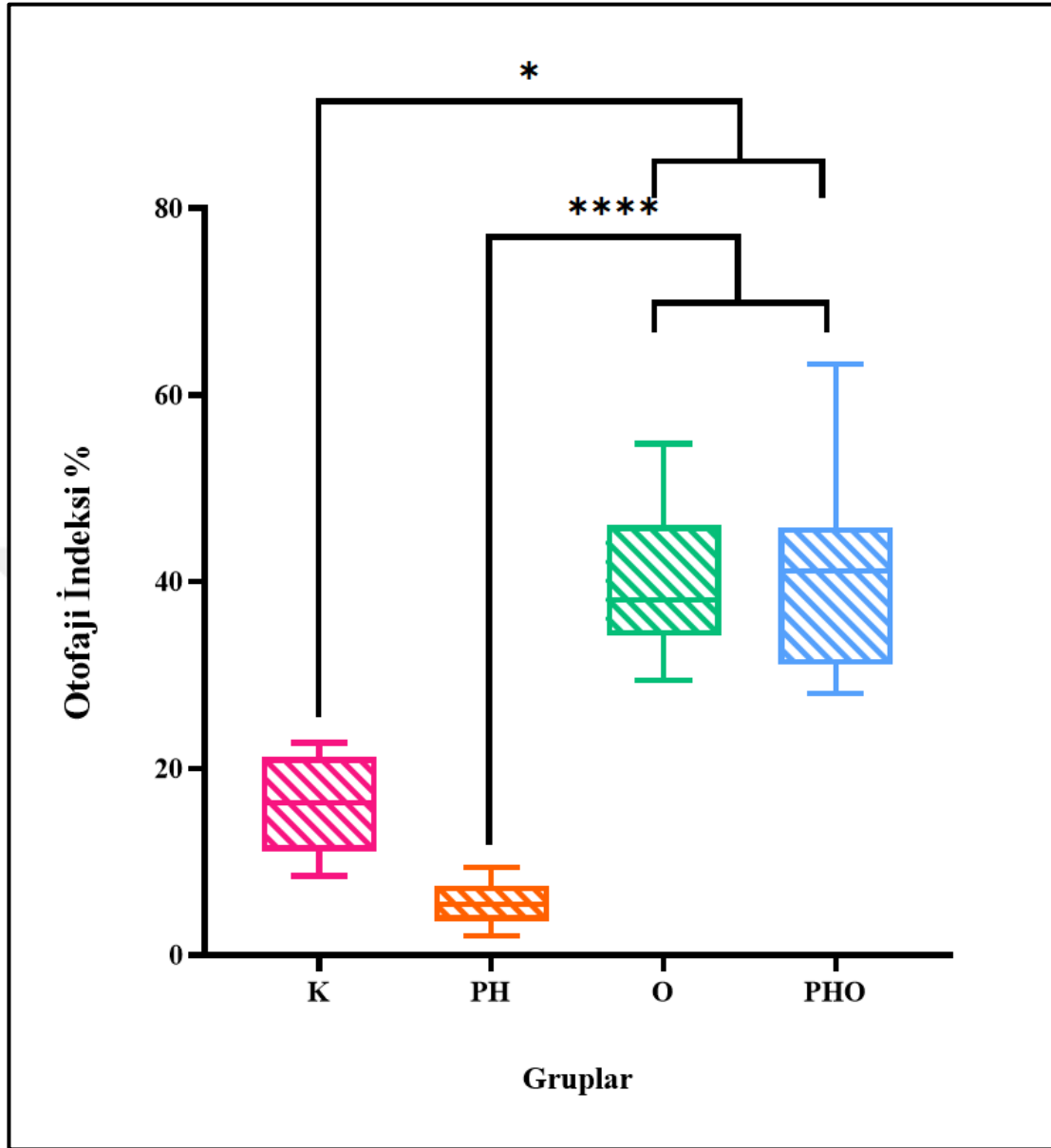
4.2.3. Otofaji indeksi PHO grubunda artmıştır.

Otofagozom görülen hücre sayısının total hücre sayısına oranlanması ile elde edilen otofaji indeksi ile gruplarda otofaji görülen hücre yüzdesi hesaplandığında; kontrol grubunda hücrelerin %16'sında, Parkinson Hastalığı grubunda %6'sında, otofaji grubunda %40'ında, Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda ise hücrelerin %40'ında otofagozom gözlemlendi (Şekil 4.6).

Gruplarda elde edilen sonuçlara göre Parkinson Hastalığı grubuna göre Otofaji grubunda otofaji indeksinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p= 0,00$). Parkinson Hastalığı grubuna göre Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda da otofaji indeksindeki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,00$) (Şekil 4.6).

Kontrol grubuna göre Otofaji grubunda otofaji indeksi istatistiksel olarak anlamlı artmıştı ($p=0,022$). Kontrol grubuna göre Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda da otofaji indeksi anlamlı olarak artmış bulundu ($p=0,022$) (Grupların standart sapmaları Kontrol: 5.235, Parkinson Hastalığı: 2.272, Otofaji: 7.954, Parkinson Hastalığı+Otofaji: 10.77 olarak bulunmuştur.)(Şekil 4.6).





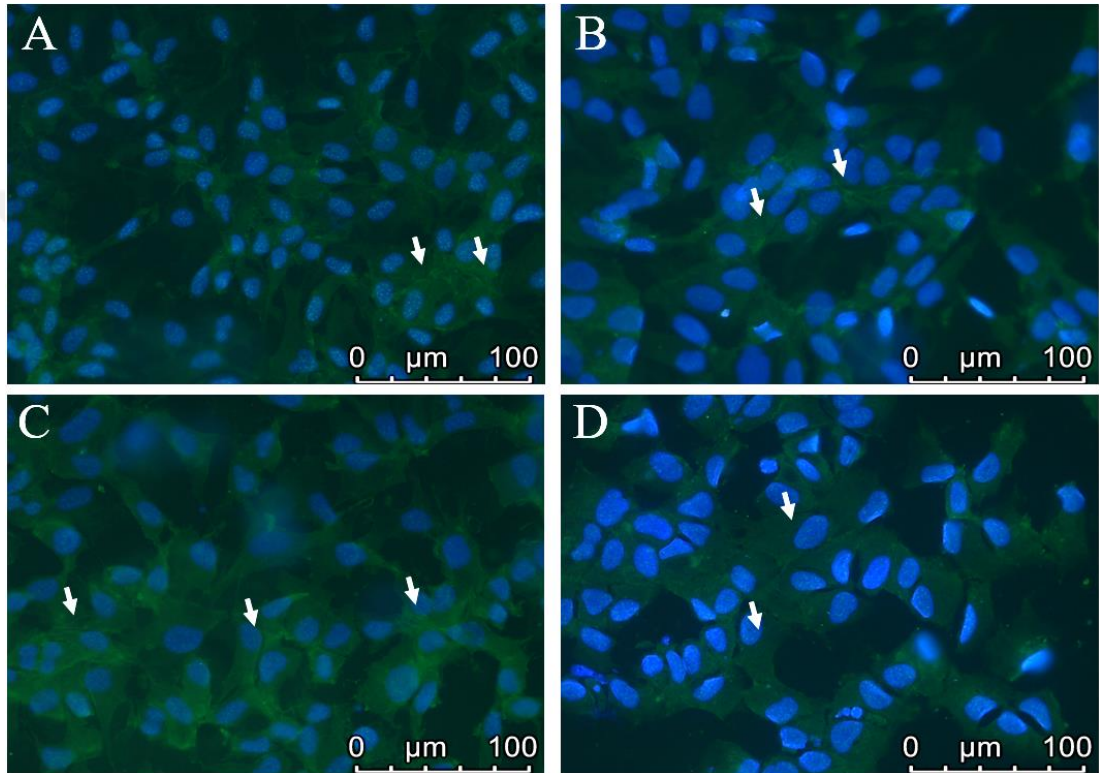
Şekil 4.6. Gruplarda otofaji indeksinin karşılaştırılması; Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaji (O), Parkinson Hastalığı + Otofaji (PHO)

4.3. pIRE1 İmmünohistokimyası

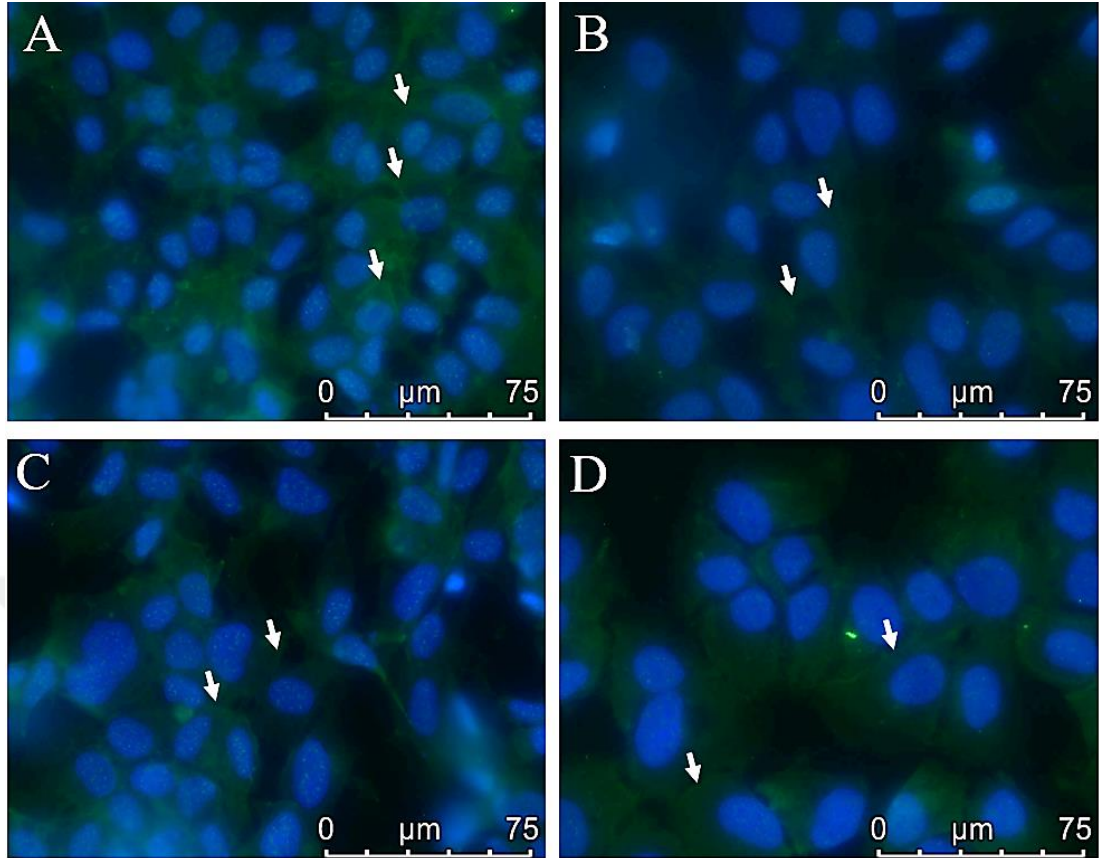
Endoplazma retikulumu stresini değerlendirmek için stres reseptörlerinden biri olan IRE1'in aktif hali olan pIRE1'in gruplarda immünohistokimyası gerçekleştirildi.

4.3.1. pIRE1 immünoaktivitesi hücrelerin birbirleri ile bağlantı kurdukları bölgelerde daha yoğun olarak izlendi.

pIRE1 immünoaktivitesi tüm gruplarda hem sitoplazma hem de çekirdekte gözlemlendi, immünoaktivitenin hücrelerde homojen bir şekilde dağıldığı dikkati çekti. Hücrelerin birbirleri ile bağlantı kurdukları bölgelerde yoğunlaşmalar göstermektedir (Şekil 4.7, Şekil 4.8).



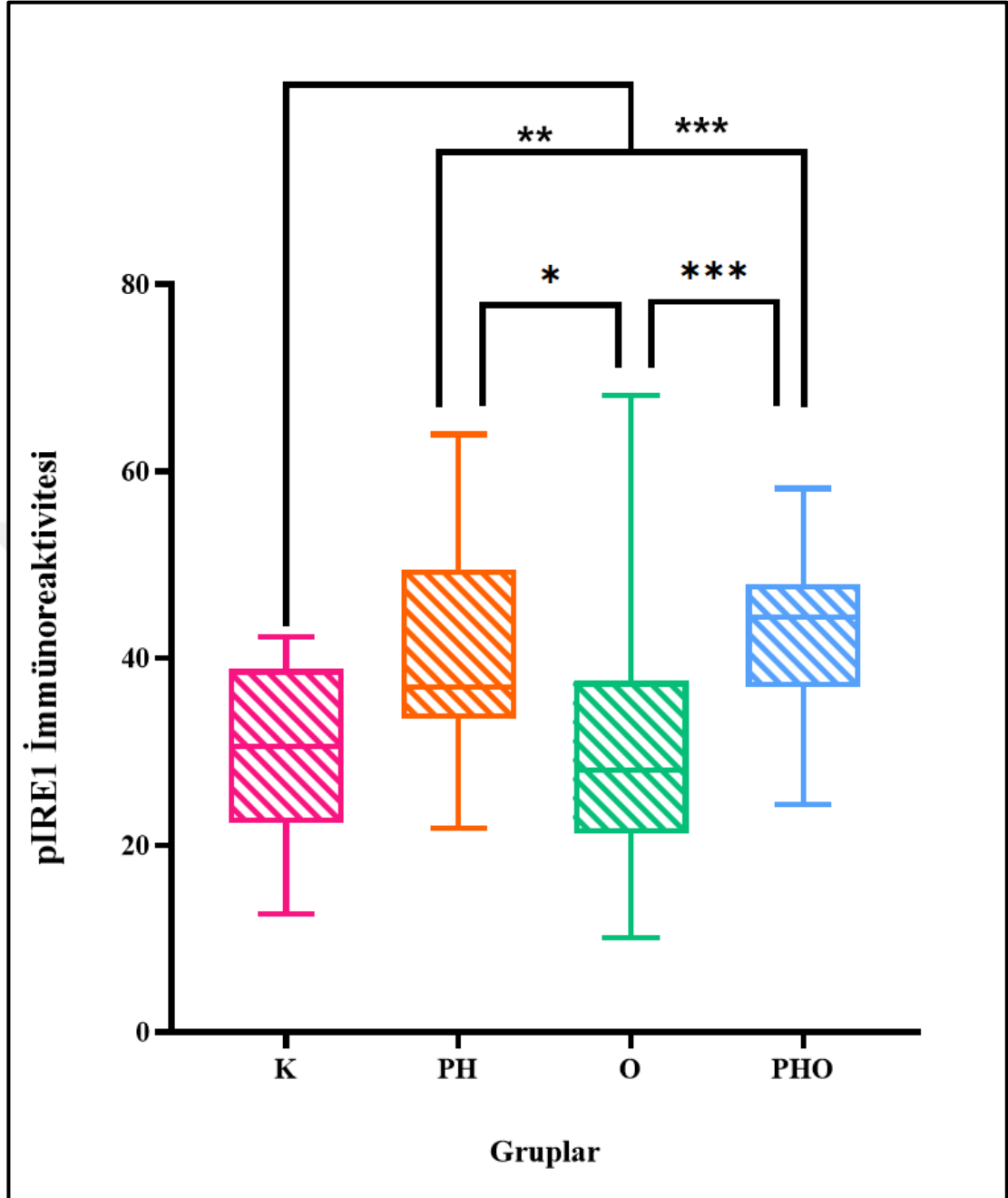
Şekil 4.7. pIRE1 immünoaktivitesi işaretlenmesi (X400). Kontrol (A), Parkinson Hastalığı (B), Otofaj (C), Parkinson Hastalığı+Otofaj (D) Hücrelerin birbirleri ile temas ettikleri bölgelerde immünoaktivitede artış (oklar).



Şekil 4.8. pIRE1 immünohistokimya işaretlenmesi (X630). Kontrol (A), Parkinson Hastalığı (B), Otofaji (C), Parkinson Hastalığı+Otofaji (D) Hücrelerin birbirleri ile temas ettikleri bölgelerde immunoreaktivitede artış (oklar).

4.3.2. pIRE1 immünoreaktivitesi PH ve PHO gruplarında artmıştır.

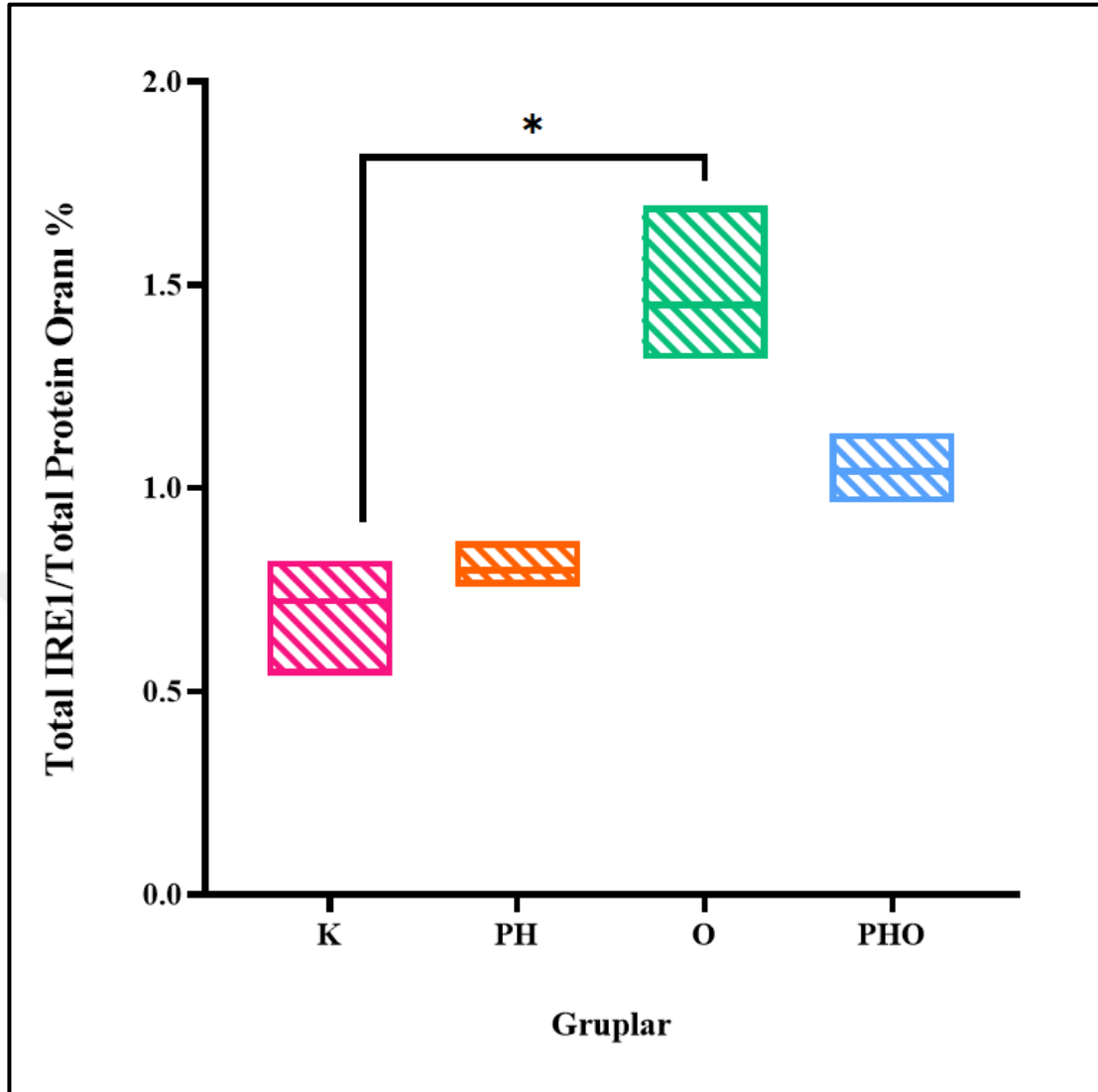
İkili karşılaştırma istatistiksel analiz sonucunda Kontrol - Parkinson Hastalığı ($p=0,0052$), Kontrol - Parkinson Hastalığı+Otofaji ($p=0,0004$), Parkinson Hastalığı - Otofaji ($p=0,0107$), Otofaji - Parkinson Hastalığı+Otofaji ($p=0,0009$) grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur. (Grupların standart sapmaları Kontrol: 5.235, Parkinson Hastalığı: 2.272, Otofaji: 7.954, Parkinson Hastalığı+Otofaji: 10.77 olarak bulunmuştur.)(Şekil 4.9).



Şekil 4.9. pIRE1 immünoaktivitesi ölçüm sonuçları; Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaji (O), Parkinson Hastalığı + Otofaji (PHO)

4.3.3. Endoplazma retikulumu stresi PHO grubunda azalmıştır.

Total IRE1 düzeyini standardize etmek için ELİSA ile ölçülen total IRE1 ile aynı kuyulardan ölçülen total protein konsantrasyonu oranlandı (Şekil 4.10).



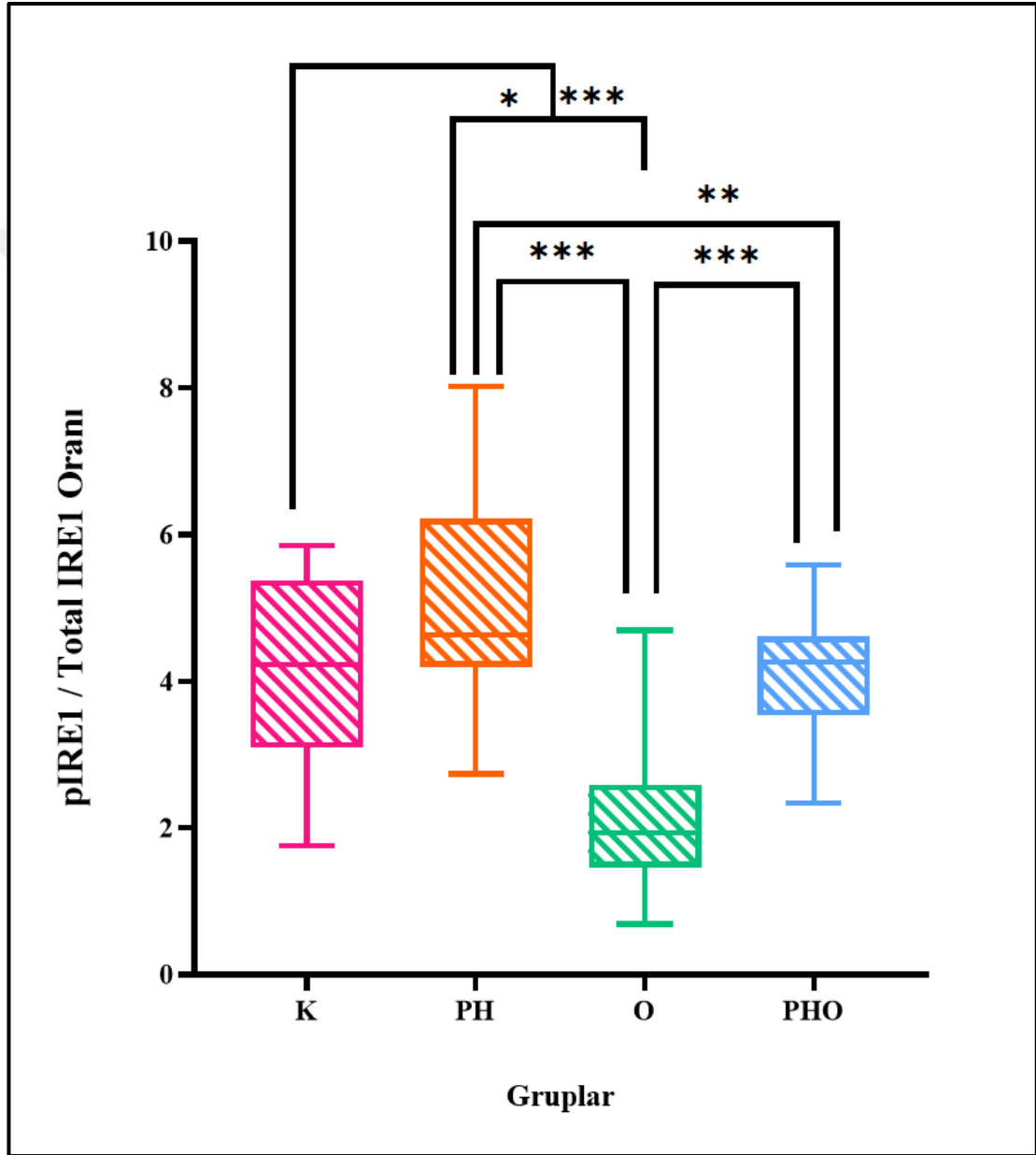
Şekil 4.10. Total IRE1'in total proteine oranı; Gruplarda total IRE1'in total proteine oranı değişkenlik göstermektedir. (Kontrol-Otofaji ikili karşılaştırma $p=0,055$) Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaji (O), Parkinson Hastalığı + Otofaji (PHO)

Elde edilen standardize total IRE1 değeri ve pIRE1 immünoaktivitesi kullanılarak IRE1 ilişkili endoplazma retikulumu stresi hesaplandı. IRE1 ilişkili endoplazma retikulumu stresini ölçmek için kullanılan formül şu şekildedir:

$$pIRE1(AU) / Total IRE1(ng/ml) \times Total Protein(mg/ml) \times 1000$$

Gruplarda ikili karşılaştırma sonuçlarında Kontrol - Parkinson Hastalığı ($p= 0,0052$), Kontrol - Parkinson Hastalığı+Otofaji ($p= 0,0004$), Parkinson Hastalığı - Otofaji ($p=$

0,0107), Otofaji - Parkinson Hastalığı+Otofaji ($p= 0,0009$) grupları arasında anlamlı fark bulundu. Kontrol ve Parkinson Hastalığı+Otofaji grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. (Grupların standart sapmaları Kontrol: 1.214, Parkinson Hastalığı: 1.309, Otofaji: 0.8880, Parkinson Hastalığı+Otofaji: 0.7924 olarak bulunmuştur.) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. pIRE1/Total IRE1 oranının ölçümü; Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaji (O), Parkinson Hastalığı + Otofaji (PHO)

4.4. ER-Tracker Boyaması

Endoplazma retikulumunun yapısını inceleyebilmek için glibenclamide içeriğiyle ER'de bulunan ATP'ye duyarlı K⁺ kanallarının sülfonilüre reseptörlerine bağlanan ER-Tracker boyası kullanıldı.

4.4.1. PH grubunda ER yapısı bozulmuştur.

Kontrol grubundaki hücrelerde perinükleer alanda daha yoğun olmak üzere tüm sitoplazmada ER sisterna ve tübülleri izlendi. Sisterna ve tübül yapılarının bozulmamış olduğu dikkati çekti (Şekil 4.10.A,B).

Parkinson Hastalığı grubunda ER sisterna ve tübülleri perinükleer alanda Kontrol grubundaki kadar belirgin gözlenmedi. sitoplazmada dağınık yerleşmiş olan ER sisterna ve tübüllerinin parçalanmış olduğu dikkati çekti (Şekil 4.10.C,D).

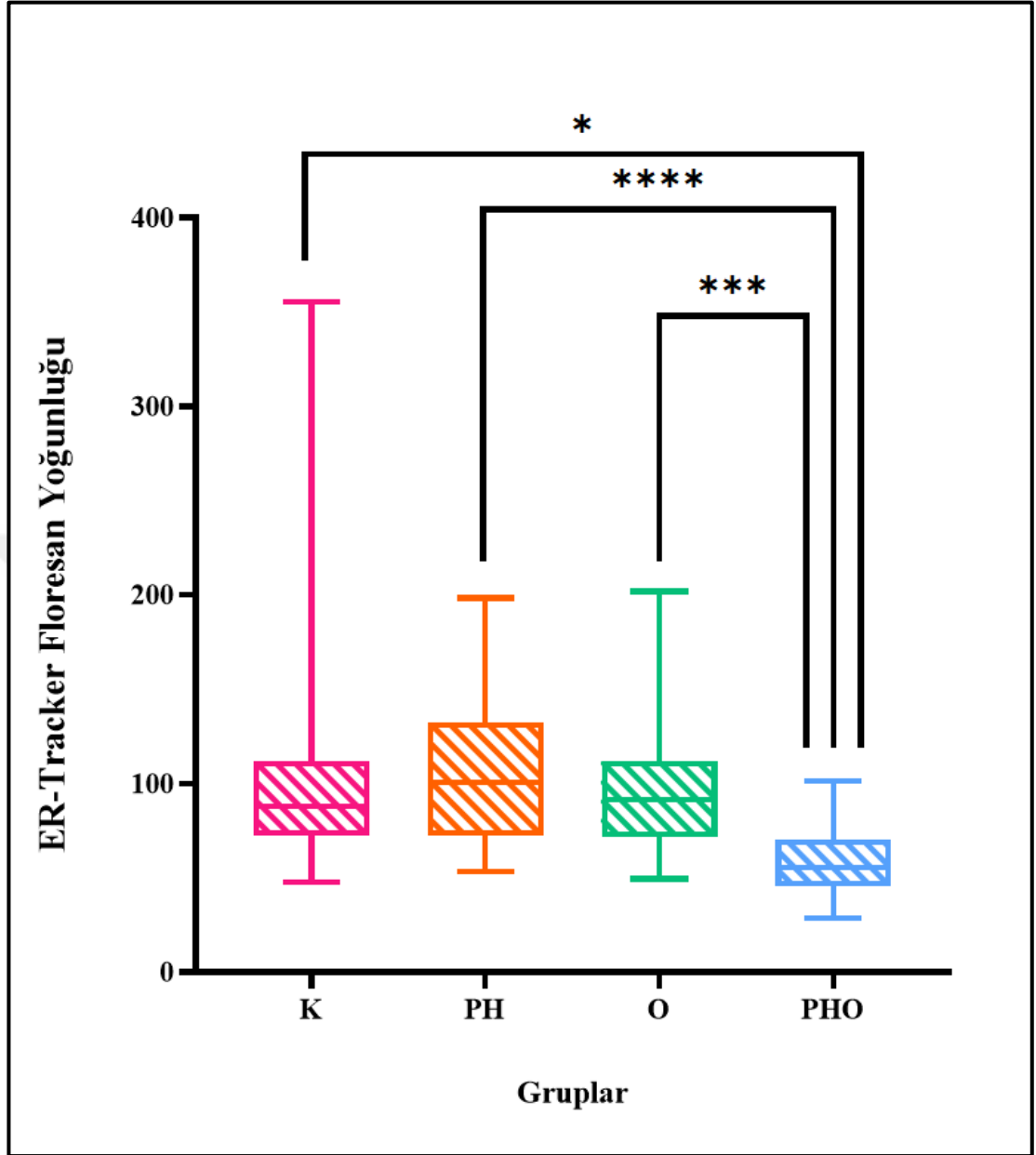
Otofaji grubunda kontrol grubuna benzer olarak perinükleer alanda ER sisterna ve tübüllerinin bozulmamış olduğu gözlendi ancak sitoplazmada belli bölgelerde otofajiye bağlı olduğu düşünülen ER sisterna ve tübüllerinde genişleme ve parçalanma saptandı. Parkinson Hastalığı grubu ile karşılaştırıldığında perinükleer alanda ER sisterna ve tübülleri korunmuştu. Parkinson Hastalığı grubuna göre sitoplazmada ER sisterna ve tübüllerinde genişlemeler ve parçalanma daha azdı. (Şekil 4.10.E,F).

Parkinson Hastalığı+Otofaji grubundaki perinükleer alan Kontrol grubuna benzer şekilde ER tübül ve sisternalarında bozulma yoktu. Sitoplazmadaki ER sisterna ve tübülleri kontrol grubuna benzer yoğunlukta dağılım gösteriyordu. Otofaji grubu ve Parkinson Hastalığı grubunda gözlenmiş olan ER tübül ve sisternalarında görülen parçalanma Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda saptanmadı (Şekil 4.10.G,H).

Şekil 4.12. ER-Tracker boyanması. Kontrol (A), Parkinson Hastalığı (C), Otofaji (E), Parkinson Hastalığı+Otofaji (G) (X400). Beyaz çerçeve içindeki hücrelerin 5 kat dijital büyütmelemleri sırasıyla Kontrol (B), Parkinson Hastalığı (D), Otofaji (F), Parkinson Hastalığı+Otofaji (H). Perinükleer alanlar daire içinde, sisterna ve tübüller (oklar), parçalanmış ER (yıldız).

4.4.2. Endoplazma retikulumunun hücredeki birim alandaki ortalama yoğunluğu PHO grubunda azalmıştır.

ER-Tracker boyasının floresan yoğunluğu ölçüm sonuçlarına göre Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda floresan yoğunluğu tüm gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu. İkili karşılaştırılma sonuçlarına göre Parkinson Hastalığı+Otofaji-Kontrol $p=0,013$, Parkinson Hastalığı+Otofaji -Parkinson Hastalığı $p=0,00$, Parkinson Hastalığı+Otofaji -Otofaji $p=0,00$ olarak bulundu. Bu analizlerin sonucu birim alandaki endoplazma retikulumu yoğunluğunun Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda azalmış olduğu göstermektedir. (Grupların standart sapmaları Kontrol: 69.25, Parkinson Hastalığı: 36.09, Otofaji: 42.85, Parkinson Hastalığı+Otofaji: 18.44 olarak bulunmuştur)(Şekil 4.13).



Şekil 4.13. ER-Tracker floresan yoğunluğu ölçüm sonuçları; Kontrol (K), Parkinson Hastalığı (PH), Otofaj (O), Parkinson Hastalığı + Otofaj (PHO)

5. TARTIŞMA

Parkinson hastalığı dünyada ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır [13]. Hastalık prevalans değerleri değişkenlik göstermekle birlikte dünyada 80,6-187/100.000, Türkiye’de 111/100.000 olarak bildirilmiştir [14]. Parkinson hastalığında birçok moleküler yolakta bozulma olduğu bilinmektedir. Bu moleküler yollardaki bozukluk sonucu Lewy cisimciği, hiperfosforile tau birikimi gibi histopatolojik bulgular ortaya çıkmakta dopaminerjik nöron ölümüyle sonuçlanmaktadır [19, 20]. Bu bozulmuş olan moleküler yollardan ikisi artmış endoplazma retikulumu stresi ve bozulmuş otofajidir [24, 43, 68]. Literatürde toksin aracılı Parkinson hastalığı modelinde otofaji indüklenmesi ile endoplazma retikulumu stresi arasındaki ilişkiye dair bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında Parkinson hastalığında bozulan otofajinin indüklenerek endoplazma retikulum stresinin azaltılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda H4 insan nörogliona hücreleriyle kontrol, hücrelere MPP+ verilerek Parkinson hastalığı, hücrelere Fluspirilen verilerek Otofaji ve hücrelere hem MPP+ hem de Fluspirilen verilerek Parkinson hastalığı+Otofaji grupları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu gruplarda hücre canlılığı, otofaji, endoplazma retikulumu stresi ve endoplazma retikulumunun yapısı değerlendirilmiştir.

MPP+ aracılı Parkinson hastalığı toksin modelinde Fluspirilen ile aktiflenen otofaji hücre canlılığını arttırmamıştır.

Hücre canlılığı ve otofaji ilişkisi literatürde hala sorularla dolu ve yeni verilere açık bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Otofajinin çok farklı moleküler yollar ile başlatılması, sürdürülmesi ve birçok ajanın bu yolda etkinlik göstermesinden dolayı farklı moleküler hedeflerin hücre canlılığına farklı etkileri olduğu bilinmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda otofajinin artması ile hücre canlılığının arttığı gösterilmiştir. SH-SY5Y hattında MPP+ aracılı Parkinson modeli ile yapılan bir çalışmada lizozomda lokalize TRPML1 proteini aktivasyonu ile otofaji arttırılarak hücre canlılığında artış sağlanmıştır [80]. SH-SY5Y ve SK-N-SH hücre hatlarında Parkinson oluşturduğu bilinen toksinlerle yapılan bir çalışmada hücrelere otofaji inhibitörleri MPP+ öncesinde verilmiştir ve ATG5 aracılı otofaji aktivasyonun hücre canlılığının

arttığı belirtilmiştir [81]. MPP+'nin oluşturduğu otofaji bozukluğunun Resveratrol kullanımını ile SH-SY5Y ve SK-N-SH nöroblastom hücrelerinde SNHG1/miR-128-3p/SNCA aksı üzerinden otofajiyi geri döndürerek hücre canlılığını arttırdığı bulunmuştur [82]. MPP+ aracılı Parkinson modeli oluşturmak için PC12 hücre hattının kullanıldığı bir çalışmada hücre canlılığı mTOR üzerinden otofaji arttıran Rapamisin ile geri döndürülmüştür [78].

Literatürde otofajinin artırılmasının hücre canlılığını arttırdığını bildiren çalışmaların yanısıra otofajinin artmasının hücre canlılığını azalttığına yönelik çalışmalar da mevcuttur. mTOR üzerinden otofaji aktivatörü olduğu bilinen Metformin ve Rapamisinin, MPP+ aracılığıyla Parkinson modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hattına kombine olarak verilmesinin otofajiyi arttırarak hücre ölümünü de arttırdığı bildirilmektedir [83].

Otofaji artışı ile hücre canlılığının artmasının yanı sıra otofajinin azalması ile de hücre canlılığının arttığı bildirilmektedir. MPP+ aracılı Parkinson modelinde SH-SY5Y hattında Artemisinin kullanımı sonrası hücrelerde apoptoz ve otofajinin azalması sonucu hücre canlılığının arttığı gösterilmiştir [84].

Otofaji araştırmalarında farklı hücre hatları [38] ve toksinler [32-34] kullanılarak oluşturulmuş Parkinson Hastalığı modellerinde farklı sonuçlar bildirilmiş olması tüm bu Parkinson hastalığı modellerinde otofajinin aynı moleküler yollar ile gerçekleşmediğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda otofaji aktivatörü olduğu bilinen Fluspirilen MPP+ toksini aracılığı ile Parkinson Hastalığı oluşturulmuş H4 nörogloma hücre hattında kullanıldığında otofajinin arttığı ve IRE1 aracılı endoplazma retikulumu stresinin azaldığı görüldü ancak hücre canlılığının değişmediği saptandı. Literatürde kullandığımız H4 nörogloma hattında Fluspirilenin anti-proliferatif etkisi [77] olduğu gösterilmiştir. Oluşturduğumuz modelde otofajinin artmasına ve IRE1 aracılı endoplazma retikulumu stresinin azalmasına rağmen hücre canlılığının değişmemesinin Fluspirilenin H4 hattı

üzerindeki anti-proliferatif etkisine bağlı olabileceği ve bu anti-proliferatif etkinin sebebinin otofaji üzerinden değil başka ölüm tipleri ile gerçekleştiği düşünülmüştür.

MPP+ toksinin Parkinson modelinde sebep olduğu otofaji bozukluğu ATG5 üzerinden etki gösteren Fluspirilen ile geri döndürülmüştür.

Literatürde Parkinson hastalığında otofajinin bozulduğu bilinmektedir. Hem transgenik hem de toksinler aracılığıyla oluşturulmuş modellerde otofaji bozukluğu gösterilmiştir. Farklı hücre hatlarında farklı toksinler ile oluşturulmuş Parkinson modellerinde bozulmuş olan otofajinin, otofaji aktivatörleri ile geri döndürülebildiği gösterilmiştir [19, 36, 68].

Çalışmamızda kullandığımız otofaji aktivatörü olan Fluspirilenin ATG5'in yıkımını engelleyerek otofajiyi aktive ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda ATG5 üzerinden etkinlik gösteren otofaji aktivatörlerinin Parkinson modellerinde bozulmuş olan otofajiyi geri döndürdüğü bildirilmektedir [85]. SH-SY5Y hücrelerinde ve farelerde MPP+ ile oluşturulmuş Parkinson modelinde miR-30c-5p ile hedef alınan ATG5'in inhibisyonu ile bozulan otofajinin geri döndüğü gösterilmiştir [85]. Bir başka çalışmada ATG5'e bağımlı otofajinin inhibisyonunun, MPP+ kaynaklı hücre ölümünü arttırdığı dolayısıyla otofajinin, MPP+ toksinine karşı koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmektedir [81].

Literatürde ATG5 aracılı otofaji aktivasyonunun otofajiyi arttırmasının yanı sıra Parkinson hastalığında biriken α -sinüklein birikimlerini de temizlediği gösterilmiştir [86, 87]. Fare nöroendokrin STC-1 hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada birçok ATG ailesi üyesi aracılığıyla otofajinin artması ile α -sinüklein yıkımının gerçekleştiği bildirilmektedir [86]. HEK293 hücre hattının kullanıldığı başka bir çalışmada ise siRNA ile ATG5 aracılı otofajinin susturulması LC3 işaretli otofagozomlara α -sinüklein alımını engellemiştir [87].

Otofaji yolağında birçok molekül rol oynar. Parkinson hastalığı modellerinde ATG ailesi dışında farklı moleküllerin de otofajiyi arttırıcı yönde etkileri olduğu

bilinmektedir [88, 89]. MPTP aracılı fare Parkinson hastalığı modelinde Mitochondic acid 5 (MA-5) AMPK fosforilasyonu ile otofajiyi arttırarak hastalıkta bozulmuş olan otofajinin düzeltilmesini sağlamıştır [88]. Rotenon ile oluşturulmuş SH-SY5Y hattı Parkinson hastalığı modelinde ise α -sinüklein ile ko-lokalize olan Histondeasetilaz 4'ün knockout edilmesi hücrelerde otofajiyi geri getirerek α -sinükleinin yıkımını sağlamıştır [89].

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak oluşturduğumuz MPP+ aracılı Parkinson hastalığı modelinde ATG5 aracılı otofaji aktivatörü olan Fluspirilen ile bozulmuş olan otofajinin düzeldiği gösterildi. Daha önce Parkinson hastalığı modellerinde kullanılmamış olan Fluspirilenin bozulmuş otofajiyi H4 nörogloma hücre hattında düzeltmiş olmasından dolayı bu hücre hattı ile yapılacak Parkinson hastalığı çalışmalarında otofaji aktivatörü olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

Oluşturulan Parkinson modelinde otofaji indüklenmesi hücrelerdeki endoplazma retikulum stresini azaltmıştır.

Hücrede meydana gelen yanlış katlanmış proteinler, radikaller, hipoksi ve metabolik açlık gibi durumların endoplazma retikulumunda strese yol açtığı bilinmektedir. Bu oluşan stresin IRE1, PERK ve ATF6 stres reseptörleri ile algılanıp yanlış katlanmış protein cevabı ve bunun sonunda aktifleşen birçok yapım ve yıkım yolu olduğu bilinmektedir ve otofaji de bu yollardan birisidir [43].

İnsan postmortem beyin doku örneklerinde Parkinson hastalığında endoplazma retikulumu stresi belirteçlerinden IRE1, PERK ve ATF6 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir ve bu stresin yanlış katlanmış proteinler sebebiyle arttığı düşünülmektedir [24, 43, 54]. Drosophiliada oluşturulmuş Parkinson modelinde IRE1 aracılı endoplazma retikulumu stresinin inhibe edildiği ve ATG7 aracılı otofajinin inhibe edilmesinin nöronlarda hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir.[90].

Farelerde mangan aracılığıyla oluşturmuş bir Parkinson modelinde yapılan çalışmada manganın IRE1 üzerinden yanlış katlanmış protein cevabını (UPR) başlatarak endoplazma retikulumu stresini arttırdığı ve UPR yanıtının JNK ilişkili otofaji yanıtını

başlattığı gösterilmiştir. Bu aktiflenen otofaji hücrede apoptozu engelleyerek hücrenin hayatta kalmasını sağlamıştır [91].

Rotenon aracılı Parkinson sıçan modeli oluşturulmuş bir çalışmada endoplazma retikulumu stres proteinlerinden olan PERK ve CHOP'un arttığı hücrelerde otofaji belirteci olan Beclin1'in azaldığı gösterilmiştir, Empagliflozin tedavisi sonrasında otofaji aktifleştirilerek endoplazma retikulumu stresinin azaltıldığı bildirilmiştir [92].

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında yapılmış bakır aracılı bir toksisite araştırmasında, Quersetinin önceden verilerek bakırın sebep olduğu PERK, CHOP ve XBP1 üzerinden olan endoplazma retikulumu stresini otofaji aracılığı ile ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [93].

Makrotofaji geni olduğu bilinen WDR45 knockout farelerde endoplazma retikulumu stresi ERN1/IRE1 ve EIF2AK3/PERK yolları üzerinden artmıştır. Bu farelerde endoplazma retikulumu stresinin baskılanması veya mTOR aracılı otofaji aktivasyonu apoptozu engelleyebilmiştir fakat endoplazma retikulumunun yapısal özelliklerini geri döndürmemiştir [94].

Otofaji bir hücre ölüm tipi olmasının yanı sıra endoplazma retikulumu stresinin bir sonucu olarak ortaya çıkmakla beraber hücre canlılığını koruyucu bir mekanizma olarak da karşımıza çıkmaktadır [72, 73]. Literatürde Parkinson hastalığında ATG5 aracılı otofaji ile IRE1 aracılı endoplazma retikulumu stresi arasındaki ilişkiye dair bir bilgi bulunmamaktadır. Oluşturduğumuz MPP+ aracılı Parkinson hastalık modelinde, Parkinson Hastalığı grubunda yüksek olan endoplazma retikulumu stres belirteci olan pIRE1'in Total IRE1'e oranının Fluspirilen kullanılarak ATG5 aracılığıyla otofajinin indüklendiği Parkinson Hastalığı+Otofaji grubunda azalması otofajinin IRE1 ilişkili endoplazma retikulumu stresini azalttığını göstermiştir.

Oluşturulan Parkinson modelinde endoplazma retikulumu yapısı bozulmuştur ancak otofajinin aktive edilmesi ile yapı düzelirken hücredeki endoplazma retikulumu miktarını azaltmıştır.

Literatürde deney hayvanlarında ve hücre hatlarında, toksinler veya transgenik yöntemlerle oluşturulan Parkinson hastalığı modellerinde endoplazma retikulumunun etkilendiği bildirilmektedir. Geçirimli elektron mikroskopi kullanılan bir MPP+ aracılı Parkinson hastalığı toksin modelinde, granüllü endoplazma retikulumunun parçalanması ile sitoplazmik vakuollerin oluştuğu ve bu vakuollerin beta-amiloid ile oluşturulan hücre modellerinde saptanmış olan sitoplazmik vakuollere benzediği gösterilmiştir [95]. 6-OHDA ile oluşturulan sıçan Parkinson hastalığı modelinde corpus striatumlar geçirimli elektron mikroskobu ile incelendiğinde perinükleer alanda çoğu serbest olan ve bazıları endoplazmik retikuluma bağlı kümeler halinde görünen çok sayıda ribozom az sayıda ve kısa uzunlukta granüllü endoplazma retikulumların varlığı dikkat çekmiştir [96]. Manganın intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturulan Parkinson hastalığı fare modelinde hipotalamustaki ultrastrüktürel değişiklikler 9 hafta boyunca değerlendirdiğinde, 9. hafta sonunda granüllü ve düz endoplazma retikulumun sisternalarında ileri derece dilatasyon saptanmıştır [97]. iPSC kökenli dopaminerjik nöronlarda SNCA gen mutasyonu ile yapılan bir çalışmada ER ultrastrüktürel yapısının elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucunda endoplazma retikulumunun kısa, parçalanmış tübüler yapıda olduğu ve hücrede toplam endoplazma retikulumu alanında azalma görüldüğü bildirilmiştir [98].

Cresyl violet kullanılarak Nissl cisimciklerinin incelendiği çalışmalarda; MPTP ile oluşturulmuş fare Parkinson hastalığı modelinde Nissl cisimciği görülen nöron sayısında anlamlı azalma tespit edilmiştir [99]. Rotenon ile oluşturulmuş sıçan Parkinson hastalığı modelinde de substansia nigra ve striata bölgelerinde Nissl alanları ölçüldüğünde belirgin azalma gözlenmiştir [100].

Çalışmamızda endoplazma retikulumu yapısının değerlendirilmesi için ER-Tracker boyası kullanıldı. Literatürde Parkinson hastalığı modellerinde bu boyanın kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Literatürde elektron mikroskobik çalışmalarda ve Cresyl Violet boyaması ile yapılmış çalışmalarda elde edilmiş bulgulara benzer şekilde çalışmamızda MPP+ aracılı Parkinson hastalığı modelinde endoplazma retikulumu sisterna ve tübüllerinde parçalanma görüldü. Literatürde otofaji ile endoplazma retikulumu yapısı arasındaki ilişkiye ait bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda

Parkinson hastalığı modelinde aktive edilen otofaji sonucunda endoplazma retikulumunun hücrede birim alanda hacminin azalmasının yanı sıra hücrelerde perinükleer alanda endoplazma retikulumu sisterna ve tübüllerinde genişleme ve parçalanmaların olmadığı görülmüştür. Bu bulgular bize MPP+ toksini aracılığıyla oluşturduğumuz Parkinson hastalığı modelinde bozulan otofajinin, Fluspirilen ile indüklenmesi sonucunda aktive edilmesiyle, hücrelerde perinükleer alanda endoplazma retikulumu sisterna ve tübüllerindeki genişleme ve parçalanmaları, hasarlı endoplazma retikulumunu sindirerek ortadan kaldırdığını düşündürmüştür.

Bu tez çalışması bazı sınırlılıklar içermektedir. Parkinson hastalığının modellenmesinde kullanılan birçok hücre hattı ve yöntem bulunmaktadır, çalışmamızda Parkinson hastalığının modellenmesinde nöron benzeri hücreler olan H4 insan nörogloma kanser hattı deneylerin kolay tekrar edilebilmesinden dolayı tercih edildi. Deneylerin primer nöron kültürleri veya iPS nöron hücrelerinde yapılması çalışmayı daha güvenilir kılacaktır.

Otofaji ve endoplazma retikulumu üzerine temellendirdiğimiz bu çalışmada zaman yetersizliğinden dolayı endoplazma retikulumu yapısının incelenmesinde geçirimli elektron mikroskobu kullanamayarak sadece floresan mikroskop ile değerlendirme yapıldı. İmmunositokimyasal bulguların ultrastrüktürel incelemeler ile desteklenmesi çalışmamızı daha güvenilir kılacaktır.

IRE1 düzeylerini ELİSA ve floresan yoğunluğu ölçümleri ile hesapladık, bu protein düzenlerinin western blot yöntemleri ile desteklenmesi çalışmayı daha üst seviyeye taşıyabilecektir.

Bu tez projesinin devamında olacak olan çalışmalarda MPP+ toksini ile oluşturulan Parkinson modelinde sadece IRE1 düzeyi değil IRE1 yolağındaki farklı moleküllerin değerlendirilmesi, endoplazma retikulumunun elektron mikroskobu ile daha ayrıntılı incelenmesi ve ulaşılan bu sonuçların α -sinüklein proteini ile ilişkisinin incelenmesi planlanmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında sonuç olarak:

- MPP+ ile oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde otofajinin indüklenmesi hücre canlılığını arttırmadı.
- MPP+ ile oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde, otofaji bozulmuş olarak bulundu.
- Parkinson hastalığı modelinde MPP+ toksininin endoplazma retikulumu yapısını bozduğu saptandı ve otofaji aktivasyonunun endoplazma retikulumunu hasarlı bölgelerini temizleyerek, perinükleer alanda bozulan sisterna, tübül yapısında düzelme ve hücrede birim alandaki endoplazma retikulumunda azalma belirlendi.
- MPP+ ile oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde ATG5 aracılı otofajinin indüklenmesi ile IRE1 ilişkili endoplazma retikulumu stresini azaltıldı.

Bu araştırmanın literatüre kattığı yenilikler:

- MPP+ aracılı Parkinson hastalığı modelinde Fluspirilen otofaji aktivatörü olarak ilk kez kullanıldı.
- Fluspirilenin yaptığı ATG5 aracılı otofaji aktivasyonu ile hücre canlılığı arasındaki ilişki ilk defa araştırıldı.
- Fluspirilenin yaptığı ATG5 aracılı otofaji aktivasyonu ile endoplazma retikulumu stresi belirteci olan IRE1 arasındaki ilişki ilk defa araştırıldı.
- MPP+ aracılı Parkinson hastalığı modelinde otofaji ile endoplazma retikulumu yapısı arasındaki ilişki ilk defa değerlendirildi.

Bu tezin çıktıları Parkinson hastalığında en erken moleküler bozukluklardan biri olan endoplazma retikulumu stresinin daha iyi anlaşılmasının, otofaji aracılığıyla IRE1 ilişkili endoplazma retikulumu stresi azaltılmasının hücrenin ve endoplazma retikulumunun görevlerine devam edebilmesi için bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermiştir. Bu çalışma aynı zamanda endoplazma retikulumunun Parkinson hastalığı ile ilişkili araştırmalarda önemli bir organel olduğunu göstererek benzeri çalışmalara yol gösterici olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Keith Moore, T.V.N.P., Mark Torchia, *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. 11th ed. 2018.
2. Sadler, T.W., *Langman's Medical Embryology*. 14th ed. 2018.
3. Mira, H. and J. Morante, *Neurogenesis From Embryo to Adult - Lessons From Flies and Mice (vol 8, 533, 2020)*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020. **8**.
4. Carlson, B.M., *Human Embryology and Developmental Biology*. 6th ed. 2018.
5. Stepien, T., *Neurogenesis in neurodegenerative diseases in the adult human brain*. *Postepy Psychiatrii I Neurologii*, 2021. **30**(4): p. 287-292.
6. Gartner, L.P., *Textbook of Histology*. 4th ed. 2017.
7. Pawlina, W., *Histology, A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. 7th ed. 2016.
8. Abraham L. Kierszenbaum, L.T., *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology* 4th ed. 2016.
9. Bott, C.J. and B. Winckler, *Intermediate filaments in developing neurons: Beyond structure*. *Cytoskeleton*, 2020. **77**(3-4): p. 110-128.
10. Herbison, A.E., *The dendron and episodic neuropeptide release*. *Journal of Neuroendocrinology*, 2021. **33**(11).
11. Sam, C. and B. Bordoni, *Physiology, Acetylcholine*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
12. Chen, X. and Y.H. Zhang, *A review of the neurotransmitter system associated with cognitive function of the cerebellum in Parkinson's disease*. *Neural Regeneration Research*, 2024. **19**(2): p. 324-330.
13. Tolosa, E., et al., *Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2021. **20**(5): p. 385-397.
14. Yazar, T. and H.O. Yazar, *Evaluation of C-reactive Protein/Albumin Ratio According to Stage in Patients with Idiopathic Parkinson Disease*. *Turkish Journal of Neurology*, 2019. **25**(3): p. 123-128.
15. Bloem, B.R., M.S. Okun, and C. Klein, *Parkinson's disease*. *Lancet*, 2021. **397**(10291): p. 2284-2303.

16. Balestrino, R. and A.H.V. Schapira, *Parkinson disease*. Eur J Neurol, 2020. **27**(1): p. 27-42.
17. Kovaleva, V. and M. Saarma, *Endoplasmic Reticulum Stress Regulators: New Drug Targets for Parkinson's Disease*. J Parkinsons Dis, 2021. **11**(s2): p. S219-S228.
18. Cherian, A. and K.P. Divya, *Genetics of Parkinson's disease*. Acta Neurologica Belgica, 2020. **120**(6): p. 1297-1305.
19. Panicker, N., et al., *The cell biology of Parkinson's disease*. J Cell Biol, 2021. **220**(4).
20. Kon, T., M. Tomiyama, and K. Wakabayashi, *Neuropathology of Lewy body disease: Clinicopathological crosstalk between typical and atypical cases*. Neuropathology, 2020. **40**(1): p. 30-39.
21. Serratos, I.N., et al., *An Update on the Critical Role of α -Synuclein in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies: from Tissue to Cellular and Molecular Levels*. Molecular Neurobiology, 2022. **59**(1): p. 620-642.
22. Vendruscolo, M., *Lipid Homeostasis and Its Links With Protein Misfolding Diseases*. Front Mol Neurosci, 2022. **15**: p. 829291.
23. Shan, F.Y., et al., *Examining the Toxicity of alpha-Synuclein in Neurodegenerative Disorders*. Life (Basel), 2021. **11**(11).
24. Colla, E., *Linking the Endoplasmic Reticulum to Parkinson's Disease and Alpha-Synucleinopathy*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 560.
25. Church, F.C., *Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease*. Biomolecules, 2021. **11**(4).
26. Chia, S.J., E.K. Tan, and Y.X. Chao, *Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(7).
27. Kamikubo, Y., et al., *Midbrain Slice Culture as an Ex Vivo Analysis Platform for Parkinson's Disease*. Methods Mol Biol, 2021. **2322**: p. 111-117.
28. Lovett, M.L., et al., *Innovations in 3D Tissue Models of Human Brain Physiology and Diseases*. Advanced Functional Materials, 2020. **30**(44): p. 1909146.
29. Kamikubo, Y., et al., *analysis platforms for monitoring amyloid precursor protein cleavage*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2023. **15**.

30. Alberio, T., L. Lopiano, and M. Fasano, *Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease*. FEBS J, 2012. **279**(7): p. 1146-55.
31. Kapałczyńska, M., et al., *2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures*. Archives of Medical Science, 2016.
32. Salari, S. and M. Bagheri, *In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease*. Physiological Research, 2019: p. 17-24.
33. Zeng, X.S., W.S. Geng, and J.J. Jia, *Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment*. ASN Neuro, 2018. **10**: p. 1759091418777438.
34. AlShimemeri, S., D.G. Di Luca, and S.H. Fox, *MPTP Parkinsonism and Implications for Understanding Parkinson's Disease*. Movement Disorders Clinical Practice, 2022. **9**(1): p. 42-47.
35. Mat Taib, C.N. and M. Mustapha, *MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies*. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2020.
36. Ren, H., et al., *The Cross-Links of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Neurodegeneration in Parkinson's Disease*. Front Aging Neurosci, 2021. **13**: p. 691881.
37. Fus-Kujawa, A., et al., *An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro*. Front Bioeng Biotechnol, 2021. **9**: p. 701031.
38. Slanzi, A., et al., *In vitro Models of Neurodegenerative Diseases*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 328.
39. Sree, S., et al., *Morphological Heterogeneity of the Endoplasmic Reticulum within Neurons and Its Implications in Neurodegeneration*. Cells, 2021. **10**(5).
40. English, A.R. and G.K. Voeltz, *Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a013227.
41. Li, H. and S. Sun, *Protein Aggregation in the ER: Calm behind the Storm*. Cells, 2021. **10**(12).
42. Loi, M., A. Marazza, and M. Molinari, *Endoplasmic Reticulum (ER) and ER-Phagy*. Prog Mol Subcell Biol, 2021. **59**: p. 99-114.

43. Ghemrawi, R. and M. Khair, *Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
44. Cooper, G., *The Cell: A Molecular Approach*. 8th ed. 2019.
45. Balchin, D., M. Hayer-Hartl, and F.U. Hartl, *Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones*. FEBS Lett, 2020. **594**(17): p. 2770-2781.
46. Wang, M. and R.J. Kaufman, *Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 326-335.
47. Yao, R.Q., et al., *Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles*. Autophagy, 2021. **17**(2): p. 385-401.
48. Srinivasan, E., et al., *Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 736978.
49. Stephens, A.D., M. Zacharopoulou, and G.S. Kaminski Schierle, *The Cellular Environment Affects Monomeric α -Synuclein Structure*. Trends in Biochemical Sciences, 2019. **44**(5): p. 453-466.
50. Poothong, J., I. Jang, and R.J. Kaufman, *Defects in Protein Folding and/or Quality Control Cause Protein Aggregation in the Endoplasmic Reticulum*. Prog Mol Subcell Biol, 2021. **59**: p. 115-143.
51. Hijaz, B.A. and L.A. Volpicelli-Daley, *Initiation and propagation of alpha-synuclein aggregation in the nervous system*. Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 19.
52. Song, S., et al., *Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery*. J Cell Physiol, 2018. **233**(5): p. 3867-3874.
53. Xiong, S., W.J. Chng, and J. Zhou, *Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a dynamic duo in multiple myeloma*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(8): p. 3883-3906.
54. Heman-Ackah, S.M., *Alpha-Synuclein Induces the Unfolded Protein Response in Parkinson's Disease Patient-Specific SNCA Triplication iPSC-Derived Neurons*. Neurosurgery, 2018. **65**: p. 138-139.

55. Siwecka, N., et al., *The Structure, Activation and Signaling of IRE1 and Its Role in Determining Cell Fate*. Biomedicines, 2021. **9**(2).
56. Zhao, H., et al., *Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury*. Cell Death & Disease, 2015. **6**(11): p. e1975-e1975.
57. Jung, M., H. Choi, and J.Y. Mun, *The autophagy research in electron microscopy*. Applied Microscopy, 2019. **49**(1).
58. Balvan, J., et al., *Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis*. PLOS ONE, 2015. **10**(3): p. e0121674.
59. Nirmala, J.G. and M. Lopus, *Cell death mechanisms in eukaryotes*. Cell Biol Toxicol, 2020. **36**(2): p. 145-164.
60. Fricker, M., et al., *Neuronal Cell Death*. Physiol Rev, 2018. **98**(2): p. 813-880.
61. Tait, S.W.G. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(9): p. 621-632.
62. Caccamo, A., et al., *Necroptosis activation in Alzheimer's disease*. Nat Neurosci, 2017. **20**(9): p. 1236-1246.
63. Li, Y., et al., *Astragaloside IV reduces neuronal apoptosis and parthanatos in ischemic injury by preserving mitochondrial hexokinase-II*. Free Radic Biol Med, 2019. **131**: p. 251-263.
64. Sun, L., et al., *Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome*. Cell Death & Disease, 2019. **10**(8).
65. Wang, H., et al., *Mitochondria regulation in ferroptosis*. Eur J Cell Biol, 2020. **99**(1): p. 151058.
66. Mizuno, T., K. Muroi, and K. Irie, *Snf1 AMPK positively regulates ER-phagy via expression control of Atg39 autophagy receptor in yeast ER stress response*. PLOS Genetics, 2020. **16**(9): p. e1009053.
67. Klionsky, D.J., et al., *Autophagy in major human diseases*. EMBO J, 2021. **40**(19): p. e108863.
68. Lu, J., M. Wu, and Z. Yue, *Autophagy and Parkinson's Disease*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1207**: p. 21-51.

69. Li, R., et al., *Piperine promotes autophagy flux by P2RX4 activation in SNCA/alpha-synuclein-induced Parkinson disease model*. *Autophagy*, 2022. **18**(3): p. 559-575.
70. Tu, H.Y., et al., *alpha-synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease*. *Aging Cell*, 2021. **20**(12): p. e13522.
71. Zhang, Z., et al., *MANF protects dopamine neurons and locomotion defects from a human alpha-synuclein induced Parkinson's disease model in C. elegans by regulating ER stress and autophagy pathways*. *Exp Neurol*, 2018. **308**: p. 59-71.
72. Yan, C., et al., *IRE1 promotes neurodegeneration through autophagy-dependent neuron death in the Drosophila model of Parkinson's disease*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(11): p. 800.
73. Halbe, L. and A. Rami, *Inhibition of Autophagy Potentiated Hippocampal Cell Death Induced by Endoplasmic Reticulum Stress and its Activation by Trehalose Failed to be Neuroprotective*. *Curr Neurovasc Res*, 2019. **16**(1): p. 3-11.
74. Vakifahmetoglu-Norberg, H., H.G. Xia, and J. Yuan, *Pharmacologic agents targeting autophagy*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(1): p. 5-13.
75. Petcherski, A., et al., *An Autophagy Modifier Screen Identifies Small Molecules Capable of Reducing Autophagosome Accumulation in a Model of CLN3-Mediated Neurodegeneration*. *Cells*, 2019. **8**(12).
76. Fiolek, T.J., K.L. Keel, and J.J. Tepe, *Fluspirilene Analogs Activate the 20S Proteasome and Overcome Proteasome Impairment by Intrinsically Disordered Protein Oligomers*. *ACS Chem Neurosci*, 2021. **12**(8): p. 1438-1448.
77. Dong, Y., et al., *Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug*. *Oncotarget*, 2017. **8**(67): p. 111728-111741.
78. Gomez-Santos, C., et al., *MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells*. *Brain Res*, 2002. **935**(1-2): p. 32-9.
79. Xia, H.G., et al., *Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5*. *Autophagy*, 2010. **6**(1): p. 61-6.
80. Wu, L.K., et al., *Artemisia Leaf Extract protects against neuron toxicity by TRPML1 activation and promoting autophagy/mitophagy clearance in both in*

- vitro and in vivo models of MPP+/MPTP-induced Parkinson's disease.* Phytomedicine, 2022. **104**: p. 154250.
81. Garcia-Garcia, A., et al., *Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP(+)-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity.* Toxicol Sci, 2013. **136**(1): p. 166-82.
 82. Shen, D.F., et al., *Resveratrol Promotes Autophagy to Improve neuronal Injury in Parkinson's Disease by Regulating SNHG1/miR-128-3p/SNCA Axis.* Brain Sci, 2023. **13**(8).
 83. Norradee, C., et al., *Evaluation of the Combination of Metformin and Rapamycin in an MPP(+)-Treated SH-SY5Y Model of Parkinson's Disease.* Adv Pharmacol Pharm Sci, 2023. **2023**: p. 3830861.
 84. Yan, J., et al., *Artemisinin attenuated oxidative stress and apoptosis by inhibiting autophagy in MPP(+)-treated SH-SY5Y cells.* J Biol Res (Thessalon), 2021. **28**(1): p. 6.
 85. Zhang, L., et al., *MiR-30c-5p/ATG5 Axis Regulates the Progression of Parkinson's Disease.* Front Cell Neurosci, 2021. **15**: p. 644507.
 86. Qiao, C.M., et al., *Sodium butyrate causes alpha-synuclein degradation by an Atg5-dependent and PI3K/Akt/mTOR-related autophagy pathway.* Exp Cell Res, 2020. **387**(1): p. 111772.
 87. Watanabe, Y., et al., *p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like alpha-synuclein inclusions.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52868.
 88. Wan, J., et al., *Mitochondrial acid 5 ameliorates the motor deficits in the MPTP-induced mouse Parkinson's disease model by AMPK-mediated autophagy.* Folia Neuropathologica, 2022. **60**(3): p. 329-337.
 89. Wang, L.X., et al., *Histone Deacetylase 4 Inhibition Reduces Rotenone-Induced Alpha-Synuclein Accumulation via Autophagy in SH-SY5Y Cells.* Brain Sciences, 2023. **13**(4).
 90. Yan, C., et al., *IRE1 promotes neurodegeneration through autophagy-dependent neuron death in the Drosophila model of Parkinson's disease.* Cell Death & Disease, 2019. **10**(11).

91. Liu, C., et al., *IRE1 signaling pathway mediates protective autophagic response against manganese-induced neuronal apoptosis in vivo and in vitro*. *Sci Total Environ*, 2020. **712**: p. 136480.
92. Motawi, T.K., et al., *Empagliflozin alleviates endoplasmic reticulum stress and augments autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Targeting the GRP78/PERK/eIF2alpha/CHOP pathway and miR-211-5p*. *Chem Biol Interact*, 2022. **362**: p. 110002.
93. Chakraborty, J., et al., *Quercetin Attenuates Copper-Induced Apoptotic Cell Death and Endoplasmic Reticulum Stress in SH-SY5Y Cells by Autophagic Modulation*. *Biol Trace Elem Res*, 2022. **200**(12): p. 5022-5041.
94. Wan, H., et al., *WDR45 contributes to neurodegeneration through regulation of ER homeostasis and neuronal death*. *Autophagy*, 2020. **16**(3): p. 531-547.
95. Sheehan, J.P., et al., *MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: An electron microscope study*. *Journal of Neuroscience Research*, 1997. **48**(3): p. 226-237.
96. Ravisankar, P., et al., *Electron microscopic observation of normal and 2,4,5-trihydroxyl phenylethylamine (6-hydroxydopamine) lesioned corpus striatum in Wistar Albino rats*. *Journal of the Anatomical Society of India*, 2023. **72**(3): p. 199-204.
97. Villalobos, V., et al., *Ultrastructural Study of the Hypothalamus in Mice Chronically Treated with Manganese*. *Revista Cientifica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, 2010. **20**(2): p. 144-152.
98. Stojkovska, I., et al., *Rescue of α -synuclein aggregation in Parkinson's patient neurons by synergistic enhancement of ER proteostasis and protein trafficking*. *Neuron*, 2022. **110**(3): p. 436-+.
99. Shen, D.F., et al., *Astaxanthin suppresses endoplasmic reticulum stress and protects against neuron damage in Parkinson's disease by regulating miR-7/SNCA axis*. *Neurosci Res*, 2021. **165**: p. 51-60.
100. Gupta, S., A. Mishra, and S. Singh, *Cardinal role of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) in progressive dopaminergic neuronal death & DNA fragmentation : implication of PERK:IRE1 α :ATF6 axis in Parkinson's pathology (vol 81, 109922, 2021)*. *Cellular Signalling*, 2023. **109**.