



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE
BRCC3 GEN NAKAVTININ OTOFAJİ VE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Çevik GÜREL

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**İzmir
2024**

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE
BRCC3 GEN NAKAVTININ OTOFAJİ VE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Çevik GÜREL

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**İzmir
2024**

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri



Önsöz

"İmkansızlık kelimesi sözlükte yer almalı, fakat ben onun varlığını kabul etmiyorum." Spor tarihinde unutulmaz bir figür ve ben dahil birçok kişi için rol model olan, ağır siklet boks şampiyonu Muhammad Ali tarafından sarf edilen bu sözler, her zorluğun ve karmaşıklığın üstesinden gelmek için kararlılıkla ve yılmadan çalışmanın ne kadar önemli olduğuna vurgu yapıyor.

Çocukluğumda "Muhammad Ali'nin Hastalığı" olarak bildiğim ve akademik hayata adım attığımdan bu yana üzerinde çalışmak istediğim Parkinson Hastalığı, ortaya çıkışında ve ilerleyişinde rol oynayan moleküler mekanizmaların hala tam anlamıyla çözülemediği gizemli ve karmaşık bir hastalıktır. Parkinson Hastalığı'nın daha iyi anlaşılması ve bu hastalığa karşı yürütülen mücadelede ilerleme kaydetmek amacıyla gerçekleştirilen araştırmaların sadece küçük bir parçası olarak gördüğüm bu tez çalışması ile BRCC3 geninin bu hastalıkla olan ilişkisini araştırmayı ve böylelikle Parkinson Hastalığı için yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına katkı sağlamayı amaçladım. Tez çalışması kapsamında yoğun emek vererek yaptığımız analizler sonucunda elde ettiğimiz bulgular Parkinson Hastalığı ile ilgili bilgi ve birikimimi arttırdı ve şuan için "imkansız" olarak görülen tedavinin bir gün bulunacağına dair inancımı güçlendirdi. Zaman zaman yorucu hatta yıpratıcı fakat bir o kadar da eğitici bir bilim yolculuğu olan doktora tez sürecimde edindiğim bu bilgi ve birikim ile Parkinson Hastalığı'nın birgün sadece tarih kitaplarında anlatılan bir hastalık olması için yürütülen çalışmalara karınca kadarınca destek olmaya devam edeceğim.

Muhammad Ali gibi büyük bir sporcunun anısına ve Parkinson Hastalığı ile mücadele eden herkesin umutlarına bir nebze katkıda bulunmak için gerçekleştirdiğim bu tez çalışmasını 27.01.2023 tarihinde kaybettiğimiz ikinci annem (anneannem) Ahizer Celep'e adıyorum.

İzmir, 9.01.2024

Çevik GÜREL

Özet

Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde BRCC3 Gen Nakavtının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Parkinson Hastalığı (PH), altmış yaş ve üzerindeki dünya popülasyonun yaklaşık %1-3'ünü etkileyen yaygın nörodejeneratif bir hastalıktır. Yapılan araştırmalar, temel işlevi hücre içerisinde fonksiyonunu yitirmiş ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı olan ubiquitin proteazom sistem (UPS) ve otofaji mekanizmalarında meydana gelen aksamaların PH ile ilişkili α -sinüklein agregasyonu, nöroinflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi (ERS) gibi biyolojik süreçleri tetiklediğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasının temel amacı, UPS ve inflamazom aktivasyonu süreçlerinin regülasyonunda görev aldığı bilinen BRCC3 (BRCA1-/BRCA2-containing complex 3) geni nakavtının, rotenon ile oluşturulan *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde otofaji ve ERS üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda sıçan embriyolarından elde edilen primer dopaminerjik nöron hatlarında oluşturulan *in vitro* PH modelinde niozom-siRNA kompleksi ile gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının etkileri eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizleri ile araştırılmış ve bu analizlerden elde edilen bulgular BRCC3 gen nakavtının otofaji ve ERS'de görevli genlerin mRNA ekspresyonlarının düzenlenmesi yoluyla dopaminerjik nöronlarda koruyucu bir etki oluşturduğunu göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında, rotenon enjeksiyonu ile sıçanlarda oluşturulan *in vivo* PH modelinde niozom-siRNA kompleksi ile gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının etkileri ise davranış deneyleri, histokimya, immünohistokimya, biyokimya ve RT-qPCR analizleri ile değerlendirilmiştir. Bu analizlerden elde edilen bulgular, *in vitro* analizlerdeki bulgulara benzer şekilde BRCC3 gen nakavtının otofaji ve ERS'de görevli genlerin mRNA ekspresyonlarının düzenlenmesi ve antioksidan sistemin yeniden aktivasyonu yoluyla koruyucu bir etki oluşturduğunu böylelikle rotenon maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkan histopatolojik değişiklikleri ve motor fonksiyon defektlerini hafiflettiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde BRCC3 gen nakavtının otofaji ve ERS üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz

bulgular BRCC3'ün PH tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler; BRCC3; Endoplazmik Retikulum Stresi; Gen Nakavtı; Otofaji; Parkinson Hastalığı; siRNA



Abstract

Investigation of the Effects of BRCC3 Gene Knockout on Autophagy and Endoplasmic Reticulum Stress in Experimental Parkinson's Disease Model

Parkinson's Disease (PD) is a common neurodegenerative disorder affecting approximately 1-3% of the global population aged sixty and above. Studies indicate that disruptions in the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy mechanisms, responsible for the degradation of misfolded or malfunctioning proteins within cells, triggers PD-associated biological processes such as α -synuclein aggregation, neuroinflammation, and endoplasmic reticulum stress (ERS).

The main purpose of this thesis study is to investigate the effects of BRCC3 (BRCA1-/BRCA2-containing complex 3) gene knockout, which is known to be involved in the regulation of UPS and inflammasome activation processes, on autophagy and ER stress in *in vitro* and *in vivo* PD models created with rotenone. In pursuit of this purpose, the effects of BRCC3 gene knockout performed with niosome-siRNA complex in the *in vitro* PD model created in primary dopaminergic neuron lines obtained from rat embryos were investigated by simultaneous polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses, and the findings obtained from these analyses showed that BRCC3 gene knockout affects autophagy and It has been shown that genes involved in ERS have a protective effect on dopaminergic neurons by regulating their mRNA expression.

Within the scope of the thesis study, the effects of BRCC3 gene knockout performed with niosome-siRNA complex on the *in vivo* PD model created in rats by rotenone injection were evaluated with behavioral experiments, histochemistry, immunohistochemistry, biochemistry and RT-qPCR analyses. The findings from these analyses, similar to those in the *in vitro* studies, demonstrate that BRCC3 gene knockout exerts a protective effect by regulating the mRNA expressions of genes involved in autophagy and ERS and reactivating the antioxidant system, thereby alleviating histopathological changes and motor function defects resulting from rotenone exposure.

In conclusion, the findings we obtained within the scope of our thesis study, in which the effect of BRCC3 gene knockout on autophagy and ERS in *in vitro* and *in vivo* PD

models were investigated, show that BRCC3 may be a potential therapeutic target in the treatment of PD.

Keywords; BRCC3; Endoplasmic Reticulum Stress; Gene Knockout; Autophagy; Parkinson's Disease; siRNA



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	X
Şekiller Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XIII
Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
Genel Bilgiler	3
2.1. Parkinson Hastalığının Tanımı ve Klinik Semptomları.....	3
2.2. PH Epidemiyolojisi	4
2.3. Lewy Cisimciklerinin Keşfi ve PH Nöropatolojisi	5
2.4. Rotenon ile İndüklenen PH Modeli	6
2.5. PH Nöropatolojisinde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	6
2.5.1. PH Nöropatolojisinde Mitokondriyal Disfonksiyon	7
2.5.2. PH Nöropatolojisinde Nöroinflamasyon	7
2.5.3. PH Nöropatolojisinde ERS.....	8
2.5.4. PH Nöropatolojisinde Otofaji	8
2.6. Ubikuitin Proteozom Sistem ve Lizin 63 (K63) Ubikuitinasyonunun PH Nöropatolojisindeki Rollerine Dair İp Uçları.....	9
2.7. K63 Spesifik Deubitikinaz: BRCC3 ve PH ile İlişkisine Dair İp Uçları.....	12
Gereç ve Yöntem	15
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeleri ve Deney Ekipmanlar	15
3.2. Niozomların Sentezi, Niozom-siRNA Komplekslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyon Analizleri	19

3.2.1. Niozomların Sentezi ve Niozom-siRNA Komplekslerinin Oluşturulması	19
3.2.2. Boş Niozomların ve Niozom-siRNA Komplekslerinin Karakterizasyonu	20
3.3. <i>In Vitro</i> Deneyler	21
3.3.1. Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının İzolasyonu ve Hücre Kültürü	21
3.3.2. Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının Karakterizasyonu	24
3.3.3. Deneylerde Kullanılacak siRNA'nın Seçimi	24
3.3.4. <i>In Vitro</i> PH Modelinin Oluşturulması ve Deney Dizaynı	24
3.3.5. <i>In Vitro</i> Deneylerde Gerçekleştirilen Analizler	26
3.3.5.1. İmmünofloresan (IF) Boyama Analizleri	26
3.3.5.2. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri	27
3.4. <i>In Vivo</i> Deneyler	29
3.4.1. Çalışmanın Etiği ve Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları	29
3.4.2. <i>In Vivo</i> PH Modelinin İndüksiyonu ve Deney Dizaynı	29
3.4.3. <i>In Vivo</i> Deneylerde Gerçekleştirilen Analizler	30
3.4.4. Davranış Testleri	31
3.4.4.1. Açık Alan Testi	31
3.4.4.2. Bar (Çubuk) Katalepsi Testi	32
3.4.5. <i>In Vivo</i> Görüntüleme Sistemi (IVIS) Analizleri	32
3.4.6. Biyokimyasal Analizler	33
3.4.6.1. Biyokimyasal Analizler İçin Orta Beyin Dokusu Örneklerinin Hazırlanması	33
3.4.6.2. Lipit Peroksidasyon Analizleri	33
3.4.6.3. Antioksidan Enzim Aktivitesi Analizleri	33
3.4.7. Histolojik Analizler	34
3.4.7.1. Histolojik Analizlerde Kullanılacak Orta Beyin Dokularının Hazırlanması	34
3.4.7.2. Histokimyasal Boyamalar	34
3.4.7.3. İmmünohistokimyasal Boyama	35
3.4.8. RT-qPCR Analizleri	36
3.5. İstatistiksel Analizler	37
Bulgular	38

4.1. Niozomların Sentezi ve Niozom-siRNA Komplekslerinin Karkterizasyonlarına Ait Bulgular	38
4.2. <i>In Vitro</i> Deneylere Ait Bulgular	40
4.2.1. Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının Karakterizasyonuna Ait Bulgular.....	40
4.2.2. siRNA Seçimine Ait Bulgular.....	42
4.2.3. <i>In Vitro</i> PH Modeline ve BRCC3 Gen Nakavtına Ait Bulgular	42
4.3. <i>In Vivo</i> Deneylere Ait Bulgular	45
4.3.1. Davranış Testlerine Ait Bulgular.....	45
4.3.1.1. Açık Alan Testine Ait Bulgular.....	45
4.3.1.2. Çubuk Katalepsi Testine Ait Bulgular.....	47
4.3.2. IVIS Analizlerine Ait Bulgular	48
4.3.3. Biyokimyasal Analizlere Ait Bulgular.....	49
4.3.3.1. Lipit Peroksidasyon Analizlerine Ait Bulgular	49
4.3.3.2. Antioksidan Enzim Aktivitesi Analizlerine Ait Bulgular	50
4.3.4. Histolojik Analizlere Ait Bulgular	51
4.3.4.1. Histokimyasal Analizlere Ait Bulgular	51
4.3.4.2. İmmünohistokimyasal Analizlere Ait Bulgular	53
4.3.4.2.1. BRCC3 İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular	53
4.3.4.2.2. TH ve α -syn İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular	55
4.3.4.2.3. Beclin-1, p62 ve LC3II İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular.....	59
4.3.4.2.4. Grp78/Bip, PERK-1, ATF6, IRE1, CHOP İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular	65
4.3.5. RT-qPCR Analizlerine Ait Bulgular	75
Tartışma	78
Sonuç ve Öneriler.....	84
Kaynaklar	85
Ekler	101
Teşekkür	102
Özgeçmiş	104

Tablolar Dizini

Tablo 1: Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal malzemeler	15
Tablo 2: Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler	17
Tablo 3: Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar	18
Tablo 4: RT-qPCR analizlerinde kullanılan primer sekansları	28
Tablo 5: Sentezlenen niozomlar ve oluşturulan niozom-siRNA komplekslerine ait zeta potansiyeli, ortalama boyut ve PDI değerleri	39
Tablo 6: siRNA seçimi amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerine ait bulgular	42
Tablo 7: <i>In vitro</i> deney gruplarında otofaji ve ERS ile ilişkili genlere ait mRNA ekspresyon düzeyleri	44
Tablo 8: <i>In vivo</i> deney gruplarında otofaji ve ERS ile ilişkili genlere ait mRNA ekspresyon düzeyleri	76

Şekiller Dizini

Şekil 1: Parkinson Hastalığında dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak ortaya çıkan motor ve non motor semptomların şematik gösterimi.....	3
Şekil 2: Ubikuin Proteozom Sistem (UPS)'nin işleyişi.....	9
Şekil 3: Deubikuitinazların (DUB) sınıflandırılması.....	12
Şekil 4: E.14.5 günlük embriyolardan orta beyin bölgesi izolasyonuna ait işlem basamakları	23
Şekil 5: Tripan mavisi ile boyanan hücrelerde gerçekleştirilen hücre sayımına ait hemositometre görüntüsü	23
Şekil 6: Açık alan testlerinde kullanılan deney düzeneği	31
Şekil 7: Çubuk katalepsi testlerinde kullanılan deney düzeneği	32
Şekil 8: DLS cihazı ile gerçekleştirilen ortalama boyut analizlerine ait grafikler.....	38
Şekil 9: TEM görüntülemesine ait mikrogramf.	40
Şekil 10: Kültüre edilen primer orta beyin dopaminerjik nöron hattındaki hücrelerin deneyin ilk günü ve 7. gününe ait steromikroskop görüntüleri.....	41
Şekil 11: İzolasyonu ve kültürü gerçekleştirilen primer dopaminerjik nöron hücre hattında gerçekleştirilen TH ve Map2a IF boyamasına ait mikrogramflar.	41
Şekil 12: In vitro deney gruplarında gerçekleştirilen TH IF boyamasına ait mikrogramflar.....	43
Şekil 13: Açık alan testine ait grafikler..	46
Şekil 14: Deney gruplarına uygulanan çubuk katalepsi testine ait grafikler	47
Şekil 15: Farklı zaman aralıklarında deney gruplarına uygulanan IVIS analizlerine ait görüntüler	49
Şekil 16: Gruplarda ait MDA grafiği.....	50
Şekil 17: Gruplara ait SOD grafiği.....	51
Şekil 18: Deney gruplarında gerçekleştirilen HE ve TB boyamalarına ait görüntüler.. ..	52
Şekil 19: Deney gruplarında BRCC3 immünoreaktivitesine ait grafik.....	53
Şekil 20: Deney gruplarında gerçekleştirilen BRCC3 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrogramflar.	54
Şekil 21: Deney gruplarında TH immünoreaktivitesine ait grafik..	55
Şekil 22: Deney gruplarında gerçekleştirilen TH immünohistokimyasal boyamasına ait mikrogramflar.....	56

Şekil 23: Deney gruplarında α -syn immünoaktivitesine ait grafik.....	57
Şekil 24: Deney gruplarında gerçekleştirilen α -syn immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.....	58
Şekil 25: Deney gruplarında Beclin 1 immünoaktivitesine ait grafik.. ..	59
Şekil 26: Deney gruplarında gerçekleştirilen Beclin 1 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.. ..	60
Şekil 27: Deney gruplarında p62 immünoaktivitesine ait grafik.....	61
Şekil 28: Deney gruplarında gerçekleştirilen p62 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.....	62
Şekil 29: Deney gruplarında LC3II immünoaktivitesine ait grafik.....	63
Şekil 30: Deney gruplarında gerçekleştirilen LC3II immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.....	64
Şekil 31: Deney gruplarında Grp78/Bip immünoaktivitesine ait grafik.....	65
Şekil 32: Deney gruplarında gerçekleştirilen Grp78/Bip immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.	66
Şekil 33: Deney gruplarında PERK-1 immünoaktivitesine ait grafik.	67
Şekil 34: Deney gruplarında gerçekleştirilen PERK-1 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.	68
Şekil 35: Deney gruplarında ATF6 immünoaktivitesine ait grafik.	69
Şekil 36: Deney gruplarında gerçekleştirilen ATF6 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.....	70
Şekil 37: Deney gruplarında IRE1 immünoaktivitesine ait grafik.	71
Şekil 38: Deney gruplarında gerçekleştirilen IRE1 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.....	72
Şekil 39: Deney gruplarında CHOP immünoaktivitesine ait grafik.	73
Şekil 40: Deney gruplarında gerçekleştirilen CHOP immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar.. ..	74

Kısaltma Listesi

%EE	: Enkapsülasyon verimliliği
6-ODHA	: 6-Hidroksidopamin
ATF4	: Activating Transcription Factor 4
ATF6	: Activating Transcription Factor 6
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BRCC3	: BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3
BSA	: Sığır Serum Albümini, Bovine Serum Albumin
Cdk5	: Cyclin-dependent kinase 5
CHOP	: C/EBP homologous protein
DAB	: 3,3-diaminobenzidine
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dNTP	: Deoksinükleotid Karışımı
DUB	: Deubikuitinaz
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
ERS	: Endoplazmik retikulum stresi
FBS	: Fetal Sığır Serum, Fetal Bovine Serum

Grp78/Bip	: Glucose-Regulated Protein, 78kD
H&E	: Hematoksilen-Eozin
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	: Histon deasetilaz
HDAC6	: Histone deacetylase 6
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HRP	: Horse Radish Peroxidase
IF	: İmmünofloresan
IHC	: İmmünohistokimya
IVIS	: <i>In vivo</i> imaging system
JAMM	: JAB1/MPN/MOV34
K	: Lizin
K63	: Lizin 63
LC3II	: Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 II
MAP2a	: Microtubule-associated protein 2a
MDA	: Malondialdehit
MITOL	: Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase
M-PER	: Mammalian Protein Extraction Reagent
MPTP	: 1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
mV	: Milivolt
NLRP3	: NLR family pyrin domain containing 3

OTU	: Ovarian tumour proteases
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin, Phosphate Buffered Saline
PDI	: Polidispersite indeksi
PEG	: Polietilen glikol
PERK-1	: Proline Extensin-like Receptor Kinase 1
PFA	: Paraformaldehit
PH	: Parkinson Hastalığı
PINK1	: PTEN kaynaklı kinaz 1, PTEN-induced kinase 1
PVDF	: Polyvinylidenedifluoride
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu
siRNA	: Small interfering ribonucleic acid
SNCA	: α -sinüklein geni
SOD	: Superoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TB	: Toluidin Mavisi, Toluidin Blue
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu, Transmission electron microscopy
TH	: Tirozin Hidroksilaz
UCH	: Ubiquitin C-terminal hydrolases
UCH-L1	: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1

UPS	: Ubikuitin proteazom sistem
USP	: Ubiquitin-specific proteases
USP8	: Ubiquitin-specific protease 8
XBP-1	: X-box binding protein 1
α-syn	: α -sinüklein



Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Parkinson Hastalığı dünya genelinde yaklaşık 6 milyon kişiyi etkileyen yaygın nörodejeneratif bir hastalıktır (Ye, Robak, Yu, Cykowski ve Shulman, 2023). Bu hastalık üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve nöroinflamasyon gibi biyolojik süreçlerin doğrudan ya da dolaylı olarak dopaminerjik nöron ölümlerini tetiklediğini ve Parkinson Hastalığının nöropatolojisinde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Karvandi, Sheikhzadeh Hesari, Aref ve Mahdavi, 2023). Bununla birlikte, Parkinson Hastalığının etiyolojisi günümüzde dahi hala tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Adam ve diğerleri, 2023). Bu nedenle, bu hastalık üzerinde yapılacak klinik ve prelinik araştırmalardan elde edilecek yeni veriler Parkinson Hastalığının etiyolojisinin anlaşılması ve tedavisinde yeni terapötik hedeflerin tanımlanması açısından önem taşımaktadır. Konusu Parkinson Hastalığı olan tez çalışmamız, nörotoksin (rotenon) ile indüklenen sporadik *in vitro* ve *in vivo* Parkinson Hastalığı modellerinde, BRCC3 gen nakavtının endoplazmik retikulum stresi ve otofaji yolları üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen biyokimyasal, moleküler ve histolojik analizleri kapsamaktadır. Bu tez kapsamında yapılan analizler ile BRCC3 gen nakavtının endoplazmik retikulum stresi ve otofaji yolları üzerindeki etkileri ortaya konulmaya, böylelikle hem ilgili literatüre hem de Parkinson Hastalığının tedavisinde yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Rotenon ile indüklenen *in vitro* ve *in vivo* Parkinson Hastalığı modellerinde, BRCC3 genine spesifik siRNA ile gerçekleştirilecek gen nakavtının, dopaminerjik nöron kayıplarıyla ilişkili olduğu bilinen endoplazmik retikulum stresi ve otofaji yolları üzerindeki etkisi nedir?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Tez çalışmamızın hipotezi “ubikuitin proteozom sistemi ve inflamazom aktivasyonu süreçlerinin regülasyonunda görev aldığı bilinen BRCC3 geninin nakavtı,

endoplazmik retikulum stresinde azalma, otofajide ise artışa neden olarak dopaminerjik nöron kayıplarını azaltır” olarak belirlenmiştir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Çalışmanın *in vivo* basamağında PH modeli indüksiyonunda kullanılan rotenonun %2 DMSO ve %98 ayçiçek yağı içeren çözücü içerisinde %100 çözündüğü varsayılmış ve bu çözücü içerisinde hazırlanan rotenon her hayvan için 2 mg/kg olacak şekilde subkutan yolla enjekte edilerek PH modeli indüksiyonu gerçekleştirilmiştir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez çalışması için en sınırlayıcı faktör, primer ortabeyin hücre hattının elde edileceği sıçan embriyolarının eldesi olmuştur. Embriyoların eldesi için çiftleşmeye bırakılan dişi sıçanlarda, gebeliğin en temel belirtisi olan vajinal plak oluşumu gözlenmesine rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi durumlar yaşamıştır. Bu nedenle bu aşamada gebeliği ultrasound ve/veya bir başka yöntemle kesin olarak belirlenmiş hayvanların temin edilerek kullanılması, deneyler sırasında sakrifiye edilecek dişi hayvan sayısının azaltılması açısından önem taşımaktadır.

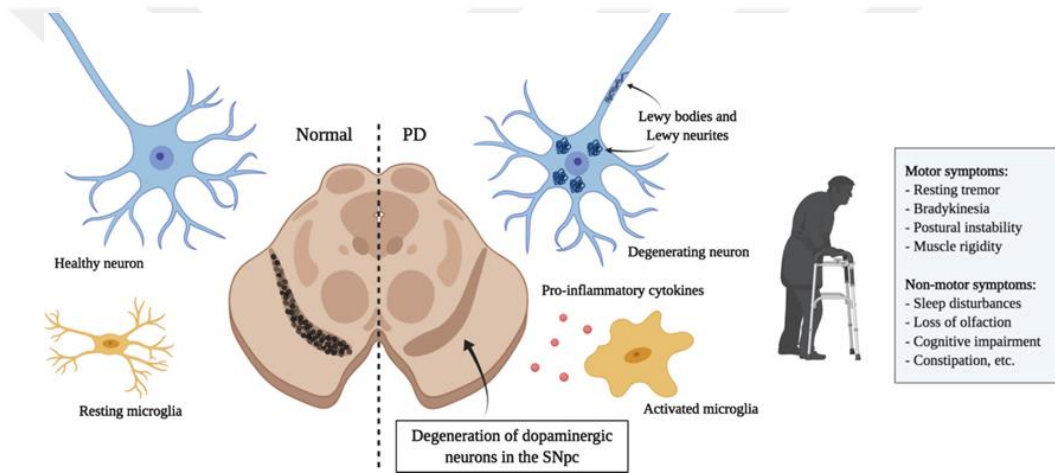
1.6. Araştırmanın Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı, nörotoksin (rotenon) ile indüklenen *in vitro* ve *in vivo* Parkinson Hastalığı modellerinde, BRCC3 gen nakavtının endoplazmik retikulum stresi ve otofaji yolları üzerindeki etkilerinin histolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler ile araştırılmasıdır.

Genel Bilgiler

2.1. Parkinson Hastalığının Tanımı ve Klinik Semptomları

Parkinson Hastalığı (PH), beynin *substantia nigra pars compacta* bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak ortaya çıkan tremor, bradikinezi, musküler rijidite, postrutal instabilite ve yürüyüş bozuklukları gibi motor semptomların ile karakterize yaygın nörodejeneratif bir hastalıktır (Şekil 1) (Goenawan, Kiasati, Sylviana, Megantara ve Lesmana, 2023; Youssef ve diğerleri, 2023).



Şekil 1: Parkinson Hastalığında dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak ortaya çıkan motor ve non motor semptomların şematik gösterimi (Castonguay, Gravel ve Lévesque, 2021).

PH'nin en ayırt edici motor semptomlarından biri olan tremor, vücut kaslarının istemsiz, periyodik ve anormal şekilde hareket etmesi olarak tanımlanmaktadır (R. Chen ve diğerleri, 2022). Hastalarının yaklaşık %75'inde görülen bu semptom, tipik olarak üst ekstremiteleri etkilemektedir fakat hastalığın ilerleyen dönemlerinde yüz, dudaklar, dil ve bacaklarda da tremor görülebilmektedir (Abusrair, Elsekaily ve Bohlega, 2022; R. Chen ve diğerleri, 2022). Gün içerisinde değişen şiddet ve aralıklarda olarak ortaya çıkan bu semptom stres durumlarında artış gösterirken, uykuda ise azalmaktadır (Abusrair ve diğerleri, 2022; Dirks ve Bologna, 2022).

Hastalığın erken dönemlerinde tek taraflı (unilateral) olarak başlayan tremor, hastalığın ilerleyen evrelerinde ise vücudun iki tarafını da etkileyebilmektedir (Greenland ve Barker, 2018).

PH'nin ayırt edici motor semptomlarından bir diğeri ise etimolojik olarak "hareketlerde yavaşlama" anlamına gelen bradikinezi'dir (Bologna ve diğ'eri, 2023). PH'nin motor semptomları arasında dopamin eksikliği ile ilişkisi en net şekilde ortaya konulmuş olan bu semptom, tekrarlayan veya süreklilik gerektiren bir hareketin başlatılmasında ve devam ettirilmesinde güçlük çekilmesi olarak tanımlananmaktadır ve etkilediği vücut bölgelerine göre farklı isimler almaktadır (Bologna, Paparella, Fasano, Hallett ve Berardelli, 2020). Örneğin, yutkunmada ortaya çıkan yavaşlamaya bağılı olarak tükürük artışına siyalore, yüz ifadelerindeki yavaşlamaya bağılı olarak ortaya çıkan donuk yüz ifadesine bradimimi, rutin konuşma sırasında sesin kısılmasına ise bradifoni isimleri verilmektedir (Bologna ve diğ'eri, 2023; Sveinbjornsdottir, 2016).

Boyun, gövde ve ekstremit'e kaslarında pasif hareketlere karşı oluşan direnç olarak tanımlanan musküler rijidite PH ile ilişkili bir diğ'er klinik semptomdur ve hastaların yaklaşık %89'unda görölmektedir. Gövde ve alt ekstremit'e kaslarında ortaya çıkan rijidite PH ile ilişkili bir diğ'er klinik semptomlar olan postüral instabilite ve yürüyüş bozukluklarının da ana sebebidir (Ferreira-Sánchez, Moreno-Verdú ve Cano-de-la-Cuerda, 2020).

PH'de gözlemlenen bu motor semptomlar PH tanısının konulmasında kullanılan klasik belirteçler olmasına rağmen yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular duyusal anormallikler, bilişsel gerileme, uyku bozuklukları ve depresyon gibi motor olmayan semptomların da PH ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Pfeiffer, 2016)

2.2. PH Epidemiyolojisi

2018 verilerine göre dünya genelinde 7 ila 10 milyon kişiyi etkilediği bildirilen PH, Alzheimer Hastalığından sonra en sık görölen nörodejeneratif hastalıktır (Chopade ve diğ'eri, 2023; Kustrimovic ve diğ'eri, 2018).

Güncel epidemiyolojik çalışmalar ile dünya popölasyonundaki genel prevelansının %0,3, 60 yaş üstü popölasyondaki prevelansının %1, 80 yaş ve üzeri popölasyondaki prevelansının ise %4 olduğu ortaya konulan bu hastalığın 2040 yılına kadar 13

milyondan fazla kişiyi etkilemesi beklenmektedir (Jankovic ve Tan, 2020; Rizek, Kumar ve Jog, 2016).

Erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 1,5 kat daha fazla görülen bu hastalığın ortalama başlangıç yaşı 60'tır. 20 ile 50 yaş aralığındaki kişilerde görülen erken başlangıçlı PH ise tüm vakalarının sadece %10'unu oluşturmaktadır (Jankovic ve Tan, 2020).

Yapılan çalışmalardan elde edilen diğer önemli bir bulgu ise PH vakalarının sadece %5 ila 10'unun ailesel öyküye sahip olmasıdır. Bu durum PH'nin ortaya çıkışında çevresel etmenlerin oldukça büyük bir rolünün olduğuna işaret etmektedir (Ganguly ve diğerleri, 2021).

2.3. Lewy Cisimciklerinin Keşfi ve PH Nöropatolojisi

PH'nin nöropatolojisinin anlamlandırılabilmesindeki ilk dönüm noktası, 1912 yılında Alman nörolog Freidrich Heinrich Lewy tarafından Parkinson hastalarına ait beyin dokularında vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği, Meynert'in bazal çekirdeği, globus pallidus, talamusun lateral çekirdeği ve talamusun periventriküler çekirdeğinde açık renkli ışınal fibriller tarafından çevrelenen koyu renkli bir çekirdek ile karakterize eozinofilik intranöronal inklüzyon cisimciklerini tanımlanmasıdır (Mcdonald, Gordon, Hand, Walker ve Fisher, 2018). Bu tanımlamadan 7 yıl sonra, 1919'da Rus Nörolog Konstantin Nikolaevich Tretiakoff tarafından "Lewy Cisimcikleri" olarak adlandırılan bu inklüzyonların idiyopatik ve postensefalitik Parkinson hastalarının *substantia nigra* bölgesinde de birikim gösterdiği keşfedilmiştir (Goedert, Spillantini, Del Tredici ve Braak, 2013). Doksanlı yıllara gelindiğinde ise nöronlarda agregatlar oluşturma eğilimindeki α -sinükleinin (α -syn), Lewy Cisimciklerinin yapısında bulunan ışınal fibrillerin önemli bir bileşeni olduğu ortaya konulmuştur (Dickson ve diğerleri, 2009). Bu durum PH'nin sinükleinopati sınıfı hastalıklar içerisinde değerlendirilmesine neden olmuştur (Calabresi ve diğerleri, 2023).

Günümüzde, PH nöropatolojisindeki temel olgunun hücre içerisinde agregasyon gösteren α -syn birikimleri ile karakterize intranöronal Lewy Cisimcikleri nedeniyle ortaya çıkan dopaminerjik nöron kayıplarına bağlı olarak striatumda dopamin salgısında gerçekleşen azalış olduğu düşünülmektedir (Koeglsperger ve diğerleri, 2023).

2.4. Rotenon ile İndüklenen PH Modeli

PH'nin daha iyi anlaşılabilmesi ve bu hastalığa karşı yeni tedavi opsiyonlarının oluşturulabilmesi için PH nöropatolojisini iyi taklit eden *in vitro* ve *in vivo* modellemelerin gerçekleştirilmesi önemli bir basamaktır (Dovonou ve diğerleri, 2023). Deneysel PH modellemelerinde en sık kullanılan yöntem ise 6-hidroksidopamin (6-ODHA), parakuat, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropridine (MPTP), maneb ve rotenon gibi nörotoksik maddelerin kullanıldığı kimyasal indüksiyon yöntemidir (Thirugnanam ve Santhakumar, 2022).

Bitki kaynaklı bir pestisit olan rotenon solunduğunda dahi insanlarda PH riskini arttıran lipofilik bir bileşiktir (Cannon ve diğerleri, 2009). Lipofilik olduğundan dolayı kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen bu bileşiğin dopaminerjik nöronlarda mitokondriyal kompleks I'i inhibe ederek reaktif oksijen türlerinin birikimine sebep olduğu böylelikle bu hücrelerde nörotoksik bir etki oluşturduğu bilinmektedir (Thirugnanam ve Santhakumar, 2022). Buna ek olarak, kronik rotenon maruziyetinin rodentlerde ubikuitin ve α -syn içeren Lewy benzeri sitoplazmik inklüzyonların oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Giráldez-Pérez, Antolín-Vallespín, Muñoz ve Sánchez-Capelo, 2014). Buna ek olarak, kronik rotenon maruziyetinin deney hayvanlarında PH'nin anatomik, nörokimyasal, davranışsal ve nöropatolojik özelliklerini modellemede etkili bir ajan olduğu yapılan sayısız çalışma ile ortaya konmuştur (Miyazaki ve Asanuma, 2020).

2.5. PH Nöropatolojisinde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

İlk kez 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlanan ve modern tıp literatürüne kazandırılan PH'nin nöropatolojisinde rol oynayan moleküler süreçler günümüzde dahi tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Dong-Chen, Yong, Yang, Chen-Yu ve Li-Hua, 2023). Bununla birlikte, PH nöropatolojisinde rol oynayan mekanizmaları aydınlatmaya yönelik çalışmalardan elde edilen bulgular yaşlanma, genetik faktörler ve çevresel toksisite tarafından tetiklenen mitokondriyal disfonksiyon, nöroinflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi (ERS) gibi moleküler mekanizmaların doğrudan ya da dolaylı olarak dopaminerjik nöron ölümlerini tetiklediğini ve PH'nin nöropatolojisinde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Harischandra ve diğerleri, 2019; Raza, Anjum ve Shakeel, 2019). Ayrıca, hücrel protein homeostazında görevli olan ubikuitin proteazom sistem (UPS) ve otofaji

mekanizmalarında meydana gelen aksamaların, α -sinüklein (α -syn) protein agregatlarının nöron sitoplazmalarında birikimi sonucunda ortaya çıkan ve PH'nin nöropatogenezi ile doğrudan ilişkili olduğu bilinen Lewy Cisimciklerinin oluşumuna neden olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Hou, Watzlawik, Fiesel ve Springer, 2020; Walden ve Muqit, 2017).

2.5.1. PH Nöropatolojisinde Mitokondriyal Disfonksiyon

30 yılı aşkın süredir PH nöropatogenezi ile yakından ilişkilendirilen moleküler bir mekanizma olan mitokondriyal disfonksiyon, mitokondri homeostazıda görevli genlerdeki mutasyonlar, yaşlanma ve çevresel toksinlere maruz kalma nedeniyle ortaya çıkan patolojik bir süreçtir (Malpartida, Williamson, Narendra, Wade-Martins ve Ryan, 2021; Tryphena ve diğerleri, 2023). PH nöropatogenezinin erken evrelerinde ortaya çıkan ve bu hastalığın bütün evrelerinde rol oynadığı gösterilen mitokondriyal disfonksiyon ile PH arasındaki ilişki, ilk kez 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)'nin bir metaboliti olan MPP⁺'nin elektron taşıma zincirinde görevli mitokondriyal kompleks I'ı inhibe ederek kalıcı parkinsonizm semptomlarına neden olduğunun anlaşılmasıyla ortaya konulmuştur (Davie, 2008; Langston, Irwin, Langston ve Forno, 1984; Ramsay, Salach ve Singer, 1986). Mitokondriyal homeostazın regülasyonunda Parkin ve Pink-1 gibi PH ile ilişkili genlerin rol oynadığının gösterilmesi ile mitokondriyal disfonksiyon ve PH arasındaki ilişki moleküler düzeyde de doğrulanmıştır (Poewe ve diğerleri, 2017).

2.5.2. PH Nöropatolojisinde Nöroinflamasyon

Parkinson hastalarına ait postmortem doku örnekleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, *substantia nigra pars compacta* ve striatumda T-lenfosit infiltrasyonu, proinflamatuvar sitokin salınımı ve mikrogliya aktivasyonunun artış gösterdiğinin ortaya konulması PH ile inflamasyon süreci arasındaki ilişkinin anlaşılması için ilk adım olmuştur (Kouli, Torsney ve Kuan, 2018). Buna ek olarak, kemirgenlerde 6-hidroksidopamin (6-ODHA) ve MPTP ile indüklenen PH modellerinde artan mikrogliyal aktivitenin bu nörotoksinlere maruziyet sonrasında ortaya çıkan dopaminerjik nöron ölümleri ile yakından ilişkili olduğunun gösterilmesi nöroinflamasyon sürecinin PH ile ilişkili bir süreç olabileceğine dair düşünceleri güçlendirmiştir (Kouli ve diğerleri, 2018). Ayrıca, epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bulgular nonsteroidal bir antiinflamatuvar ilaç olan ibuprofenin düzenli

kullanımıyla PH riskinin azaldığını göstermektedir (Gao, Chen, Schwarzschild ve Ascherio, 2011).

2.5.3. PH Nöropatolojisinde ERS

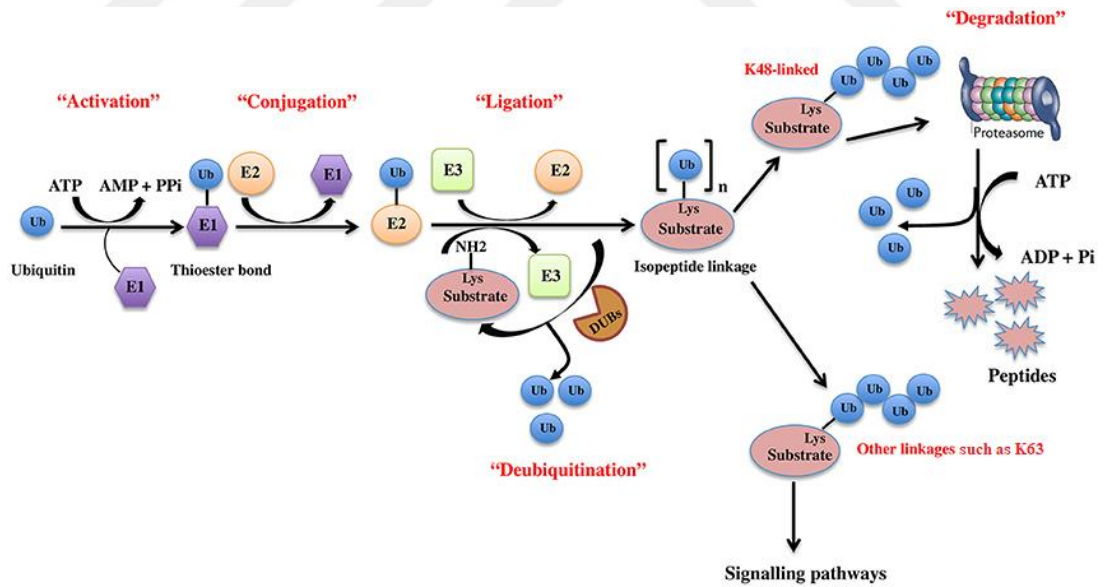
Hücrelerde hipoksi, kalsiyum homeostazisinin bozulması veya oksidatif stresin neden olduğu ERS fizyolojik veya patolojik durumlarda ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış polipeptidlerin birikimi sonucunda ortaya çıkan biyolojik bir süreçtir (Omura, Kaneko, Okuma, Matsubara ve Nomura, 2013). Farklı ekiplerce gerçekleştirilen birçok postmortem beyin çalışması, ERS ve ERS yanıtında görevli Grp78/Bip, PERK-1, ATF4, IRE-1, XBP1 ve CHOP gibi moleküllerin *substantia nigra pars compacta* ve striatumda disregüle olduğunu ve bu moleküllerin Lewy Cisimcikleri içerisinde yüksek oranda birikim gösterdiğini ortaya koymaktadır (Costa, Manaa, Duplan ve Checler, 2020). Buna ek olarak, rotenon ile indüklenen kemirgen PH modellerinde, ERS'nin rotenon maruziyetine bağlı dopaminerjik nöron ölümlerinde rol oynadığı ve ERS modülasyonunun dopaminerjik nöron homeostazı için önemli bir moleküler mekanizma olabileceği gösterilmiştir (Michel, Tadros, Hendy, Mowaka ve Ayoub, 2022; Motawi, Al-Kady, Abdelraouf ve Senousy, 2022).

2.5.4. PH Nöropatolojisinde Otofaji

Otofaji, hücre içerisinde işlevini yitirmiş protein ve/veya organellerin otofagozom adı verilen kesecikler içerisine alınarak lizozomlar aracılığı ile parçalandığı katabolik bir süreçtir (Minchev, Kazakova ve Sarafian, 2022). Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, protein homeostazından sorumlu olan bu mekanizmada ortaya çıkan aksaklıkların, dopaminerjik nöronlarda α -syn birikimlerinin artışında ve Lewy Cisimciklerinin ortaya çıkışında etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Nechushtai, Frenkel ve Pinkas-Kramarski, 2023). Örneğin, Stykel ve ark. otofaji mekanizmasında otofagozomların oluşumundan sorumlu LC3II'nin yapısal inaktivasyonunun α -syn birikimini arttırdığını, LC3II aktivasyonunun ise agregasyon sürecini baskılayarak α -syn yıkımını kolaylaştırdığını bildirmiştir (Stykel ve diğerleri, 2021). Ayrıca, α -syn aşırı ekspresyonunun Bcl2 ve Beclin 1 arasındaki etkileşimi arttırdığı, dolayısıyla otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Song ve diğerleri, 2014). Buna ek olarak, deneysel PH modellerinde trehaloz ve rapamisin gibi küçük molekülle otofaji aktivatorlerinin dopaminerjik nöronlar üzerinde koruyucu etkiler oluşturduğu rapor edilmiştir (Lu, Wu ve Yue, 2020).

2.6. Ubikuitin Proteozom Sistem ve Lizin 63 (K63) Ubikuitinasyonunun PH Nöropatolojisindeki Rollerine Dair İp Uçları

Ubikuitin Proteozom Sistem (UPS), hücre içerisinde işlevini yitirmiş ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını kontrol ederek hücrel protein homeostazının korunmasında rol oynayan özel bir proteoliz sistemidir (X. Zhang, Linder ve Bazzaro, 2020). UPS'nin temel çalışma prensibi: 76 amino asitlik bir protein olan ubikuitinin ubikuitin aktive edici (E1), ubikuitin konjuge edici (E2) ve ubikuitin ligaz (E3) enzimlerince hedef proteine ait lizin (K) rezidülerine eklenmesi ve ubikuitinize hedef proteinin 26S proteozom içerisinde sindirilmesi (Lázaro ve Outeiro, 2020). Öte yandan farklı K rezidülerine yapılan ubikuitinasyonların UPS'nin işleyişinde farklılıklara neden olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, K63 poli-ubikuitinasyonunun diğer birçok ubikuitinasyon paterninin (K11, K29, K48 gibi) aksine proteozomal yıkımı değil lizozomal yıkımı teşvik ettiği ve hücrelerde otofaji sürecini tetiklediği gösterilmiştir (Şekil 2) (Kwon ve Ciechanover, 2017).



Şekil 2: Ubikuitin Proteozom Sistem (UPS)'nin işleyişi (Gupta, Singh, Varshney ve Khan, 2018).

Proteozomal yıkımın aksine lizozomal ve otofajik protein degradasyonlarını teşvik etmesi nedeniyle diğer poli-ubikuitinasyon paterninden ayrılan K63 poli-ubikuitinasyonunun, PH'nin nöropatogenezinde önemli bir aktör olabileceğine dair ipuçları sunan birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin Tofaris ve ark. yaptıkları çalışmada, ubikuitin ligaz aktivitesine sahip Nedd4 enziminin yapılan K63 poli-ubikuitinasyonunun insan hücrelerinde α -syn'nin lizozomal yıkımını tetiklediğini göstermiştir (Tofaris ve diğerleri, 2011). Bir başka çalışmada, Alexopoulou ve ark. K63 deubikuitinasyonun α -syn'in lizozomal degradasyonunu engellediğine bu durumun ise Lewy cisimciklerinin oluşumunda etkili olabileceğine vurgu yapmıştır. Aynı çalışmada ayrıca, α -syn'lere bağlı K63 ubiquitin rezidülerini uzaklaştıran (deubikuitinize eden) ubiquitin spesifik proteaz 8 (USP8) inhibisyonunun, *in vitro* koşullarda α -syn'nin lizozomal yıkımını tetiklediği bunun yanı sıra *Drosophila* modelinde ise α -syn toksisitesini önlediği bildirilmiştir (Alexopoulou ve diğerleri, 2016). Tan ve ark. ise, K63 poli-ubikuitinasyonunun yanlış katlanmış ve/veya disfonksiyonel proteinler tarafından oluşturulan protein inklüzyonlarının otofajik yıkımıyla yakından ilişkili olabileceğine vurgu yaptıkları bir çalışma yayınlamışlardır (Tan, Wong, Dawson, Dawson ve Lim, 2008). Ayrıca, McKeon ve ark. K63 poli-ubikuitinasyonunun UCH-L1'in otofaji-lizozom sistemi tarafından degradasyonunu başlatıcı bir sinyal olarak görev aldığını rapor etmiştir (McKeon, Sha, Li ve Chin, 2015).

Bu literatür bilgilerine ek olarak, PINK1/Parkin mutant *Drosophila*'larda oluşturulan PH modelinde K63 ubikuitinasyonuna spesifik bir deubikuitinaz enzimi olan USP14 inhibisyonunun mitofaji yolağı üzerinden mitokondriyal disfonksiyonu hafiflettiği ve sineklerde lokomotor hareket defektlerinde iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir (Chakraborty ve diğerleri, 2018).

K63 poli-ubikuitinasyonunun PH'nin nöropatogenezinde rol oynayabileceğine dair diğer ipuçları insanlarda PRKN2 geni tarafından kodlanan bir ubikuitin ligaz enzimi olan Parkin proteini üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Kitada ve diğerleri, 1998; Kook ve diğerleri, 2020). Bu çalışmalardan ilkinde, Lim ve ark., Parkin tarafından gerçekleştirilen synphilin-1 K63 poli-ubikuitinasyonunun α -syn ve diğer Lewy Cisimciği ilişkili proteinlerin temizlenmesi ile K48 poli-ubikuitinasyonuna oranla daha yakından ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Lim ve diğerleri, 2005). Bir başka çalışmada ise Olzmann ve ark., Parkin tarafından gerçekleştirilen K63 poli-

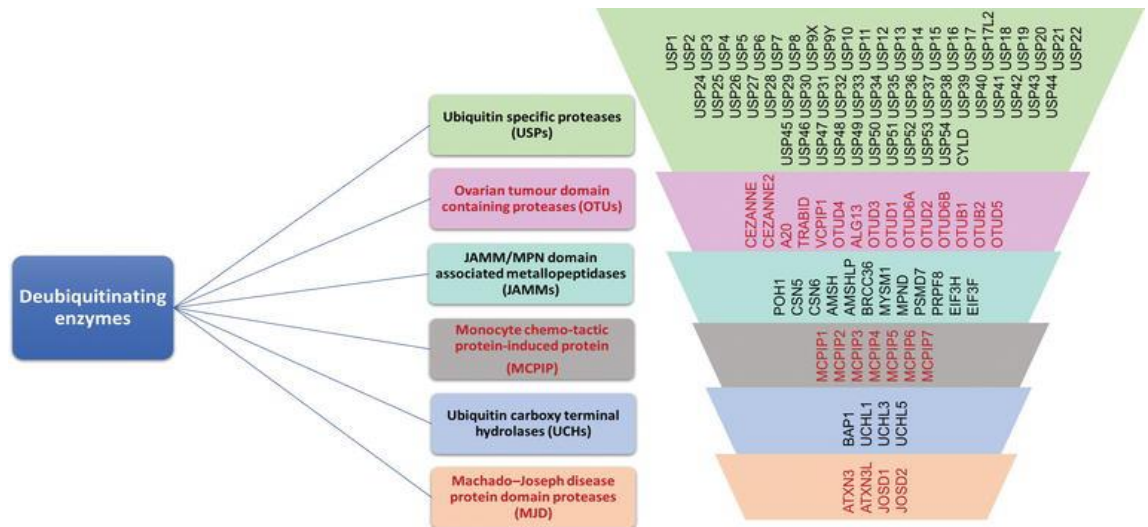
ubikuitinasyonunun yanlış katlanmış DJ-1 proteinlerinin HDAC6 aracılığı ile agrazomlara taşınmasında düzenleyici bir role sahip olduğu rapor etmiştir (Olzmann ve diğerleri, 2007). Bu çalışmalara ek olarak, yukarıda da bahsedildiği gibi, McKeon ve ark. Parkin'in aracılık ettiği K63 poli-ubikuitinasyonunun UCH-L1'in otofajilizozom sistemi tarafından degradasyonunu başlatıcı bir sinyal olarak görev aldığını göstermiştir (McKeon ve diğerleri, 2015). Bu çalışmalarda üzerinde durulan DJ-1 (Repici ve Giorgini, 2019), UCH-L1 (Leroy ve diğerleri, 1998) ve α -syn'i (E. M. Rocha, De Miranda ve Sanders, 2018) kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların PH'nin patogeneziyle doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çalışmaların varlığı da göz önünde bulundurulduğunda; yanlış katlanan ya da disfonksiyonel DJ-1, UCH-L1 ve α -syn varyantlarının Parkin tarafından düzenlenen K63 poli-ubikuitinasyonu aracılığı ile degradasyonunda meydana gelen aksamaların PH'nin nöropatogenezi için önemli bir aktör olabileceği açıkça görülmektedir. Buna ek olarak, Parkin enzimini kodlayan gende meydana gelen mutasyonların beynin SNpc bölgesindeki dopaminerjik nöronların ölümüne neden olarak PH'nin nöropatogenezinde etkili olduğunu gösteren birçok çalışmanın varlığı bu düşüncüyü desteklemektedir (Kook ve diğerleri, 2020).

K63 poli-ubikuitinasyonunun, PH'nin patogeneziyle yakından ilişkili olan ERS gibi moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde görev alabileceğine dair yayınlar da mevcuttur. 2019 yılında fare spinal kord nöronları üzerinde yapılan bir çalışmada mitokondriyal ubikuitin ligaz (MITOL) enzimi tarafından gerçekleştirilen IRE1 α K63 poli-ubikuitinasyonunun, ERS'nin hafifletilmesi ve ERS bağımlı apoptozun baskılanmasında kritik bir basamak olabileceği gösterilmiştir (Takeda ve diğerleri, 2019). Öte yandan, klinik ve prelinik çalışmalardan elde edilen bulgular ERS başta oksidatif stres ve α -syn protein agregasyonu gibi PH ilişkili süreçlerin indüksiyonunda etkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Colla, 2019; Mercado, Castillo, Soto ve Sidhu, 2016). Öyle ki nörotoksinler (MPTP, 6-ODHA ve rotenon) ile oluşturulan sporadik PH modellerinde ERS yanıtından sorumlu Bip/Grp78, XBP1, ATF4, PERK ve CHOP gibi moleküllerin ekspresyonlarında veya işlevlerinde meydana gelen aksamaların dopaminerjik nöronlarda ERS bağlı ölümleri tetiklediği gösterilmiştir (Colla, 2019). Sporadik PH modellerine ek olarak Conn ve ark. tarafından yapılan postmortem beyin araştırmalarında, ERS yanıtını oluşumunda görevli olan PERK/eIF2 α gibi proteinlerin Lewy Cisimcikleri içerisinde yoğun şekilde biriktiği gösterilmiştir (Conn ve diğerleri,

2004). Ayrıca, artan ERS bağlı olarak aktive olan ATF4'ün Parkin promotörüne bağlanarak Parkin ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Sun ve diğerleri, 2013). Dahası, Parkin'in XBP1 yolağının aktivasyonu ile ERS'ye karşı oluşturulan cevapta rol oynadığı ve Parkin overekspresyonunun hücreleri ERS aracılı apoptozdan koruduğunun gösterilmiş olması (Duplan ve diğerleri, 2013) PH'nin nöropatogenezinde ERS ve ubiquitinyon mekanizması arasındaki ilişkiyi anlamlandırabilmek için kanıtlar sunmaktadır.

2.7. K63 Spesifik Deubitkinaz BRCC3 ve PH ile İlişkisine Dair İp Uçları

Deubikuitinazlar (DUB), ubiquitin hedef proteinlerden uzaklaştırılmasını, ubiquitin geri dönüşümünü ve ubiquitin zincirlerinin yeniden düzenlenmesini katalizlemek suretiyle UPS'nin regülasyonunda rol oynayan enzimlerdir (Ruan, Schlüter ve Wang, 2020). DUB'lar ayrıca transkripsiyonel regülasyon, sinyal iletimi, DNA tamiri, hücrel farklılaşma ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir (Wang ve diğerleri, 2018). Günümüze kadar insanlarda yaklaşık olarak 100 farklı tipi tanımlanmış olan bu enzimler yapısal karakterlerine göre altı sınıfa ayrılmaktadırlar (Şekil 3): Ubikuitin Spesifik Proteazlar (USP'ler), Ovaryan Tümör Domain İçeren Proteazlar (OTU'lar), Machado-Joseph Hastalığı Protein Domain Proteaz (MJD) Monosit Kemotaktik Protein Tarafından İndüklenen Protein (MCPIP), Ubikuitin Karboksi Terminal Hidroksilazlar (UCH'ler) ve JAB1/MPN/Mov34 Metallopedidazlar (JAMM'lar) (Ruan ve diğerleri, 2020).



Şekil 3: Deubikuitinazların (DUB) sınıflandırılması (Kumari, Lee ve Jha, 2018).

Tez çalışması kapsamında nakavtı gerçekleştirilen BRCC3 (BRCA1-/BRCA2-containing complex 3), DUB'ların JAMM alt sınıfına mensup; K63 spesifik bir deubikuitinaz enzimidir (Meyer ve diğerleri, 2020). Çalışmalardan elde edilen veriler BRCC3'ün hücre döngüsü kontrolü, hücre proliferasyonu, DNA tamiri ve immün cevap oluşumu gibi birçok biyolojik sürecin regülasyonuna aracılık ettiğini ortaya koymaktadır (Meyer ve diğerleri, 2020; F. Zhang ve Zhou, 2018; W. Zhang ve diğerleri, 2020). Bu biyolojik süreçlere ek olarak, BRCC3 tarafından gerçekleştirilen K63 deubikuitinasyonunun NLRP3 inflamazom aktivasyonunda da kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Py, Kim, Vakifahmetoglu-Norberg ve Yuan, 2013; Rao ve diğerleri, 2019). Öte yandan, NLRP3'ün nöroinflamasyon, α -syn agregasyonu ve apoptoz gibi süreçler üzerinden PH'nin patogenezinde rol oynayabileceği ve NLRP3 inhibisyonunun PH'nin tedavisinde kullanılabilecek bir strateji olabileceğine dair yayınlar bulunmaktadır (Yan, Fang, Zheng, Pu ve Zhang, 2020). Bununla birlikte, yakın zamanda yayınlanan bir başka çalışmada ise Cheng ve ark., Cdk5 tarafından regüle edilen BRCC3 ekspresyonunun NLRP3 aktivasyonunu tetikleyerek dopaminerjik nöronlarda inflamasyon sürecini başlatabileceğini ve BRCC3 gen inhibisyonunun MPTP ile indüklenen PH modelinde NLRP3 aktivasyonunu baskılayarak nöroinflamasyonu hafiflettiğini göstermiştir. Aynı çalışmada ayrıca, BRCC3'ün PH hastalığıyla ilişkili diğer biyolojik süreçler ile ilişkisini gösteren çalışmalara ihtiyaç duyulduğuna vurgu yapılmıştır (Cheng ve diğerleri, 2020).

Bu literatür incelemesi doğrultusunda düşünüldüğünde, UPS ve UPS ile ilişkili hücresel mekanizmaların regülasyonunda anahtar görevlere sahip olan DUB'ların fonksiyonlarında ortaya çıkan aksaklıkların PH nöropatogenezinde rol oynayabileceği görülmektedir. Bu nedenle UPS'nin regülasyonunda görev alan DUB'ların PH ile ilişkilendirilen mitokondriyal disfonksiyon, α -syn agregasyonu, nöroinflamasyon, endoplazmik retikulum ERS ve otofaji süreçleri üzerine etkilerinin araştırılması PH'nin nöropatogenezinin daha iyi anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Bununla birlikte, DUB'ların PH'nin patogenezindeki etkinliğinin ortaya konulması bu hastalığın tedavisinde yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına ve ileriye dönük tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Bu bağlamda düşünüldüğünde tez çalışması kapsamında, K63 deubikuitinasyonları yoluyla UPS ve inflamazom aktivasyonu süreçlerinin regülasyonunda görev aldığı bilinen BRCC3'ün *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde ERS ve otofaji ile ilişkili

yolaklar üzerindeki etkisinin araştırılacak olması ilgili literatür ve bu hastalığın tedavisinde yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına katkı sağlama potansiyeline sahiptir.



Gereç ve Yöntem

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeleri ve Deney Ekipmanlar

Tablo 1: Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzemeler	Üretici Firma
Tyrosine Hydroxylase Polyclonal Antibody	Bios-USA (bs-0016R)
LC3 Polyclonal Antibody	Bios-USA (bs-8878R)
Beclin-1 Polyclonal Antibody	Bioss-USA (bs-1353R)
BRCC3 Antibody	Santa Cruz (sc-517392)
IRE1A Polyclonal Antibody	Bios-USA(bs-8680R)
LC3II Polyclonal Antibody	Bios-USA(BS-1832R)
Grp78/Bip Antibody	Bioss-USA (bs-1219R)
CHOP Polyclonal Antibody	Bioss-USA (1361R)
p62 Polyclonal Antibody	Bioss-USA (bs-55207R)
PERK Polyclonal Antibody	Bioss-USA (bs-2469R)
ATF6 Polyclonal Antibody	Bioss-USA (bs-1634R)
Alpha Synuclein Polyclonal Antibody	Bioss-USA (bs-0009R)
BRCC3 siRNA (ID: RSS337449)	Thermo (1330001)
BRCC3 siRNA (ID: RSS359676)	Thermo (1330001)
BRCC3 siRNA (ID: RSS359677)	Thermo (1330001)

Span 60	Merck (M840124.1000)
Alexa Flour 488	Jackson Immuno Research (111-545-003)
Alexa Flour 568	Thermo (A-11011)
Mayer's Hematoxylin	Bio-Optica (05-06002/L)
Rotenone	Sigma (R8875-1G)
D(+)-Glucose	Merck (M108337.1000)
Trypsin-EDTA Solusyonu	Nest (704001)
Penicilin/Streptomycin	Capricorn (PS-B)
Hanks' Balanced Salts	Capricorn (HBSS-2A)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma (A9418-100G)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn (FBS-22A)
DMEM/Ham's F-12	Capricorn (DMEM-12-A)
Transfer Stack, PVDF, regular size	Thermo (IB401001)
Tyripan Blue Solusyonu	Sigma (T8154-100ML)
Sample Reducing Agent	Thermo (NP0004)
Round Gel Loading Pipette Tips	Santa Cruz (sc-201732)
Mini Protein Gel	Thermo (NP0321BOX)
Cholesterol	Sigma (C3045-25G)
Chloroform	Merck (M.102431.2500)
Triton X-100	Merck (M.108603.1000)

Dimethyl Sulfoxide	Merck (M.116743.1000)
Chromogenic Kit, anti-mouse	Thermo (WB7103)
Protein Ladder	Thermo (26616)
DAPI	Santa Cruz (sc-3598)
Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA (78503)
SDS Running Buffer	Thermo (NP0001)
Antioxidant	Thermo (NP0005)
Protease Inhibitor Cocktail	Thermo (87789)
LDS Sample Buffer	Thermo (NP0007)

Tablo 2: Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler

Sarf malzemeleri	Üretici Firma
12 Well Cell Culture Plate	Nest (712001)
24 Well Cell Culture Plate	Nest (702001)
100 mm Cell Culture Dish	Nest (704001)
2 ml Cryogenic Vial	Nest (607001)
10 ml Serolojik Pipet	Nest (327001)
5 ml Serolojik Pipet	Nest (326001)
2 ml Serolojik Pipet	Nest (325001)
Spektrofotometre Küvet	Biosigma (N401060)

Yuvarlak Lamel	Superior (C911350)
Cam Balon Joje	Superior (C232221)
Folded Capillary Cell	Malvern Panalytical (DTS1070)
Dialysis Tubing	Thermo (88243)
Steril Hidrofilik PTFE Şırınga Filtre	AISIMO (ASF25PTI225)

Tablo 3: Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Mikrotom	Leica RM 2145
Class II Biohazard Safety Laminar Kabin	ESCO
Su Banyosu	Nüve-BM 402
-80 °C Ultra low Temperature Freezer	New Brunswick-U410 premium
CO ₂ İnhibitör	Eppendorf/New Brunswick
CO ₂ İnhibitör	Binder APT Line C150
Santifüj	Eppendorf Centrifuge (5804R)
Nanodrop	Thermo Scientific
Hassas Terazî	Precisa, Switzerland
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Labcycler	SensoQuest GmbH
İnverted Mikroskop	Olympus-CKX41

Fotoğraf makinesi entegre Mikroskop	Olympus BX5
Floresan Mikroskop	Olympus BX 50
Etüv	Heraeus, Germany
pH metre	Hanna, USA
XCell SureLock	ThermoFisher Scientific
Evapöratör	Büchi Vac-500
iBlot® Dry Blotting System	Thermo Fisher Scientific

3.2. Niozomların Sentezi, Niozom-siRNA Komplekslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyon Analizleri

3.2.1. Niozomların Sentezi ve Niozom-siRNA Komplekslerinin Oluşturulması

Niozomlar, non-iyonik surfaktanların hidrolizi ile elde edilebilen lipozom benzeri sentetik veziküllerdir (S. Chen, Hanning, Falconer, Locke ve Wen, 2019). Taşıyıcı sistem olarak niozomların kullanıldığı birçok prelinik çalışmada, bu sentetik veziküllerin subkutan, intravenöz, peroral ve transdermal olarak uygulanan terapötik ajanların etkinliğini arttırdığına, buna karşın bu maddelerin yan etkilerini azalttığına dair kanıtlar sunan çalışmaların (Abdelrahman, Elsayed, Gad, Elshafeey ve Mohamed, 2017; S. Chen ve diğerleri, 2019; Zidan ve Habib, 2014) yanı sıra siRNA gibi biyo-stabilitesi düşük moleküllerin vücut içi taşınımında etkili olduğunu (Yang ve diğerleri, 2018) ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiğini (Gharbavi, Amani, Kheiri-Manjili, Danafar ve Sharafi, 2018) gösteren yayınların varlığı nedeniyle çalışmada taşıyıcı sistem olarak niozomların kullanılmasına karar verilmiştir.

In vitro ve *in vivo* deneylerde taşıyıcı sistem olarak kullanılan niozomların sentezi, Moulahoum ve ark. önerdiği şekilde aşağıdaki basamakların takip edildiği ince film hidratasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Moulahoum, Sanli, Timur ve Zihnioglu, 2019):

1. 1:1 molar konsantrasyonda olacak şekilde tartılan Span 60 ve kolesterol (20 mM) karışımı, hacimce 1:2 oranında karıştırılan metanol-kloroform solventi içerisinde çözündürülmüştür.
2. Çözdürme işleminden sonra, oluşturulan süspansiyon 50 mL şilifli balona alınmış ve solvent rotary evaporatör ile buharlaştırılıp, vakum yardımıyla çözeltiden uzaklaştırılmıştır. Böylelikle ince bir film tabakası elde edilmiştir.
3. Sulu faz olarak balona 5 mL fosfat tamponlu salin (phosphate-buffered saline;PBS) eklenmiş ve 55 °C'ye ayarlı mekanik çalkalayıcıda 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
4. Bu şekilde sentezlenen niozomlara, boyutlarının küçültülmesi amacıyla prob sonikasyonu işlemi uygulanmıştır.

Niozom-siRNA komplekslerinin hazırlanmasında ise Pengnam ve ark. tarafından önerilen prosedür takip edilmiştir (Pengnam ve diğerleri, 2019, 2020). Bu prosedür doğrultusunda yukarıdaki gibi sentezlenen niozomlar ile siRNA stok solüsyonundan hazırlanan örnekler 0.1: 1, 0.5: 1, 1: 1, 2.5: 1, 5: 1, 10:1, 15: 1, ve 20: 1 oranlarında karıştırılarak 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

Yukarıda anlatıldığı gibi oluşturulan boş niozomların ve niozom-siRNA komplekslerinin dayanıklılığını arttırmak amacıyla Huang ve ark. önerdiği şekilde aşağıda sıralanan işlem basamakları takip edilerek polietilen glikol kaplaması (PEGilasyon) gerçekleştirilmiştir (Y. Huang, Chen, Chen, Gao ve Liang, 2008):

1. Niozom dispersiyonu %5 mol oranda DSPE-PEG-karboksilik asitle karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle manyetik karıştırıcıda inkübe edilmiştir.
2. Konjuge olmayan DSPE-PEG-karboksilik asidin uzaklaştırılması amacıyla, reaksiyon sonrası 7000 rpm'de santrifüj gerçekleştirilmiştir.

Bu şekilde sentezlenen ve PEGilasyonu gerçekleştirilen boş niozomlar ve niozom-siRNA kompleksleri daha sonrasında liyofize edilmiştir.

3.2.2. Boş Niozomların ve Niozom-siRNA Komplekslerinin Karakterizasyonu

Boş niozomlar ve BRCC3 genine spesifik siRNA molekülleri ile yüklenmiş niozom-siRNA komplekslerinin zeta potansiyeli, ortalama boyutu ve niozomların boyut

dağılımlarının homojenliğini gösteren Polidispersite indeksi (PDI) değerleri dinamik ışık saçılımı (DLS) cihazı ile (Moulahoum ve diğerleri, 2019) analiz edilmiş ve değerler kaydedilmiştir.

siRNA kapsülleme verimliliğine dair analizler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), niozomların morfoloji analizleri ise Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission electron microscopy; TEM) ile gerçekleştirilmiştir (Thabet, Elsabahy ve Eissa, 2022).

3.3. *In Vitro* Deneyler

3.3.1. Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının İzolasyonu ve Hücre Kültürü

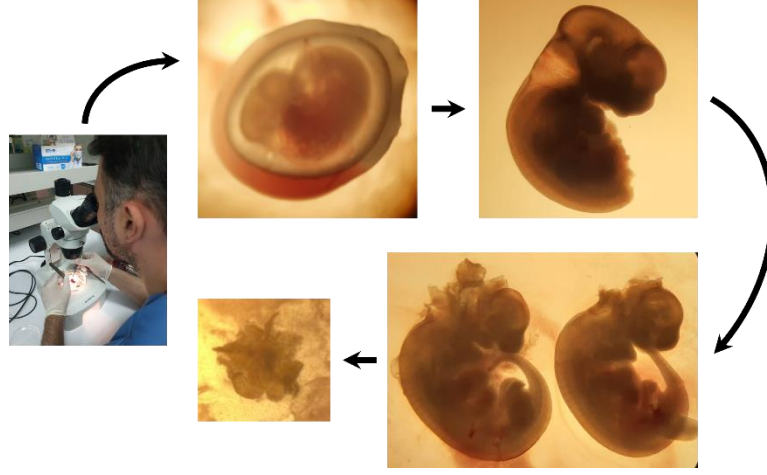
In vitro PH modelinin oluşturulması ve niozom-siRNA kompleksi ile gerçekleştirilecek BRCC3 gen nakavtının etkilerinin araştırılması amacıyla sıçan embriyolarından elde edilen primer orta beyin dopaminerjik nöron hattı kullanılmıştır.

Primer orta beyin dopaminerjik nöron hattının izolasyonunda kullanılan sıçan embriyoları, Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarından temin edilen 6-8 haftalık, ağırlıkları 190-220 gr arasında değişen 2 adet dişi ve 2 adet erkek Spargue Dawley türü sıçanın çiftleştirilmesi ile elde edilmiştir. 3 menstrüel siklus boyunca vajinal smear yöntemi ile takip edilen ve menstrüel döngülerinin düzgün olduğu anlaşılan dişi sıçanlar, bir gece boyunca erkek sıçanlar ile çiftleşmeye bırakılmıştır. Ertesi gün dişi sıçanların gebelik durumları servikal sürüntüde sperm tespit yöntemi ile değerlendirilmiş ve gebe oldukları tespit edilen sıçanlar ayrı bir kafese alınmıştır. Ayrı kafeslere alındıkları gün gebeliklerinin embriyonik 0,5. (E0.5) günü olarak kabul edilen sıçanlar 14 gün boyunca takip edilmiştir.

Gebeliklerinin E14.5 gününe ulaşan dişi sıçanlar kombine ketamin (60 mg/kg)-ksilazin (10 mg/kg) anestezi altına alınmış ve sıçanların karın bölgesi %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Daha sonra uterus keselerinin tümü açığa çıkana kadar abdominal kesi işlemi gerçekleştirilmiştir ve uterus vajinal bağlantı noktasından kesilerek çıkarılmıştır. Bu işlem sonunda rezeke edilen uterus donma sıcaklığındaki Hank'ın Dengeli Tuz Solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution; HBSS) içerisinde petri kaplarına alınmıştır.

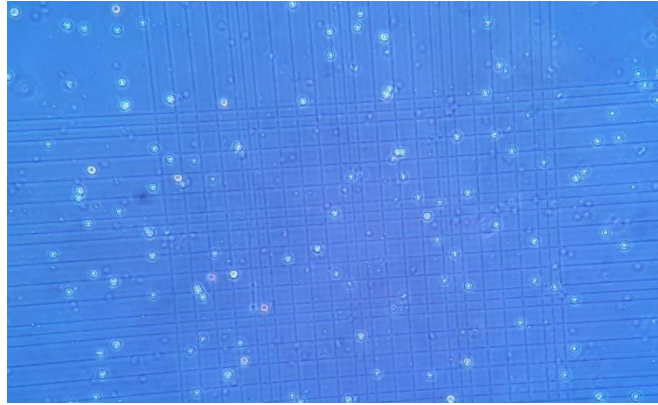
Amniyotik kese içerisindeki embriyolar hızlıca çıkarılarak içerisinde HBSS bulunan petrilere diseksiyon mikroskobu altına taşınmış (Şekil 4) ve aşağıdaki işlemler gerçekleştirilerek primer orta beyin dopaminerjik nöron hattı elde edilmiştir (Weinert, Selvakumar, Tierney ve Alavian, 2015):

1. Diseksiyon mikroskobu altında embriyoların orta beyin (mezensefalik) bölgesi makas ve pens yardımıyla diansefalonu ayrılmış ve mezensefalik bölgedeki beyin zarları (meninksler) dikkatlice temizlenmiştir.
2. Bu şekilde meninkslerden arındırılan mezensefalik bölge petri kabı içerisinde steril bir traş bıçağı yardımı ile ikiye ayrılmış ve bu parçalar içerisinde 15 ml HBSS bulunan falkon tüplerine aktarılmıştır. Bütün embriyolar bitene kadar 1. ve 2. adımlar tekrar edilmiştir.
3. Steril laminar kabin içerisine taşınan falkon tüplerinden HBSS uzaklaştırıldıktan sonra, tüplere 37 °C'ye ısıtılmış 1 ml %0,05 tripsin-EDTA eklenmiş ve tüpler 37 °C'de 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonrasında Tripsin-EDTA tüplerden uzaklaştırılmış ve Tripsin aktivasyonunu durdurmak için HBSS içerisinde hazırlanmış 1 ml %50'lik Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum; FBS) içeren deaktivasyon medyumuna tüplere eklenmiş ve 2 dk süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
5. Deaktivasyon işleminden sonra, deaktivasyon medyumuna tüplerden uzaklaştırılmış, daha sonra tüplere penicillin, streptomisin, D-(+)-glukoz, Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin; BSA) ve FBS içeren 1 ml DMEM medyumuna (complete medium) eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi 2 defa tekrar edilmiştir.
6. Yıkama işleminden sonra tüplere 1 ml complete medium eklenmiş ve tüpler içerisindeki dokular steril pipet ucu yardımı ile öğütülmüştür.
7. Bu şekilde hazırlanan süspansiyon 400 x g'de 5 dk süre ile sentrifüjlenmiştir.
8. Santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatant atılmış, geriye kalan pellet ise 1 ml complete medium yardımı ile resüspanse edilmiştir.



Şekil 4: E.14.5 günlük embriyolardan orta beyin bölgesi izolasyonuna ait işlem basamakları

Bu şekilde elde edilen süspansiyon içerisindeki hücrelerin sayısı ve canlılık oranını belirlemek için süspansiyondan 10 µl alınarak, 90 µl Tripan Mavisi çözeltisi ile karıştırılmış ve hücre sayım analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5: Tripan mavisi ile boyanan hücrelerde gerçekleştirilen hücre sayımına ait hemositometre görüntüsü

Sayım işleminden sonra, her 1 µl'ye 1500 hücre düşecek şekilde tüpün içerisine complete medium eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan süspansiyondan içerisinden 3×10^5 hücre içerecek şekilde örnekler çekilerek, 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş

Poly-L-Ornitine kaplı 14 mm’lik lamellere ekilmiş ve 24 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında kuyucuklara 400 µl complete medium eklenmiş ve 37 °C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra kuyucuklara 500 µl complete medium eklenmiştir. Bu aşamadan sonra her iki günde bir hücrelerin kültür ortamları değiştirilmiş ve hücreler 5 gün süre ile kültüre edilerek diferansiye olmaları sağlanmıştır (Weinert ve diğerleri, 2015).

3.3.2. Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının Karakterizasyonu

“Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının İzolasyonu ve Hücre Kültürü” başlığı altında anlatıldığı gibi izole edilen ve kültürü gerçekleştirilen hücre hattının karakterizasyonu için dopaminerjik nöronlara spesifik belirteçler olan tirozin hidroksilaz (TH) ve mikrotübül ilişkili protein 2 (Map2) proteinlerinin tespiti amacıyla “*In Vitro* Deneylerde Gerçekleştirilen Analizler” başlığı altında anlatıldığı gibi immünofloresan boyama analizleri gerçekleştirilmiştir (Weinert et al., 2015).

3.3.3. Deneylerde Kullanılacak siRNA’nın Seçimi

In vitro ve *in vivo* deneylerde BRCC3 geni susturumunda kullanılacak siRNA’nın seçimi amacıyla “Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının Karakterizasyonu” başlığı altında anlatıldığı gibi karakterizasyonu yapılan hücrelerde 3’er tekrar olacak şekilde (her grup için 3 lamel) Kontrol, siRNA 1 (RSS337449), siRNA 2 (RSS359676) ve siRNA 3 (RSS359677) grupları oluşturulmuştur.

Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir işlem uygulanmazken, diğer gruplardaki hücrelerin kültür ortamlarına 100 nm olacak şekilde ayrı ayrı siRNA 1 (RSS337449), siRNA 2 (RSS359676) ve siRNA 3 (RSS359677) eklenmiş ve tüm gruplardaki hücreler 37 °C’de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Primer orta beyin dopaminerjik nöron hattında en güçlü susturumu yapan siRNA’nın tayini amacıyla 48 saat boyunca siRNA’lar ile inkübe edilen hücreler tripsin ile kaldırılmış ve bu hücrelerde eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time polymerase chain reaction; RT-qPCR) analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. *In Vitro* PH Modelinin Oluşturulması ve Deney Dizaynı

İzolasyonu, kültürü ve karakterizasyonu gerçekleştirilen primer dopaminerjik nöron hatlarında Kontrol, Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA

grupları oluşturulmuştur. Oluşturulan gruplar ve bu gruplara uygulanan deneysel prosedür aşağıdaki gibidir:

Kontrol Grubu: 3×10^5 hücre içeren bu gruptaki hücreler 7 gün boyunca standart besi ortamında (DMEM/F12 medyumunu) kültüre edilmiş, başka herhangi bir madde uygulaması yapılmamıştır.

Parkinson Grubu: 3×10^5 hücre içeren bu gruptaki hücreler ilk iki gün DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiştir. Üçüncü gün ise besi ortamına dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş olan 20 nM rotenon eklenmiştir. Hücreler 48 saat boyunca bu ortamda inkübe edilmiş böylece *in vitro* PH modeli indüklenmiştir (Ostendorf, Metzdorf, Gold, Haghikia ve Tönges, 2020). PH modelinin indüksiyonundan sonra rotenon içeren kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler tekrardan standart besi ortamına alınarak 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Parkinson+Niozom Grubu: 3×10^5 hücre içeren bu gruptaki hücreler ilk iki gün DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiştir. Üçüncü gün ise besi ortamına dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş olan 20 nM rotenon eklenmiştir. Hücreler 48 saat boyunca bu ortamda inkübe edilmiş böylece *in vitro* PH modeli indüklenmiştir (Ostendorf ve diğerleri, 2020). PH modelinin indüksiyonundan sonra rotenon içeren kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler tekrardan standart besi ortamına alınmış ve kültür ortamına siRNA taşınımında kullanılacak miktarda (niozom karakterizasyonundan sonra belirlenen miktar) boş niozom eklenmiştir. Hücreler bu ortamda 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Parkinson+Niozom-siRNA Grubu: 3×10^5 hücre içeren bu gruptaki hücreler ilk iki gün DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiştir. Üçüncü gün ise besi ortamına dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş olan 20 nM rotenon eklenmiştir. Hücreler 48 saat boyunca bu ortamda inkübe edilmiş böylece *in vitro* PH modeli indüklenmiştir (Ostendorf ve diğerleri, 2020). PH modelinin indüksiyonundan sonra rotenon içeren kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler tekrardan standart besi ortamına alınmış ve kültür ortamına niozomlar ile kaplanmış BRCC3'e spesifik 100 nM siRNA (siRNA seçimi analizleri ile belirlenen) eklenmiştir (Cooper ve diğerleri, 2014). Hücreler bu ortamda 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Deney prosedürünün sonunda (7. günde) gruplardaki TH protein ekspresyonu değişimlerinin ortaya konulması amacıyla “*In Vitro* Deneylerde Gerçekleştirilen

Analizler” başlığı altında anlatıldığı gibi IF boyamaları gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, indüklenen *in vitro* PH modelinin ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının, otofaji ve ERS ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin ortaya konulması amacıyla “*In Vitro* Deneylerde Gerçekleştirilen Analizler” başlığı altında anlatıldığı gibi RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. *In Vitro* Deneylerde Gerçekleştirilen Analizler

3.3.5.1. İmmünofloresan (IF) Boyama Analizleri

İzolasyonu ve kültürü yapılan primer orta beyin dopaminerjik nöron hattında dopaminerjik nöronlara spesifik belirteçler olan tirozin hidroksilaz (TH) ve mikrotübül ilişkili protein 2 (Map2)’nin tespiti ve *in vitro* PH modeli indüklenen hücrelerde BRCC3 gen nakavtının TH protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen IF boyama analizleri Açıkgoz ve ark. önerdiği şekilde aşağıdaki işlem basamakları takip edilerek yapılmıştır (Acikgoz ve diğerleri, 2022):

1. Poly-L-Ornitin kaplı lamellere ekilerek diferansiye olması sağlanan hücreler PBS içerisinde hazırlanmış %4’lük paraformaldehit (PFA) ile +4 °C’de 15 dakika fikse edilmiştir.
2. Fiksasyondan sonra PFA ortamdan uzaklaştırılmış ve örnekler yıkama amacı ile 3x5 dakika PBS’te bekletilmiştir.
3. Bu basamaktan sonra örnekler, hücrelerde permeabilizasyonu arttırmak amacı ile PBS içerisinde hazırlanmış %0.25’lik Triton-X solüsyonuna alınmış ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Permeabilizasyon işleminin ardından örnekler PBS ile yıkanıp bloklama işlemi için PBS içerisinde hazırlanmış %5 BSA solüsyonuna alınarak oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
5. BSA’nın ortamdan uzaklaştırılmasını takiben lamellerde yıkama işlemi yapılmaksızın 1/100 oranında dilue edilmiş primer antikolar (TH ve Map2a Bioss; ABD) örnekler üzerine eklenmiş ve nemli ortamda, bir gece boyunca +4°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra, lameller 3 kez 5’er dakika boyunca PBS ile yıkanmıştır.

6. PBS ile yıkama aşamalarından sonra lameller karanlık bir ortamda 1/1000 oranında dilue edilmiş ve FITC bağlı sekonder antikor ile oda sıcaklığında 60 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
7. Son aşamada preparatlar son kez PBS ile 3x5 dk yıkandıktan sonra nükleus boyuması için 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) kapama medyumu ile kapatılmıştır.

Kapatılan preparatlar, Olympus CX31RTSF-5 marka IF mikroskop ile incelenmiştir.

3.3.5.2. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri

Deneylerde kullanılacak siRNA'nın seçimi ve *in vitro* PH modelinin ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının, otofaji ve ERS ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerinin işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Steril deney tüplerine alınan hücrelerden Nucleospin RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel; Almanya) içerisinde çıkan prosedür takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
2. RNA izolasyonundan sonra OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (abm; Almanya) içerisinde çıkan prosedür takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
3. Elde edilen cDNA'lardan ayrı ayrı 2 µl örnekler alınmış ve her bir hedef gen için hazırlanmış ve etiketlenmiş farklı PCR tüpleri içerisine aktarılmıştır.
4. Daha sonra bu tüplerden her birine; 13,8 µl distile su, 2 µl SYBR Green I enzim karışımı, 1,6 µl Mg⁺², 0,3 µl Forward Primer (BRCC3, LC3II, p62/SQSTM1, Beclin 1, Grp78/Bip, PERK, IRE1, ATF6, CHOP ve GAPDH) ve 0,3 µl Revers Primer (BRCC3, LC3II, p62/SQSTM1, Beclin 1, Grp78/Bip, PERK, IRE1, ATF6, CHOP ve GAPDH) eklenmiştir.
5. Bu şekilde oluşturulan bu karışım 5 saniye boyunca 700g'de sentrifüj edilerek homojen hale getirilmiştir. Daha sonrasında uygun programa ayarlanmış olan LightCycler içerisine konulan tüplerde RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Gurel ve diğerleri, 2019).

Analizler sonunda elde edilen veriler $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile değerlendirilecek ve 2’den büyük, -2’den küçük değerler anlamlı kabul edilecektir (Kuşçu, Gürel, Buhur, Karabay Yavaşoğlu, ve diğerleri, 2022).

Hedef genlere ait primer sekansları Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4: RT-qPCR analizlerinde kullanılan primer sekansları

Gen	Primer Dizileri	Referans
BRCC3	Forward: 5’CGGAAAGGTTGGCGGAACCAC-3’ Reverse: 5’-TGGCTTGCGTGCGAACATCC-3’	(X. Huang ve diğerleri, 2021)
LC3II	Forward: 5’- CCTGCTGCTGGCCGTAGT-3’ Reverse: 5’- TGATGAAGTCTTCCTGCCAAAA -3’	(Ni, Gong, Yan ve Zhang, 2010)
Beclin 1	Forward: 5’- AGCACGCCATGTATAGCAAAGA -3’ Reverse: 5’- GGAAGAGGGAAAGGACAGCAT -3’	(Ni ve diğerleri, 2010)
p62/SQSTM1	Forward: 5’- TCCTGCAGACCAGAACTATGACATCG-3’ Reverse: 5’- TCTACGCAAGCTTACAACATGAGACA -3’	(L. ze Zhang ve diğerleri, 2019)
Grp78/Bip	Forward: 5’- CTGGGTACATTTGATCTGACTGG -3’ Reverse: 5’- GCATCCTGGTGGCTTTCCAGCCATTC-3’	(Williams ve Lipkin, 2006)
ATF6	Forward: 5’- GCAGGTGTATTACGCTTCG-3’ Reverse: 5’- CCTGCTCCTTCTCCTTCAT-3’	(C. Zhang ve diğerleri, 2017)
PERK	Forward: 5’- AGGAACATCGTAGGGGCTTT3-3’ Reverse: 5’- GAGTTGCAGACCCGAGCTAC-3’	(Kalpana, Priyadarshini, Sreeja, Jagan ve Anuradha, 2018)
IRE1	Forward: 5’- CACAGCCCCTCTGTGGTAAC-3’ Reverse: 5’- GCTTTCACCAGGCACACTTA-3’	(Kalpana ve diğerleri, 2018)

CHOP	Forward: 5'- GAAAGCAGAAACCGGTCCAAT-3' Reverse: 5'- GGATGAGATATAGGTGCCCCC-3'	(Williams ve Lipkin, 2006)
GAPDH (Referans Gen)	Forward: 5'- GGATGCAGGGATGATGTTCT -3' Reverse: 5'- AAGGGCTCATGACCACAGTC -3'	(Drummond, Glynn, Lujan, Dicarlo ve Rasmussen, 2008)

3.4. *In Vivo* Deneyler

3.4.1. Çalışmanın Etiği ve Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları

Tez çalışmasının *in vivo* basamağı Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun, 23 Haziran 2021 tarih ve 2021- 041 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiş olup tez çalışmanın *in vivo* basamağında Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarından temin edilen 96 adet 190-220 gr ağırlığındaki erkek Sprague Dawley türü sıçan kullanılmıştır.

Teminleri sonrasında Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Birimi'ne getirilen deney hayvanları her kafeste 5 hayvan olacak şekilde kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan ve deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanan odalar içerisinde barındırılmıştır.

3.4.2. *In Vivo* PH Modelinin İndüksiyonu ve Deney Dizaynı

Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarından temin edilen ve Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme Ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Birimi'ne getirilen deney hayvanları her grupta 24 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrılmıştır. Tez çalışmasının *in vivo* basamağında oluşturulan gruplar ve bu gruplara uygulanan deney prosedürü aşağıdaki gibidir:

Kontrol Grubu (n=24): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir uygulama ya da girişim yapılmamıştır. Bu gruptaki hayvanlar deney prosedürünün sonunda (42. gün) sakrifiye edilmiştir.

Parkinson Grubu (n=24): Bu gruptaki hayvanlarda 5 hafta (35 gün) boyunca hergün 2 mg/kg subkutan rotenon enjeksiyonu yapılarak *in vivo* PH modeli indüklenmiştir (Y. Chen ve diğerleri, 2015). Bu uygulamaya ek olarak başka herhangi bir uygulama ya da girişim yapılmayan bu hayvanlar deney prosedürünün sonunda (42. gün) sakrifiye edilmiştir.

Parkinson+Boş Niozom Grubu (n=24): Bu gruptaki hayvanlarda 5 hafta (35 gün) boyunca hergün 2 mg/kg subkutan rotenon enjeksiyonu yapılarak *in vivo* PH modeli indüklenmiştir (Y. Chen ve diğerleri, 2015). Bu uygulamaya ek olarak bu gruptaki hayvanlara son rotenon enjeksiyonundan 2 saat sonra başlanarak 48 saat arayla 3 kez serum fizyolojik içerisinde 150 µg boş niozom uygulaması yapılmıştır. Boş niozom uygulamaları kuyruk venine yapılmış olup, bu hayvanlar deney prosedürünün sonunda (42. gün) sakrifiye edilmiştir.

Parkinson+Niozom-siRNA Grubu (n=24): Bu gruptaki hayvanlarda 5 hafta (35 gün) boyunca hergün 2 mg/kg subkutan rotenon enjeksiyonu yapılarak *in vivo* PH modeli indüklenmiştir (Y. Chen ve diğerleri, 2015). Bu uygulamaya ek olarak bu gruptaki hayvanlara son rotenon enjeksiyonundan 2 saat sonra başlanarak 48 saat arayla 3 kez serum fizyolojik içerisinde 150 µg niozom-siRNA kompleksi uygulaması yapılmıştır (Cooper ve diğerleri, 2014). Niozom-siRNA kompleksi uygulamaları kuyruk venine yapılmış olup, bu hayvanlar deney prosedürünün sonunda (42. gün) sakrifiye edilmiştir.

3.4.3. In Vivo Deneylerde Gerçekleştirilen Analizler

In vivo deney gruplarındaki hayvanlarda motor aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla davranış testleri uygulanmış olup bu gruplardaki hayvanlardan elde edilen orta beyin örneklerinde otofaji (p62, LC3 ve Beclin 1) ve ERS belirteçlerinin (Grp78, ATF6, PERK, IRE1 ve CHOP) protein ve mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin ortaya konulması amacıyla immünohistokimyasal (IHC) boyamalar ve RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca uygulanan tedavinin beyine ulaşım ulaşmadığı *in vivo* imaging system (IVIS) yöntemi ile görüntülenmiştir. Bu analizlere ek olarak

dokulardaki hasarın değerlendirilmesi amacıyla hematoksilen-eozin ve toludine mavisi boyamaları yapılmıştır.

3.4.4. Davranış Testleri

3.4.4.1. Açık Alan Testi

Açık alan testi sıçanlarda motor aktivitenin değerlendirilmesinde en sık kullanılan davranış testidir (Wrangel, Schwabe, John, Krauss ve Alam, 2015). Çalışmamızda her gruptan rastgele seçilen 8 hayvan üzerinde deneyin 0. 21. ve 42. günlerinde gerçekleştirilen açık alan testinde, yüksekliği 36 cm, boyutları ise 72 cm x 72 cm olan ve 16 eşit kareye bölünmüş bir kutunun (şekil 6) merkezine yerleştirilen sıçanların hareketleri 5 dk boyunca kamera ile kayıt altına alınmıştır. Her bir ölçümden sonra kutu %70 etanol ile temizlenmiştir (Garabadu ve Agrawal, 2020). Açık alan testinde hareketsiz geçirilen süre, şahlanma, ambulasyon (toplam geçilen kare sayısı) ve katedilen horizontal mesafe parametreleri değerlendirmeye alınmıştır (Garabadu ve Agrawal, 2020).



şekil 6: Açık alan testlerinde kullanılan deney düzeneği

3.4.4.2. Bar (Çubuk) Katalepsi Testi

Sıçanlardaki katılık (rijidite) ve hareketlerde yavaşlama (bradikinezi) gibi parkinsonizm belirtileri çubuk katalepsi testi ile değerlendirilmiştir. Bu testte sıçanlar, 9 cm yüksekliğindeki yere paralel olan yatay bir çubuğa (Şekil 7) yarı şahlanmış pozisyonda yerleştirilerek ve kronometre çalıştırılmıştır. Sıçan çubuktaki ayaklarından birisini çektiği ve ayaklarını zemine koyduğu anda kronometre durdurulmuş ve bu süreler kaydedilmiştir. Çubuk testi için en uzun bekleme süresi 180 saniye olarak belirlenmiştir (Y. Chen et al., 2015; Zhou et al., 2007).



Şekil 7: Çubuk katalepsi testlerinde kullanılan deney düzeneği

3.4.5. *In Vivo* Görüntüleme Sistemi (IVIS) Analizleri

Tez çalışması kapsamında Parkinson+Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarına kuyruk veninden uygulanan boş niozom ve niozom-siRNA komplekslerinin beyine ulaşp ulaşmadığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilen IVIS analizleri küçük deney hayvanlarında yapılan araştırmalarda floresans veya bioluminesans şiddetlerini ölçerek enjekte edilen maddenin vücutta izlediği yolun görüntülenmesine olanak sağlayan bir tekniktir (Hwang, Tyszkiewicz, Morin, Point ve Liu, 2021).

Parkinson+Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında davranış deneyleri için seçilen 8 hayvan üzerinde gerçekleştirilen bu analizlerde, boş niozom ve niozom-siRNA kompleksleri Cy5 boyası ile boyanmış ve 615–665 nm excitation, 695–770 nm

emission dalga boylarında (Yanagi ve diğerleri, 2016) IVIS spektrum cihazı ile 1, 3, 5, 24, 48 ve 72. saatte görüntüler alınarak vücuttaki dağılımları incelenmiştir.

3.4.6. Biyokimyasal Analizler

3.4.6.1. Biyokimyasal Analizler İçin Orta Beyin Dokusu Örneklerinin Hazırlanması

Anestezi altına alınan sıçanlar servikal dislokasyon ile dekapite edildikten sonra hayvanlara ait sol hemisfere ait orta beyin dokuları sıçan beyin atlası (Paxinos and Watson, 2007) yardımıyla hızlı bir şekilde diseke edilmiştir. Diseke edilen orta beyin dokuları proteaz ve fosfataz inhibitörü eklenmiş ve pH'ı 8.0'e ayarlanmış KCl tamponu (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 300 mM, etilendiamintetraasetik asit 1 mM, Triton-X %0,5) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen orta beyin dokuları +4 °C'de 20 dk boyunca 14.000 x g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası elde edilen süpernatant lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivasyonunu tayini için kullanılacak enzim bağlı immünosorbent analizleri (ELISA) için kullanılmak üzere toplanacak ve analizler gerçekleştirilene kadar -80 °C'de saklanmıştır (Ojha, Javed, Azimullah, Khair and Haque, 2015).

3.4.6.2. Lipit Peroksidasyon Analizleri

Çalışmada beyin dokusundaki lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir (Y. Chen et al., 2015; Gurel et al., 2019). MDA seviyelerinin ölçümü için satın alınan Malondialdehyde ELISA Kitinin (BioVision; ABD) direktiflerine göre hazırlanan örnekler, ELISA plaka okuyucu ile 532 nm dalga boyunda okutulmuş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

3.4.6.3. Antioksidan Enzim Aktivitesi Analizleri

Çalışmada beyin dokusundaki anti oksidan enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi seviyelerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir (Y. Chen ve diğerleri, 2015; Ojha, Javed, Azimullah, Khair ve Haque, 2015). SOD enzim aktivitesi seviyelerinin ölçümü için satın alınan Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kitinin (BioVision; ABD) direktiflerine göre hazırlanacak örnekler, ELISA plaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda okutulmuş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

3.4.7. Histolojik Analizler

3.4.7.1. Histolojik Analizlerde Kullanılacak Orta Beyin Dokularının Hazırlanması

Histolojik analizlerde kullanılacak beyin dokularının elde edileceği hayvanlara kombine ketamin (60 mg/kg)-ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında intrakardiyak perfüzyon işlemi (%10 formolin kullanılmıştır) uygulanmıştır. Sıçanların burun ve anal açıklıklarından fiksatif gelene kadar intrakardiyak perfüzyon işlemine devam edilmiş olup bu işlem sonunda hayvanların kafatasları nazikçe açılarak beyin dokuları rezeke edilmiştir. Bu şekilde elde edilen, beyin dokuları %4'lük PFA solüsyonuna alınarak 48 saat boyunca post-fiksasyon işlemine tabii tutulmuştur. Post-fiksasyon işlemi sonunda dokular sıçan beyin atlasına göre küçültülerek doku takip kasetlerine konulmuş ve yıkama amacıyla 24 saat boyunca PBS'te bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra dokular sırasıyla %80, %95 ve %100'lük artan alkol serisinde 45'er dakika bekletilmiştir. Sonrasında dokular ksilol ile şeffaflandırılmış ve parafine alınıp burada 45 dakika bekletilmiştir. İlk parafinden çıkartılan dokular yeniden temiz parafine alınmış ve burada 45 dakika bekletilmiştir. Bu aşama tamamlandıktan sonra dokular metal kaplar içerisinde parafin bloklara gömülmüştür.

Dokular bloklama işleminden sonra oda sıcaklığında 1 gün bekletilmiştir. Dokulardan ışık mikroskopik incelemeler için Leica RM 2145 mikrotomda 5 µ'luk kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlanmış ve polilizinli lamalar üzerine doku kesitleri alınmıştır. Kesitler 1 gün kurumaya bırakıldıktan sonra deparafinizasyonun sağlanması amacıyla şale içerisinde 1 gece boyunca ksilolde bekletilmiştir. Böylece dokular histolojik analizler için hazır hale getirilmiştir.

3.4.7.2. Histokimyasal Boyamalar

a) Hematoksilen-Eozin (HE) Boyaması

Orta beyin dokularının genel histolojik parametrelerinin değerlendirilmesi ve dokulardaki hasarın tespiti amacı ile HE boyaması yapılmıştır.

Deparafinizasyon işleminin ardından dokular sırasıyla %100, %95 ve %80 azalan alkol serisinde 2'şer dakika bekletilmiştir. Azalan alkol serisinden geçirilen dokular sonrasında 5 dakika süre ile distile su içerisinde bekletilerek rehidrate edilmiştir. Bu

basamaktan sonra 90 saniye boyunca Mayer's hematoksisleninde bekletilen dokulardan fazla boyanın uzaklaştırılması için preparatlar 5 dk boyunca akar su ile yıkanmıştır.. Bu işlemlerin ardından dokular eozin boyasına alınarak 1 dakika boyunca boyama işlemine tabi tutulmuştur. Preparatlar sonra, sırası ile %80, %95 ve %100 artan alkol serisinden geçirilmiştir. Bu işlemler sonrasında ksilol ile temizlenen preparatlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

b) Toluidine Mavisi (TB) Boyaması

Orta beyin dokusu örneklerinde dejenere nöronların gösterilmesi TB boyaması gerçekleştirilmiştir.

Deparafinizasyon işleminin ardından boyanın dokuya girebilmesi amacı ile dokular sırasıyla %100, %95 ve %80 azalan alkol serisinde 5'şer dakika bekletilmiştir. Sonrasında dokular 5 dakika süre ile distile su içerisinde bekletilmiştir. Distile sudan çıkarılan dokular 15 dk boyunca toluidine blue solüsyonu içerisinde boyanmaya bırakılmıştır. Daha sonrasında boya solüsyonundan çıkarılan dokular sırasıyla %95 ve %100 alkollere daldırılıp çıkarılarak fazla boyanın akıtılması sağlanmıştır. Bu işlemler sonrasında ksilol ile temizlenen preparatlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.4.7.3. İmmünohistokimyasal Boyama

TH, α -syn, Grp78/Bip, PERK-1, ATF6, IRE1, p62, Beclin-1 ve LC3II protein ekspresyonlarının SNpc özelinde gösterilebilmesi ve değerlendirilebilmesi amacı ile immünohistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir.

Deparafinize edilen preparatlar azalan alkol serisinden (%100, %95, %80; her birinde 2 dakika) geçirilmiş ve distile su içerisinde 5 dakika bekletilerek rehidrate edilmiştir. Bu aşamadan sonra antijen retrieval işlemi için 30 dakika sodyum sitrat tamponu içerisinde 90 °C'ye ayarlanmış mikrodalgada kaynatılan preparatlar, mikrodalgadan çıkartılarak oda ısısına gelebilmeleri için 20 dk soğuk su banyosunda bekletilmiştir. Soğuyan preparatlar, önce 5 dakika distile su içerisinde bekletilmiş daha sonra permeabilizasyon işlemi için PBS ile hazırlanmış %0,1 Triton X solüsyonu içerisinde 5 dakika süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Permeabilizasyon aşaması sonrası preparatlar, endojen peroksidazların blokajı metanol ile hazırlanmış %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dakika süre ile bekletilmiş bu sürenin sonunda PBS tamponu

içerisine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. PBS'ten alınan preparatların üzerinde bulunan dokuların etrafı hidrofobik kalem ile çizilmiş ve dokuların üzerine %1'lik BSA damlatılıp 30 dakika inkübe edilmiş böylece spesifik olmayan bağlantıların blokajı gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin sonunda blokaj solüsyonu ortamdan uzaklaştırılmış ve dokulara dilüsyon oranı optimize edilmiş primer antikorlar uygulanmıştır. Bu aşamadan sonra dokular, nemli ve +4 °C dereceye sahip bir ortamda gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün +4 °C dereceden çıkarılan preparatlar PBS solüsyonu içerisine alınarak yıkanmıştır. Daha sonra PBS'ten alınan preparatlar, sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar tekrar PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası Horse Radish Peroxidase (HRP) solüsyonu 30 dakika süreyle dokulara uygulanmış ve bu sürenin sonunda preparatlar PBS ile yıkanmıştır. PBS'ten alınan preparatlara HRP ile etkileşime girerek boyanan bölgelerin görünür hale gelmesini sağlayan 3,3-diaminobenzidine (DAB) solüsyonu damlatılarak ve preparatlar renk değişimi için gözle takip edilmiştir. Renk değişimi gözlemlendiğinde preparatlar distile su içerisine alınmıştır. Hücre nükleuslarını ayırt etmek amacı ile preparatlar 1 dakika süre ile Mayer's hematoksileni ile boyanmıştır. Süre sonunda dokular 5 dk süre ile akar suda, sonrasında ise 5 dk distile suda bekletilmiştir. Bu basamaktan sonra preparatlar artan alkol serisinden (%95, %100 ve %100 alkol) geçirilmiştir. Daha sonrasında ksilol ile temizlenen preparatlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Boyaması gerçekleştirilen belirteçlerin, boyama yoğunluklarının semi-kantitatif olarak belirlenebilmesi amacıyla, ışık mikroskobunda her bir belirteç için 10 farklı alandan 40X büyütmede oluşturulan mikrograflar, Image-J yardımı ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular ile grafikler oluşturularak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir (Grishagin, 2015).

3.4.8. RT-qPCR Analizleri

In vivo PH modelinin ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının, otofaji ve ERS ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin ortaya konulması amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerinin işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Steril deney tüplerine alınan sağ orta beyin doku örnekleri Nucleospin RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel; Almanya) içerisinde çıkan prosedür takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
2. RNA izolasyonundan sonra OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (abm; Almanya) içerisinde çıkan prosedür takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
3. Elde edilen cDNA'lardan ayrı ayrı 2 µl örnekler alınmış ve her bir hedef gen için hazırlanmış ve etiketlenmiş farklı PCR tüpleri içerisine aktarılmıştır.
4. Daha sonra bu tüplerden her birine; 13,8 µl distile su, 2 µl SYBR Green I enzim karışımı, 1,6 µl Mg^{+2} , 0,3 µl Forward Primer (BRCC3, LC3II, p62/SQSTM1, Beclin 1, Grp78/Bip, PERK, IRE1, ATF6 ve CHOP) ve 0,3 µl Revers Primer (BRCC3, LC3II, p62/SQSTM1, Beclin 1, Grp78/Bip, PERK, IRE1, ATF6 ve CHOP) eklenmiştir.
5. Bu şekilde oluşturulan bu karışım 5 saniye boyunca 700g'de sentrifüj edilerek homojen hale getirilmiştir. Daha sonrasında uygun programa ayarlanmış olan LightCycler içerisine konulan tüplerde RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Gurel ve diğerleri, 2019).

Analizler sonunda elde edilen veriler $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ metodu ile değerlendirilecek ve 2'den büyük, -2'den küçük değerler anlamlı kabul edilecektir (Kuşçu ve diğerleri, 2022).

Hedef genlere ait primer sekansları Tablo 4'te verilmiştir.

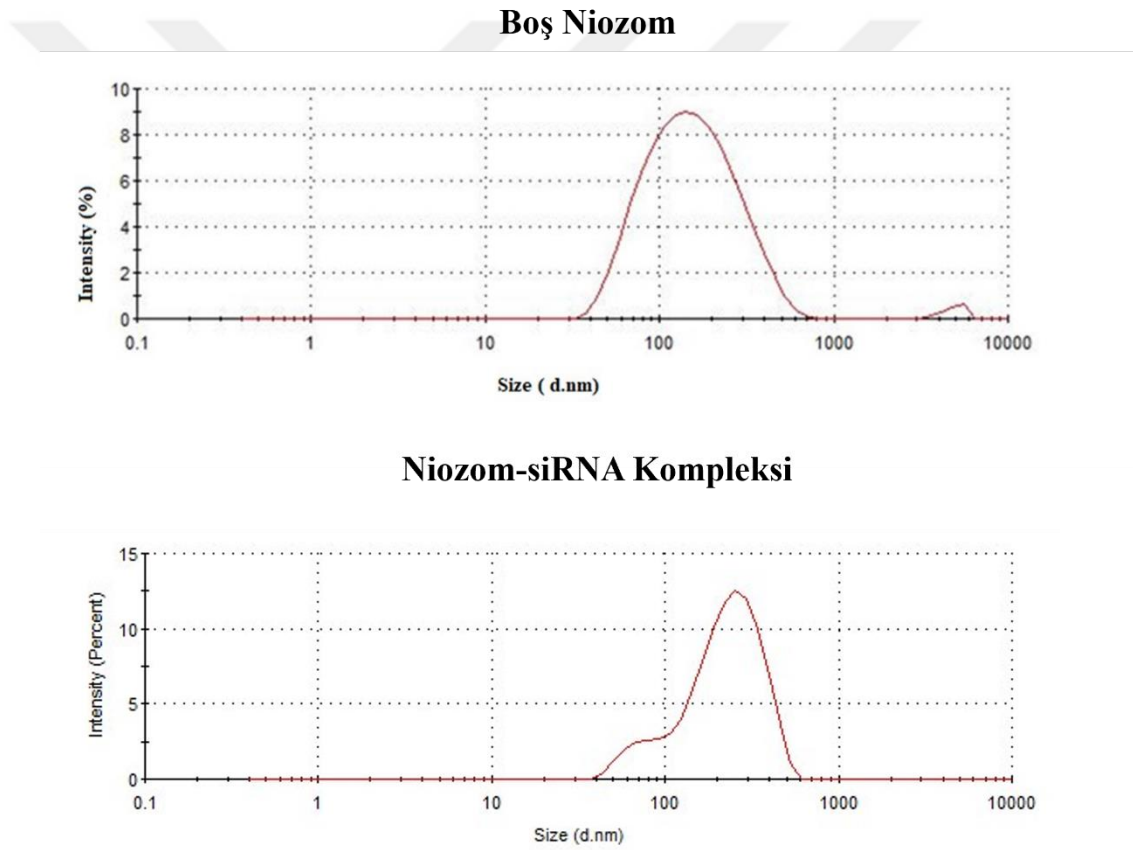
3.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiki analizleri Statistical Package for Social Sciences software, version 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) programı ile yapılmıştır. Ayrıca, tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılarak kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılmış ve değerler ortalamanın standart hatası ile sunularak, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

4.1. Niozomların Sentezi ve Niozom-siRNA Komplekslerinin Karkterizasyonlarına Ait Bulgular

İnce film hidrasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen niozomlar ve oluşturulan niozom-siRNA komplekslerinin zeta potansiyelleri, ortalama boyutları ve niozomların boyut dağılımlarının homojenliğini gösteren PDI değerleri DLS cihazı ile analiz edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: DLS cihazı ile gerçekleştirilen ortalama boyut analizlerine ait grafikler

Bu analizlere ait sonuçlar (Tablo 5), sentezlenen niozomların zeta potansiyellerinin -23,5 mV, ortalama boyutlarının 285,3 nm ve PDI değerlerinin ise 0,320 olduğunu ortaya koymuştur. Aynı analizlerde, oluşturulan niozom-siRNA komplekslerinin zeta

potansiyelleri -23,7 mV, ortalama boyutlarının 336,7 nm ve PDI değerlerinin 0,356 olduğu görülmüştür.

Tablo 5: Sentezlenen niozomlar ve oluşturulan niozom-siRNA komplekslerine ait zeta potansiyeli, ortalama boyut ve PDI değerleri

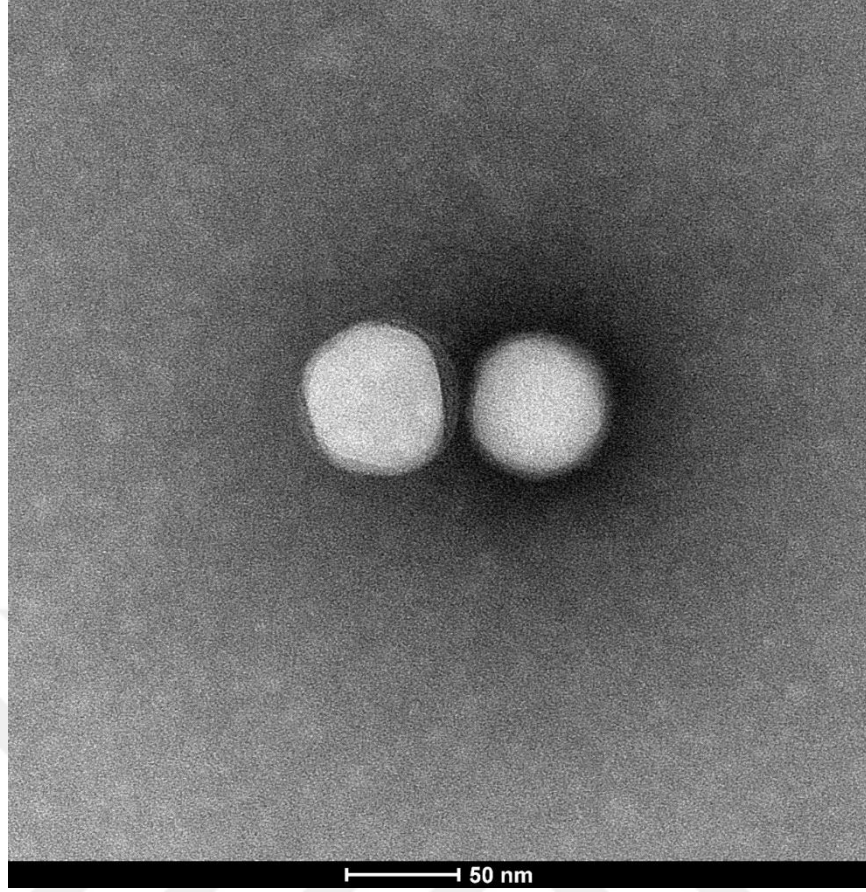
Materyal	Zeta Potansiyeli (mV)	Ortalama Boyut (nm)	PDI Değeri
Boş Niozom	-23,5	285,3	0,320
Niozom-siRNA	-23,7	336,7	0,356

Niozom-siRNA komplekslerinin oluşturulması amacıyla kullanılan siRNA'ların enkapsülasyon (kapsülleme) verimliliğinin anlaşılabilmesi için ise HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen değerler aşağıda verilen denklemde yerine konularak kapsülleme verimliliği hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (\%EE)} = \frac{\text{Nanopartiküllere enkapsüle edilen siRNA miktarı}}{\text{Başlangıçta eklenen siRNA miktarı}} \times 100$$

Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra niozomlar ile reaksiyona giren siRNA miktarının tayini gerçekleştirilmiş ve siRNA enkapsilasyon verimliliğinin %46,5 olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak sentez ortamına eklenen her 10 nmol siRNA'nın 4,65 nmolünün niozomlara enkapsüle edildiği saptanmıştır.

Sentezlenen boş niozomların ve oluşturulan niozom-siRNA komplekslerinin morfolojik analizleri ise TEM görüntülemesi ile ortaya konulmuştur. Bu analizlere göre hem boş niozomların hem de niozom-siRNA komplekslerinin küresel morfolojide oldukları görülmüştür. Aynı analizlerde niozom-siRNA komplekslerinin boyutunun boş niozomlara oranla daha büyük olduğu saptanmıştır (Şekil 9)



Şekil 9: TEM görüntülemesine ait mikrograf.

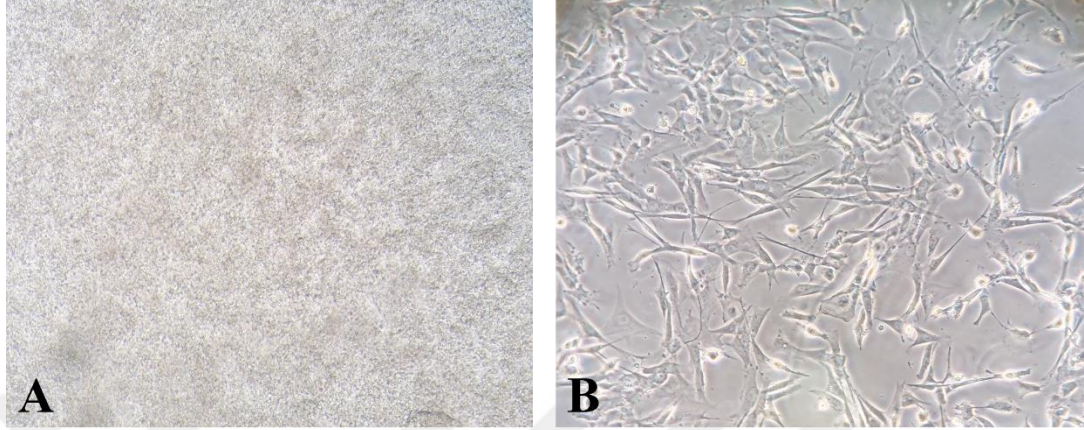
4.2. *In Vitro* Deneylere Ait Bulgular

4.2.1. Primer Orta Beyin Dopaminerjik Nöron Hattının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Gebeliğinin E.14.5 gününde olan 2 dişi sıçandan toplanan 17 adet embriyodan izole edilen primer orta beyin dopaminerjik nöron hattında gerçekleştirilen Tripan Mavisi (hücre sayımı) analizlerinde toplamda $21,9 \times 10^6$ hücrenin elde edildiği, bu hücrelerden yaklaşık %92,12'sinin canlı olduğu tespit edilmiştir.

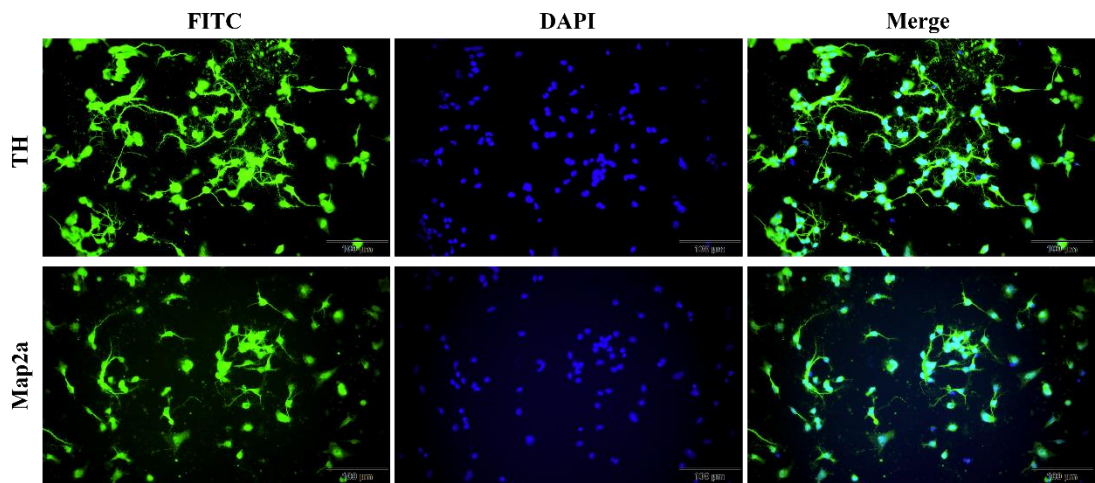
3×10^5 hücre içerecek şekilde, 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş Poly-L-Ornitine kaplı 14 mm'lik lamellere ekimi yapılan ve 7 gün süre ile kültürü gerçekleştirilen primer orta beyin dopaminerjik nöron hattına ait hücrelerin, ilk ekildiği günde daha

çok küresel morfolojiye sahip oldukları, kültürün 7. gününde ise hücre şekillerinin nöronal morfolojiye diferansiye olduğu saptanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Kültüre edilen primer orta beyin dopaminerjik nöron hattındaki hücrelerin deneyin ilk günü (A) ve 7. gününe (B) ait stereomikroskop görüntüleri

Kültürü yapılan primer orta beyin dopaminerjik nöron hattındaki dopaminerjik hücre yüzdesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen TH ve Map2 IF boyaması analizlerinde (Şekil 11) ise, bu hattın literatürle uyumlu olacak şekilde %10 ila %11 arasında dopaminerjik nöron içerdiği görülmüştür (Q. Zhang ve diğerleri, 2016).



Şekil 11: İzolasyonu ve kültürü gerçekleştirilen primer dopaminerjik nöron hücre hattında gerçekleştirilen TH ve Map2a IF boyamasına ait mikrograflar.

4.2.2. siRNA Seçimine Ait Bulgular

In vitro ve *in vivo* deneylerde BRCC3 geni susturumunda kullanılacak siRNA'nın seçimi amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerinin sonucunda siRNA 3 (RSS359677) ile 48 saat boyunca inkübe edilen hücrelerdeki BRCC3 mRNA ekspresyon seviyesinin Kontrol grubuna oranla yaklaşık 104 kat daha az olduğu görülmüştür. Diğer siRNA uygulaması yapılan gruplar ile yapılan kıyaslamada ise siRNA 3 grubundaki ekspresyon seviyesinin siRNA 1 (RSS337449) grubuna oranla 5, 31 kat, siRNA 2 (RSS359676) grubuna oranla ise 2,01 kat daha az olduğu görülmüştür (Tablo 6).

Tablo 6: siRNA seçimi amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerine ait bulgular

Gen	Değer	Deney Grupları			
		Kontrol	siRNA 1 (RSS337449)	siRNA 2 (RSS359676)	siRNA 3 (RSS359677)
BRCC3	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	19,56 (D) [#]	51,62 (D) [#]	103,96 (D) ^{#,a,b}

D: mRNA ekspresyon seviyesinde azalma

#: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış

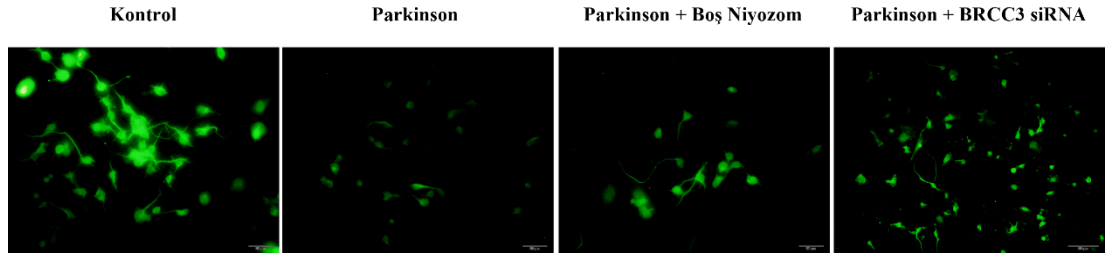
a: siRNA3 grubunda siRNA 1 grubuna oranla anlamlı değişim b: siRNA3 grubunda siRNA 2 grubuna oranla anlamlı değişim

Bu analizlerden elde edilen sonuçlara göre BRCC3 genine ait mRNA ekspresyon seviyesini en güçlü şekilde inhibe ettiği görülen siRNA 3 (RSS359677)'ün *in vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.3. *In Vitro* PH Modeline ve BRCC3 Gen Nakavtına Ait Bulgular

siRNA seçiminden sonra, karakterizasyonu gerçekleştirilen primer dopaminerjik nöron hatlarında Kontrol, Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA grupları oluşturulmuştur. Oluşturulan PH modelinin ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının dopaminerjik nöronlardaki etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla gruplarda gerçekleştirilen TH IF boyaması, rotenon

uygulaması yapılan gruptaki TH pozitif hücre sayısının ve TH protein ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 12: *In vitro* deney gruplarında gerçekleştirilen TH IF boyamasına ait mikrograflar

Oluşturulan PH modelinin ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının otofaji ve ERS ile ilişkili moleküllerin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerin anlaşılabilmesi amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizleri, rotenon uygulamasının hücrelerde ERS ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlara neden olduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 7). Öyle ki, yapılan analizlerde ERS ile ilişkili genler olan Grp78, CHOP, PERK-1, IRE-1 ve ATF6'nın mRNA ekspresyon seviyelerinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, niozom-siRNA kompleksi ile gen nakavtı gerçekleştirilen grupta ise ERS ile ilişkili genlerde hem diğer rotenon uygulanan diğer gruplara hem de Kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Otofaji ile ilişkili genlere ait bulgulara ise rotenon uygulamasının Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına p62 mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı bir şekilde arttırdığı buna karşın gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının ise yükselen mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı saptanmıştır. Buna ek olarak, uygulamasının Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına LC3II mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı bir şekilde arttırdığı BRCC3 gen nakavtının ise yükselen mRNA ekspresyon seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığı not edilmiştir.

Tablo 7: *In vitro* deney gruplarında otofaji ve ERS ile ilişkili genlere ait mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Değer	Deney Grupları			
		Kontrol	Parkinson	Parkinson+Boş Niozom	Parkinson+Niozom-siRNA
BRCC3	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	16,11 (U)*	14,12 (U)*	4,25 (D) ^{#,a,b}
ATF6	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	13,45 (U)*	2,82 (U)*	4,56 (D) ^{#,c,d}
Beclin-1	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	1,41 (D)	1,52 (D)	9,18 (U)*
CHOP	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	16,56 (U)*	6,77 (U)*	5,73 (D) ^{#,e,f}
Grp78	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	5,16 (U)*	4,00 (U)*	1,01 (U)
PERK-1	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	7,51 (U)*	2,02 (D) ^{#,g}	1,84 (U)
p62	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	5,09 (U)*	4,78 (U)*	1,86 (U)
IRE-1	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	6,06 (U)*	3,16 (U)*	10,92 (D) ^{#,h,i}
LC3II	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	63,11 (D) [#]	25,99 (D) [#]	32,44 (U) ^{*,j,k}

D: mRNA ekspresyon seviyesinde azalma

U: mRNA ekspresyon seviyesinde artış

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış

#: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış

a: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, Parkinson grubuna oranla 68,46 kat daha fazla eksprese ediliyor.

b: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 60,01 kat daha fazla eksprese ediliyor.

c: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, Parkinson grubuna oranla 61,33 kat daha fazla eksprese ediliyor.

d: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 12,85 kat daha fazla eksprese ediliyor.

e: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, Parkinson grubuna oranla 94,88 kat daha fazla eksprese ediliyor.

f: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 38,79 kat daha fazla eksprese ediliyor.

g: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, Parkinson grubuna oranla 15,17 kat daha fazla eksprese ediliyor.

h: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 66,17 kat daha fazla eksprese ediliyor.

i: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, Parkinson grubuna oranla 15,17 kat daha fazla eksprese ediliyor.

j: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson grubuna oranla 2047,28 kat daha az eksprese ediliyor.

k: Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 843,11 kat daha fazla eksprese ediliyor.

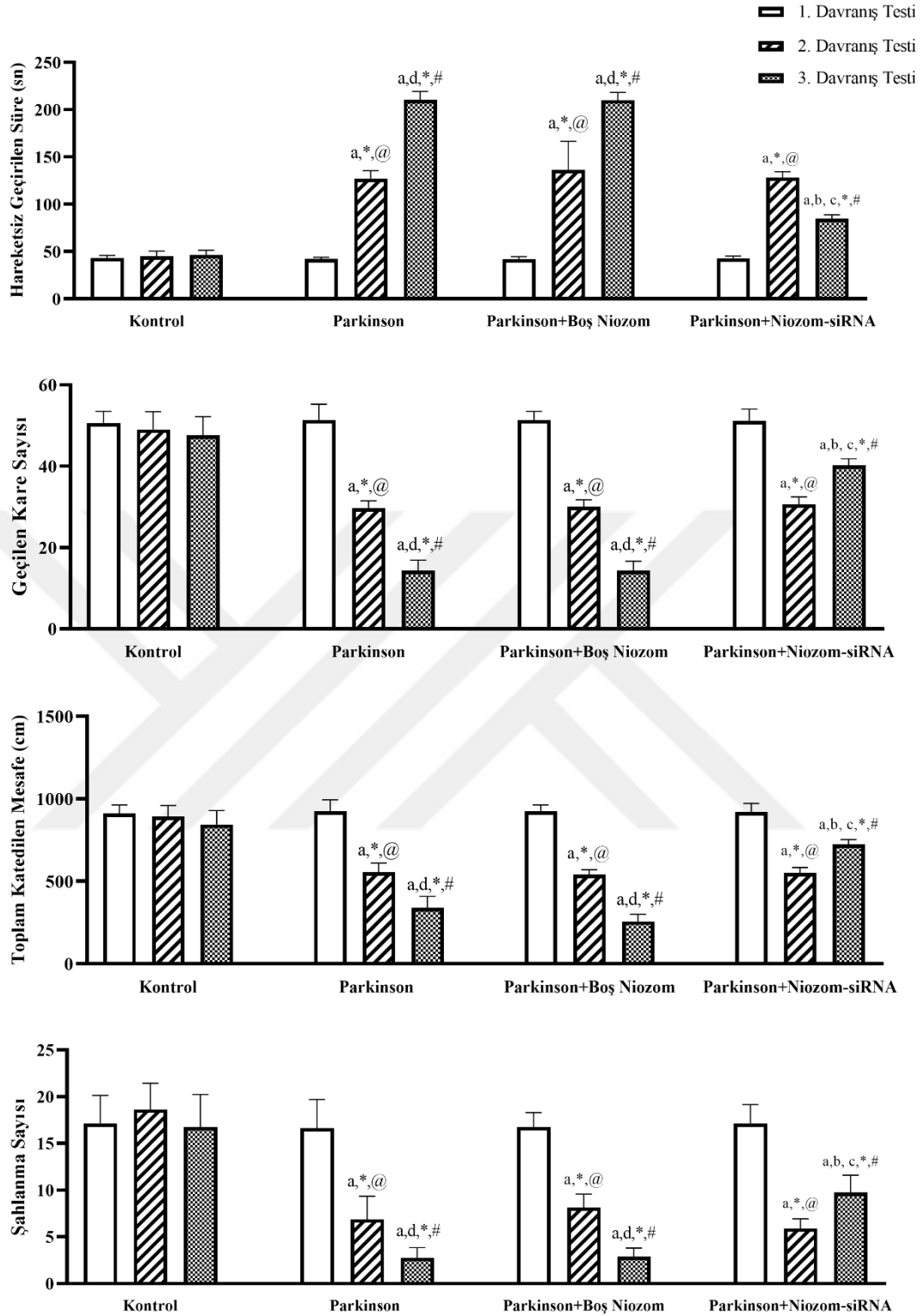
4.3. In Vivo Deneylere Ait Bulgular

4.3.1. Davranış Testlerine Ait Bulgular

4.3.1.1. Açık Alan Testine Ait Bulgular

Çalışmamızda her gruptan rastgele seçilen 8 hayvan üzerinde deney prosedürünün 0. 21. ve 42. günlerinde gerçekleştirilen açık alan testinde hareketsiz geçirilen süre, geçilen kare sayısı, toplam katedilen mesafe ve şahlanma parametreleri değerlendirilerek, gruplar kendi içerisinde kıyaslanmıştır.

0. günde gerçekleştirilen davranış testine (1. Davranış Testi) ait sonuçlar kıyaslandığında hareketsiz geçirilen süre, geçilen kare sayısı, toplam katedilen mesafe ve şahlanma parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. 21. günde gerçekleştirilen davranış testine (2. Davranış Testi) ait istatistiksel veriler değerlendirildiğinde ise Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında, Kontrol grubuna kıyasla hareketsiz geçirilen sürede anlamlı bir artış diğer parametrelerde ise anlamlı bir azalışın yaşandığı tespit edilmiştir. 42. günde gerçekleştirilen davranış testinde (3. Davranış Testi) ise Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında Kontrol grubuna göre hareketsiz geçirilen sürede anlamlı bir artış olurken geçilen kare sayısı, toplam katedilen mesafe ve şahlanma sayısında ise anlamlı bir azalış olduğu saptanmıştır. Parkinson+Niozom-siRNA grubu Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom grupları ile kıyaslandığında, hareketsiz geçirilen sürede anlamlı bir azalış; geçilen kare sayısında, toplam katedilen mesafede ve şahlanma sayısında ise anlamlı bir artış olduğu anlaşılmıştır (Şekil 13).



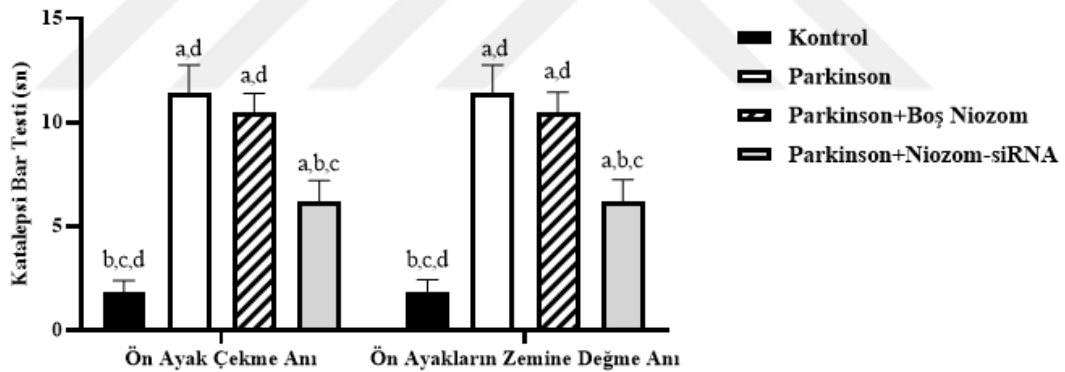
Şekil 13: Açık alan testine ait grafikler. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). *: 1. Davranış deneyine göre anlamlı

değişim ($p<0.0001$). #: 2. Davranış deneyine göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). @: 3. Davranış deneyine göre anlamlı değişim ($p<0.0001$).

4.3.1.2. Çubuk Katalepsi Testine Ait Bulgular

Çalışmamızda her gruptan rastgele seçilen 8 hayvan üzerinde deney prosedürünün son günü yani 42. günde 3 tekrar olacak şekilde yapılan çubuk katalepsi testinde hayvanların ön ayaklarını çubuktan çektikleri zaman ile ön ayakların zemine indirildiği zaman kriterleri değerlendirmeye alınmış ve bu süreler kaydedilmiştir.

Deney gruplarına ait veriler incelendiğinde Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+niozom-siRNA gruplarında Kontrol grubuna göre katalepsi skorlarında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 14). Öte yandan, Parkinson+Niozom-siRNA grubunda Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom grubuna göre katalepsi skorunda anlamlı bir azalış olduğu saptanmıştır.

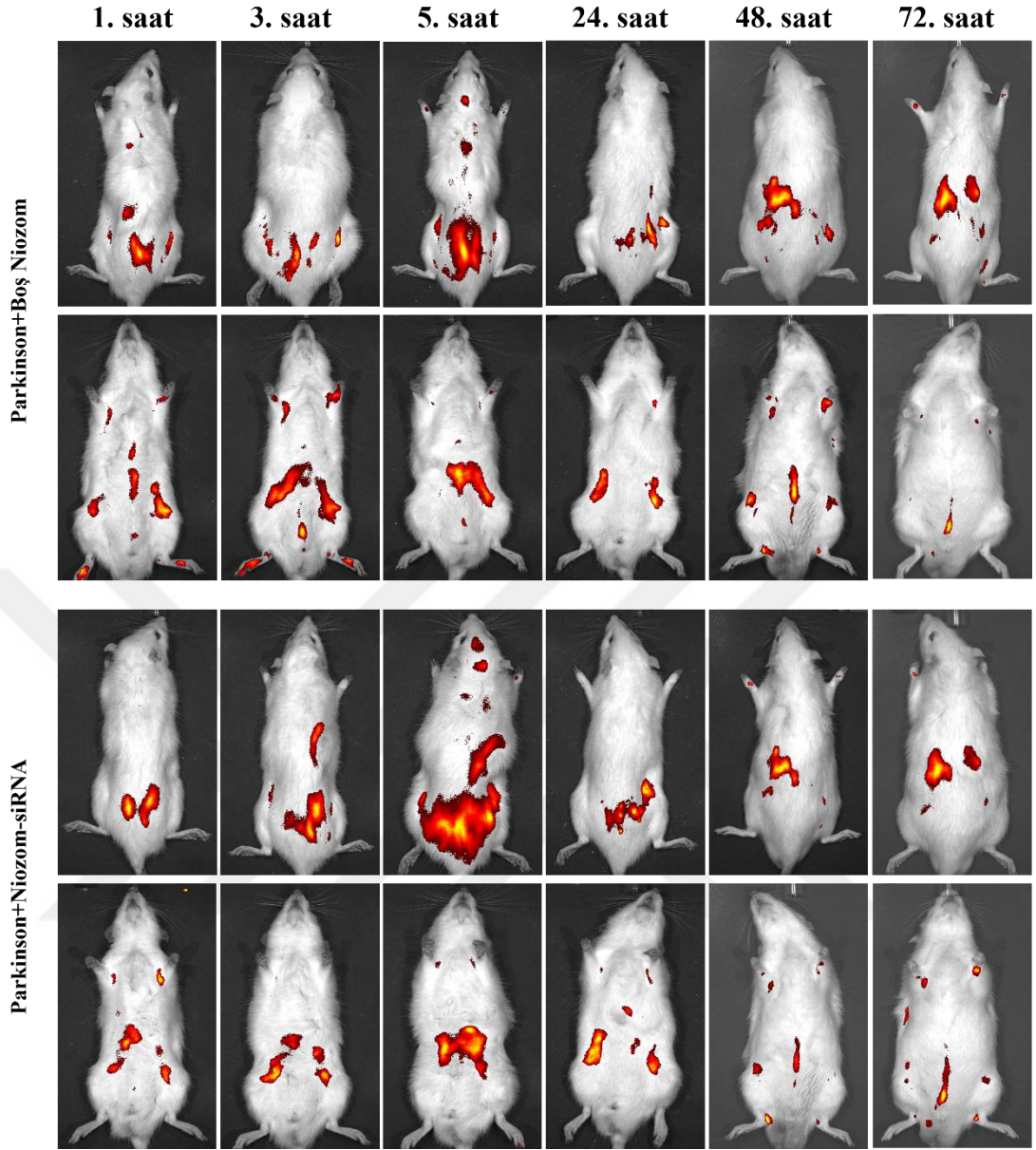


Şekil 14: Deney gruplarına uygulanan çubuk katalepsi testine ait grafikler, Açık alan testine ait grafikler. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$). d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$).

4.3.2. IVIS Analizlerine Ait Bulgular

Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında davranış deneyleri için seçilen 8'er hayvan üzerinde gerçekleştirilen bu analizlerde, bu gruplardaki hayvanlara kuyruk veninden enjekte edilen boş niozom ve niozom-siRNA komplekslerinin beyine ulaşp ulaşmadığı enjeksiyondan sonraki 1., 3., 5., 24., 48. ve 72. Saatlerde görüntüler alınarak takip edilmiş ve görüntüler değerlendirilmiştir (Şekil 15).

Bu analizlere ait değerlendirmede, hem boş niozomların hem de niozom-siRNA kompleksinin enjeksiyondan sonraki 3 ila 5. saatleri arasında beyine ulaştığı ve bu moleküllerin enjeksiyondan sonraki ilk 24 saat içerisinde beyinden detoksifiye oldukları görülmüştür. Ayrıca, bu moleküllerin 48. ve 72. saatlerde ise daha yoğunlukla böbrekler ve mesanede görüldüğü anlaşılmış olup vücuttan atılım sürelerinin 72 saatten fazla olduğu ve atılım şekillerinin idrar ile olabileceği sonucuna varılmıştır.



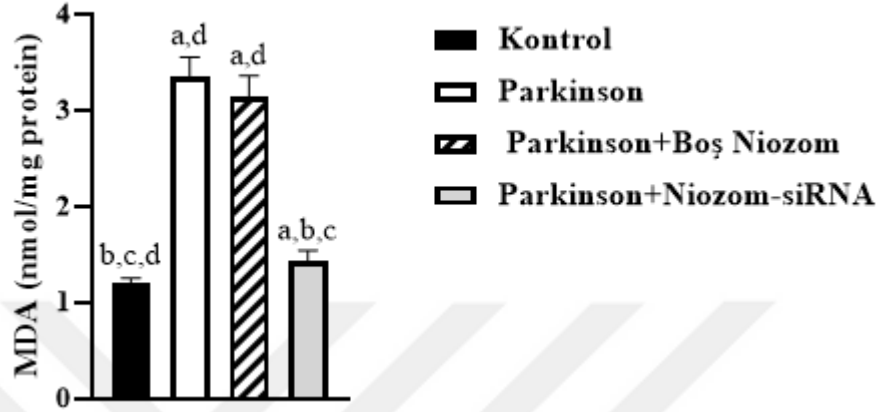
Şekil 15: Farklı zaman aralıklarında deney gruplarına uygulanan IVIS analizlerine ait görüntüler

4.3.3. Biyokimyasal Analizlere Ait Bulgular

4.3.3.1. Lipit Peroksidasyon Analizlerine Ait Bulgular

Gruplardaki lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen MDA ELISA'sına ait bulgular rotenon uygulanan gruplarda MDA seviyesinin Kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde yükseldiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte,

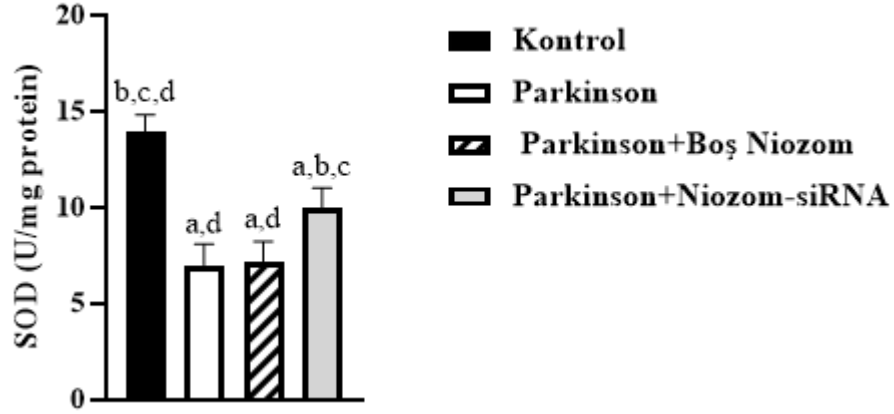
rotenon uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde Parkinson+Niozom-siRNA grubunda MDA seviyesinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla anlamlı derecede düşüş gösterdiğine işaret etmektedir (Şekil 16).



Şekil 16: Gruplarda ait MDA grafiği. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$), d: Parkinson+ Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$).

4.3.3.2. Antioksidan Enzim Aktivitesi Analizlerine Ait Bulgular

Gruplardaki antioksidan enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen SOD ELISA'sına ait bulgular rotenon uygulanan gruplarda SOD seviyesinin Kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, rotenon uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde Parkinson+Niozom-siRNA grubunda SOD seviyesinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla anlamlı derecede yükseliş gösterdiğine işaret etmektedir (Şekil 17).

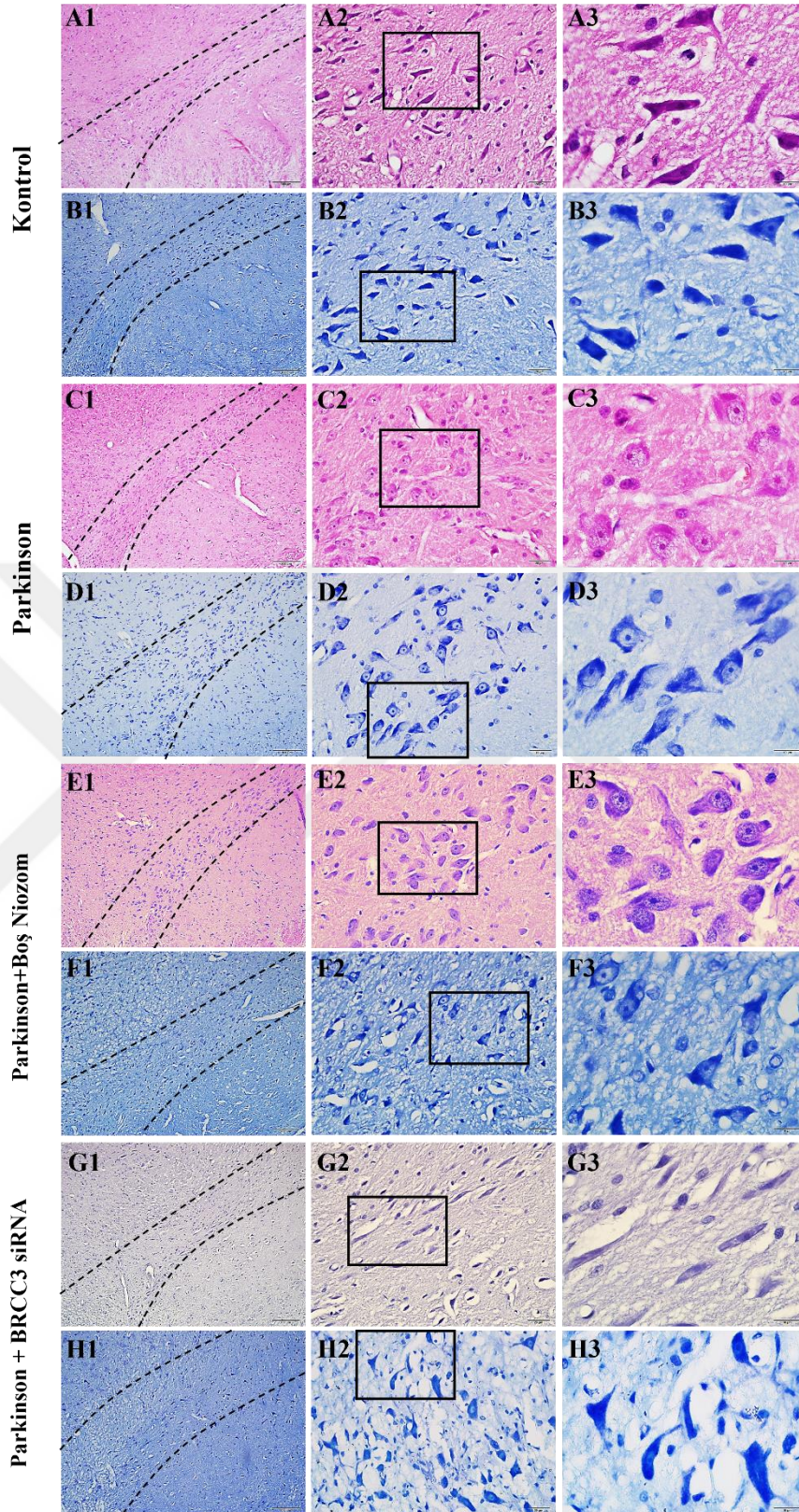


Şekil 17: Gruplara ait SOD grafiği. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.0001$).

4.3.4. Histolojik Analizlere Ait Bulgular

4.3.4.1. Histokimyasal Analizlere Ait Bulgular

Gruplara ait orta beyin dokuları dokularının genel histolojik parametrelerinin değerlendirilmesi ve dokulardaki hasarın tespiti amacıyla gerçekleştirilen HE ve TB boyamalarına ait bulgular rotenon enjeksiyonu yapılan grupların SNpc bölgesindeki dopaminerjik nöronlarda yoğun kayıpların yanı sıra, gliosis, Lewy cisimciği benzeri inklüzyonlar ve nöron perikaryonlarında şişme gibi histopatolojik değişimlerin ortaya çıktığı göstermektedir. Bununla birlikte, BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, yukarıda sayılan histopatolojik değişimlerin diğer rotenon enjeksiyonu yapılan gruplara oranla daha az olduğu ve bu gruplar içerisinde histomimarisi Kontrol grubuna en yakın grup olduğu görülmüştür (Şekil 18).

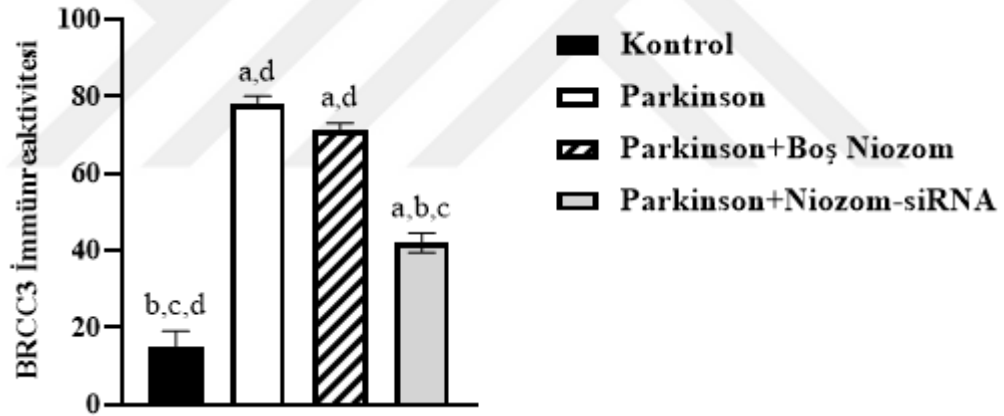


Şekil 18: Deney gruplarında gerçekleştirilen HE (A, C, E ve G sırası) ve TB (B, D, F ve H sırası) boyamalarına ait görüntüler. A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1 ve H1 (10X Büyütme). A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2 ve H2 (40X Büyütme). A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3 ve H3 (100X Büyütme).

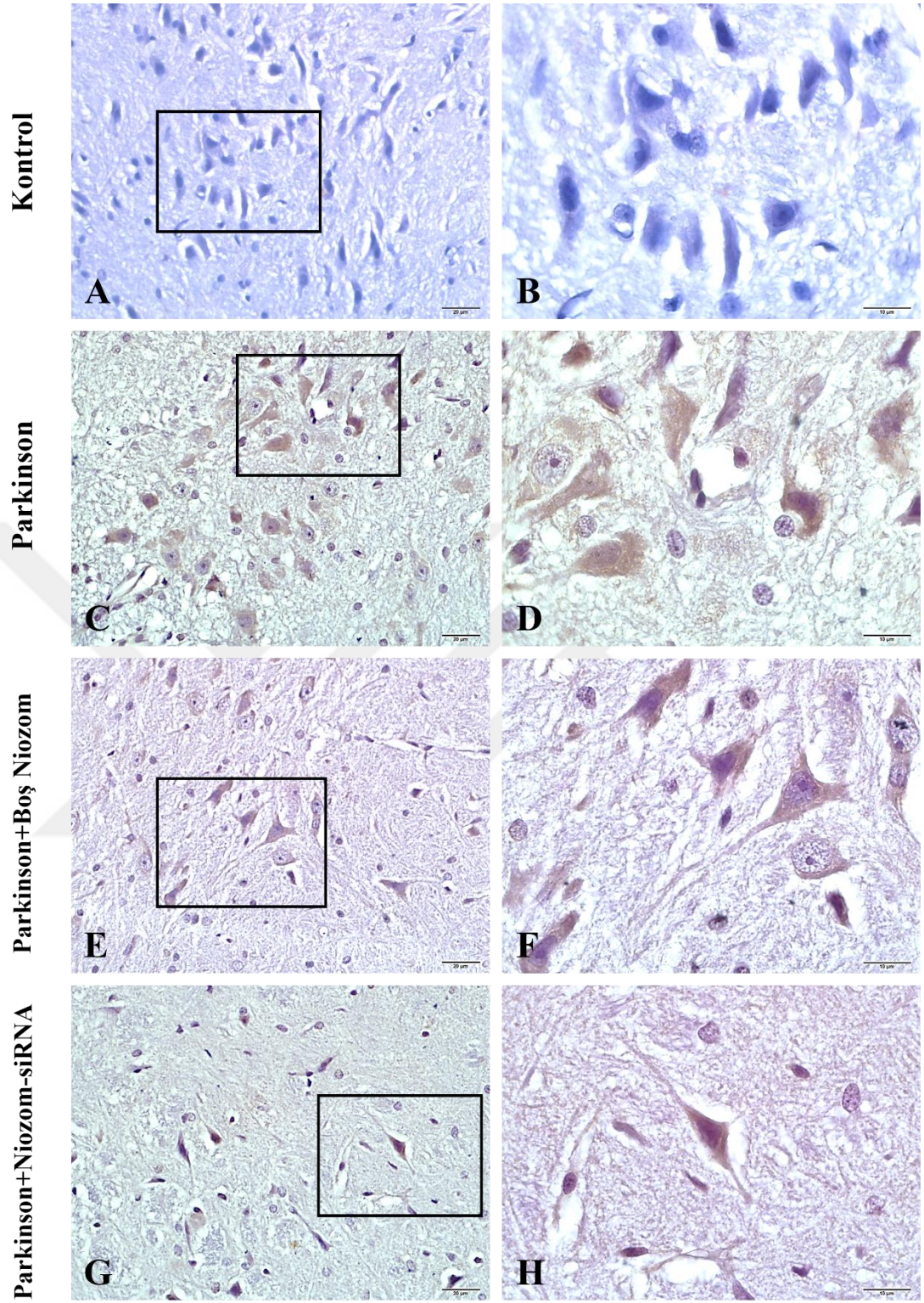
4.3.4.2. İmmünohistokimyasal Analizlere Ait Bulgular

4.3.4.2.1. BRCC3 İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular

Oluşturulan *in vivo* PH modelinde BRCC3 protein ekspresyonunun ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının, BRCC3 protein ekspresyonu üzerindeki etkilerini gözlemek için gerçekleştirilen immünohistokimya analizlerine ait bulgular PH modeli indüksiyonu yapılan gruplarda BRCC3 mRNA ekspresyon seviyelerinin Kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda BRCC3 eksprese eden hücre sayısı ve protein ekspresyon şiddetinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 19 ve Şekil 20)



Şekil 19: Deney gruplarında BRCC3 immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$).

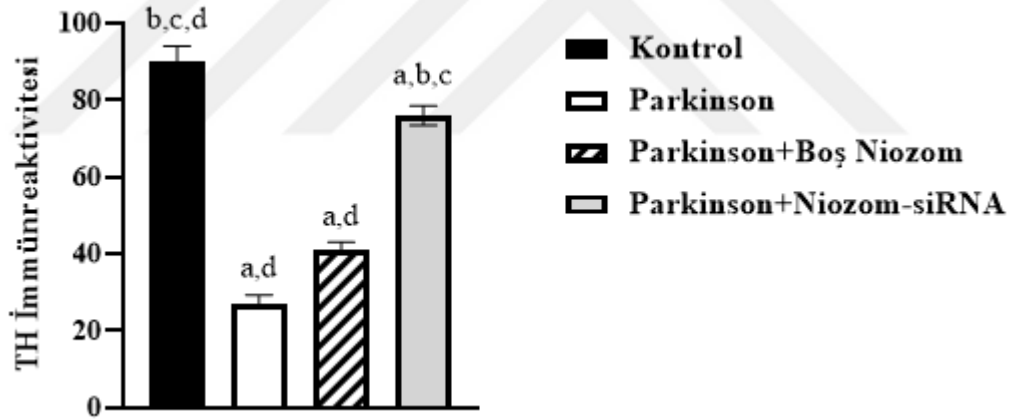


Şekil 20: Deney gruplarında gerçekleştirilen BRCC3 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrogram. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

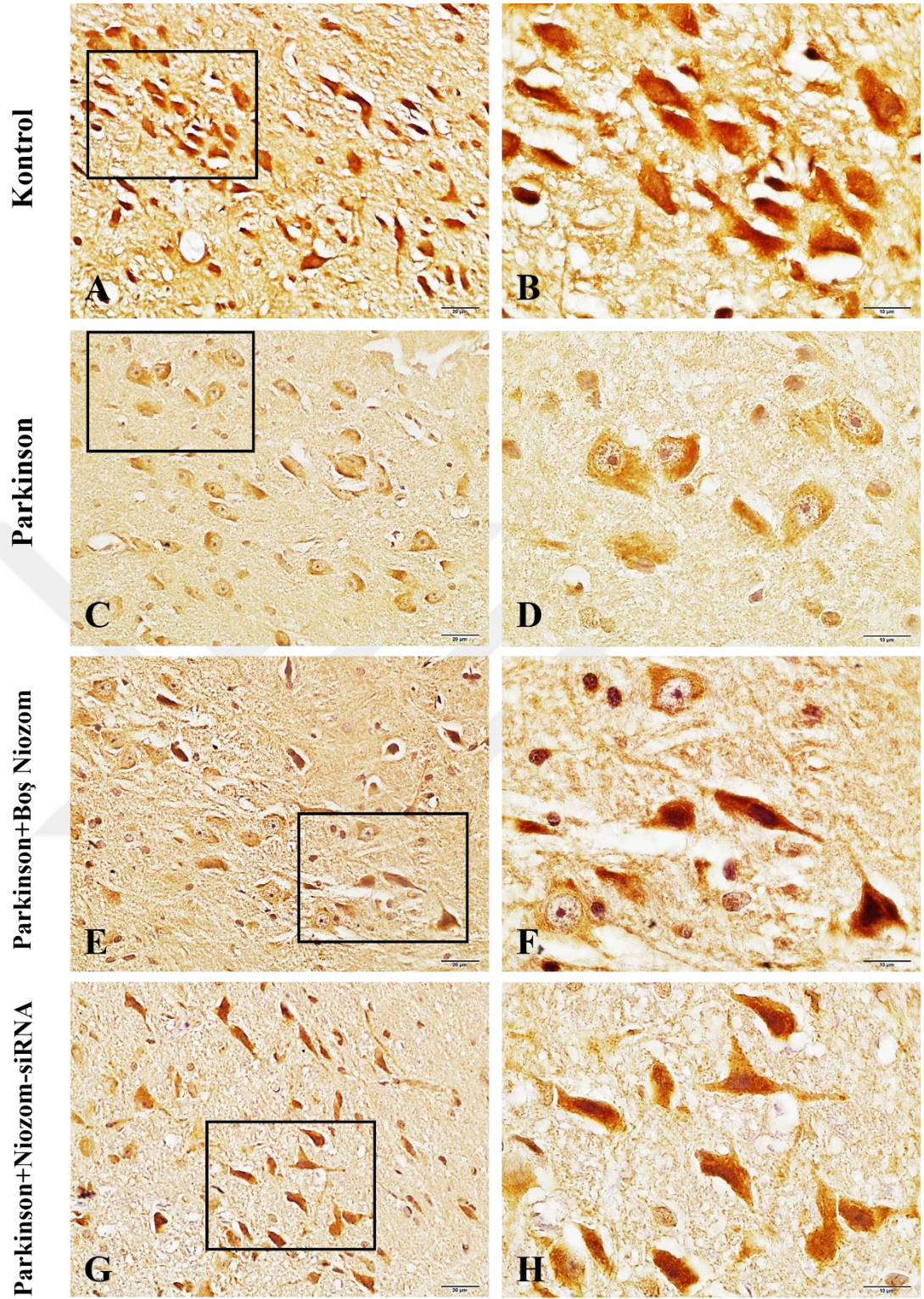
4.3.4.2.2. TH ve α -syn İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular

BRCC3 gen nakavtının *in vivo* PH modelindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için gerçekleştirilen TH immünohistokimyasından elde edilen bulgular, rotenon enjeksiyonu yapılarak PH modeli indüklenen Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında TH pozitif hücre sayısının ve TH protein ekspresyonu şiddetinin Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüş gösterdiğinin ortaya koymaktadır.

Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise BRCC3 gen nakavtının gerçekleştirildiği Parkinson+Niozom-siRNA grubunda TH pozitif hücre sayısının ve TH protein ekspresyonu şiddetinin diğer gruplara oranla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 21 ve Şekil 22).

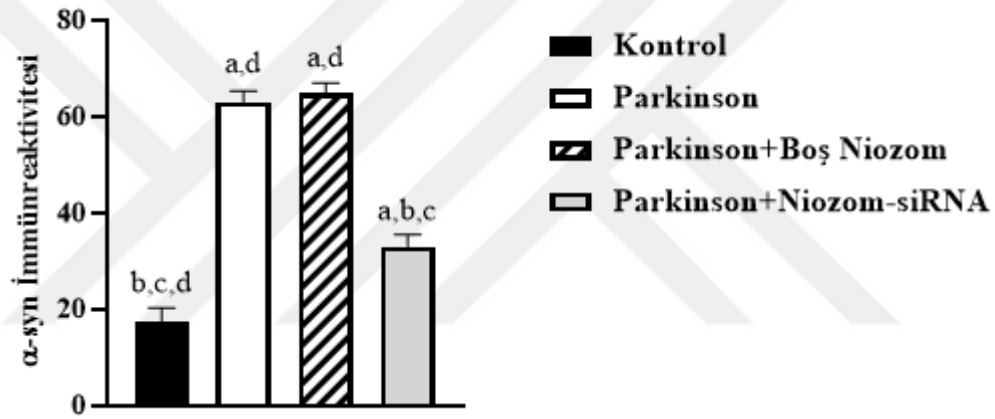


Şekil 21: Deney gruplarında TH immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$).

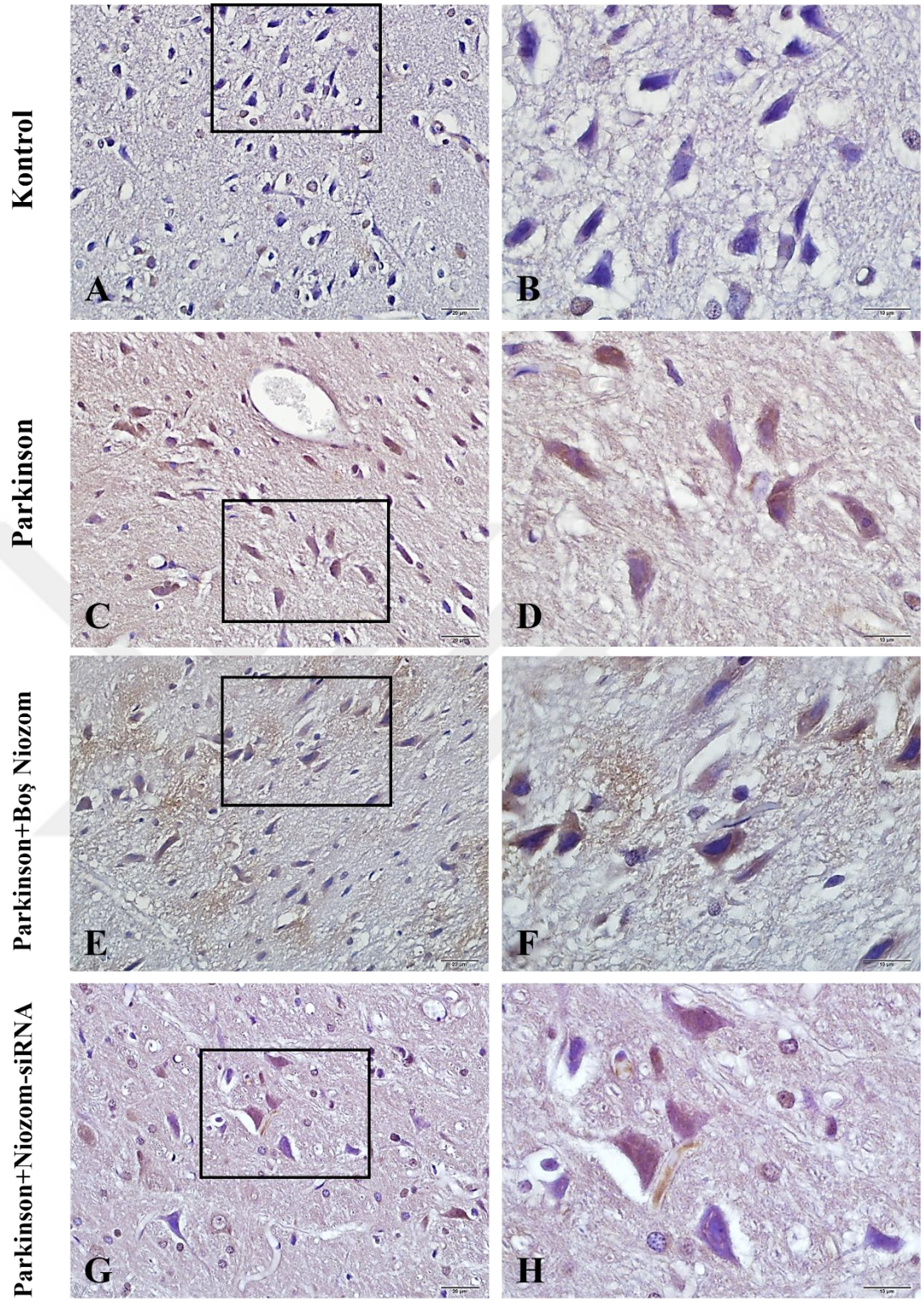


Şekil 22: Deney gruplarında gerçekleştirilen TH immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Deney gruplarında gerçekleştirilen α -syn immünohistokimyasına ait bulgular ise, *in vivo* PH modeli indüksiyonu için rotenon uygulaması yapılan Parkinson, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında α -syn ekspresyon şiddetinin Kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir. Bununla birlikte, rotenon uygulaması yapılan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom grupları arasında α -syn pozitif hücre sayısı ve α -syn protein ekspresyon şiddetleri açısından herhangi bir fark olmadığı, Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise α -syn pozitif hücre sayısı ve α -syn protein ekspresyon şiddetinin bu gruplara oranla daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 23 ve Şekil 24).



Şekil 23: Deney gruplarında α -syn immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p < 0.001$).

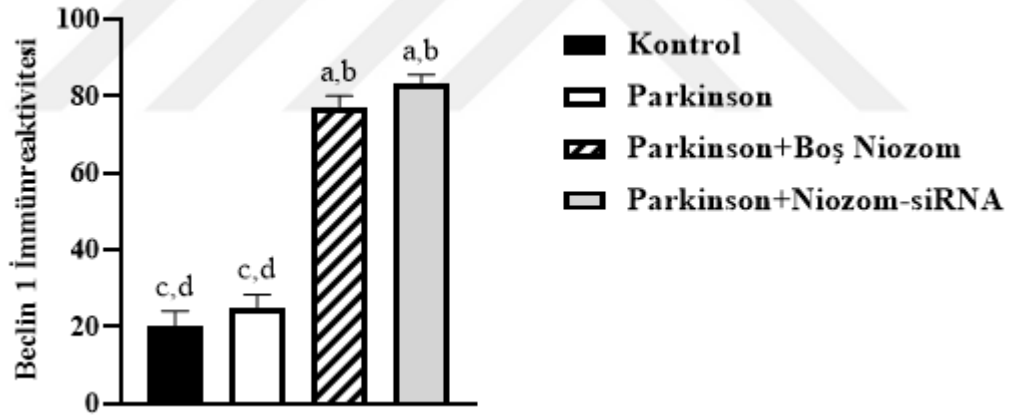


Şekil 24: Deney gruplarında gerçekleştirilen α -syn immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

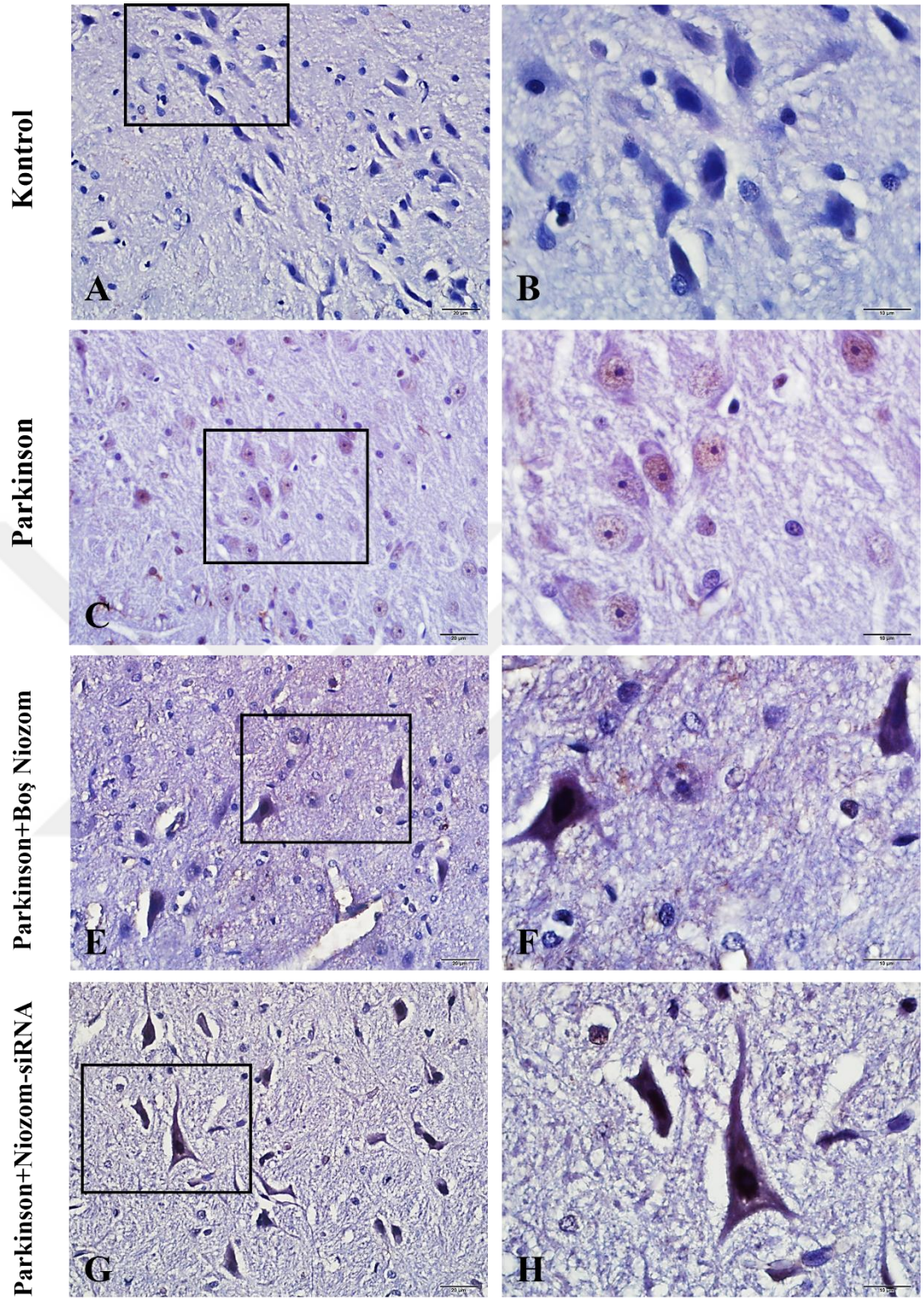
4.3.4.2.3. Beclin-1, p62 ve LC3II İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular

Rotenon ile oluşturulan *in vivo* PH modelinde BRCC3 gen nakavtının otofaji süreci üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi için Beclin-1, p62 ve LC3II proteinlerine yönelik immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen Beclin-1 immünohistokimyasına ait bulgular (Kontrol grubundaki Beclin-1 protein ekspresyonunun bazal seviyede olduğunu göstermektedir. Parkinson grubunda ise Beclin-1 seviyesinin Kontrol grubuna oranla yüksek Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarına oranla anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında yapılan değerlendirmede ise iki gruptaki Beclin 1 pozitif hücre sayısının ve ekspresyon şiddetlerinin benzer olduğu görülmüştür (Şekil 25 ve Şekil 26).

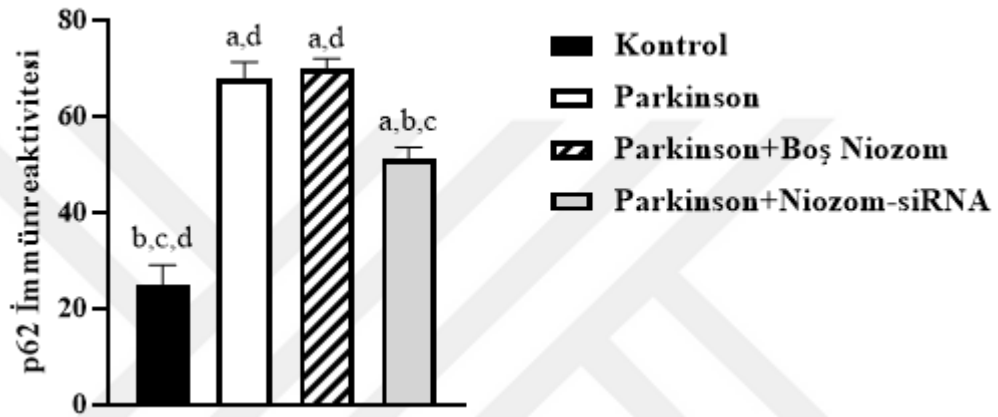


Şekil 25: Deney gruplarında Beclin 1 immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

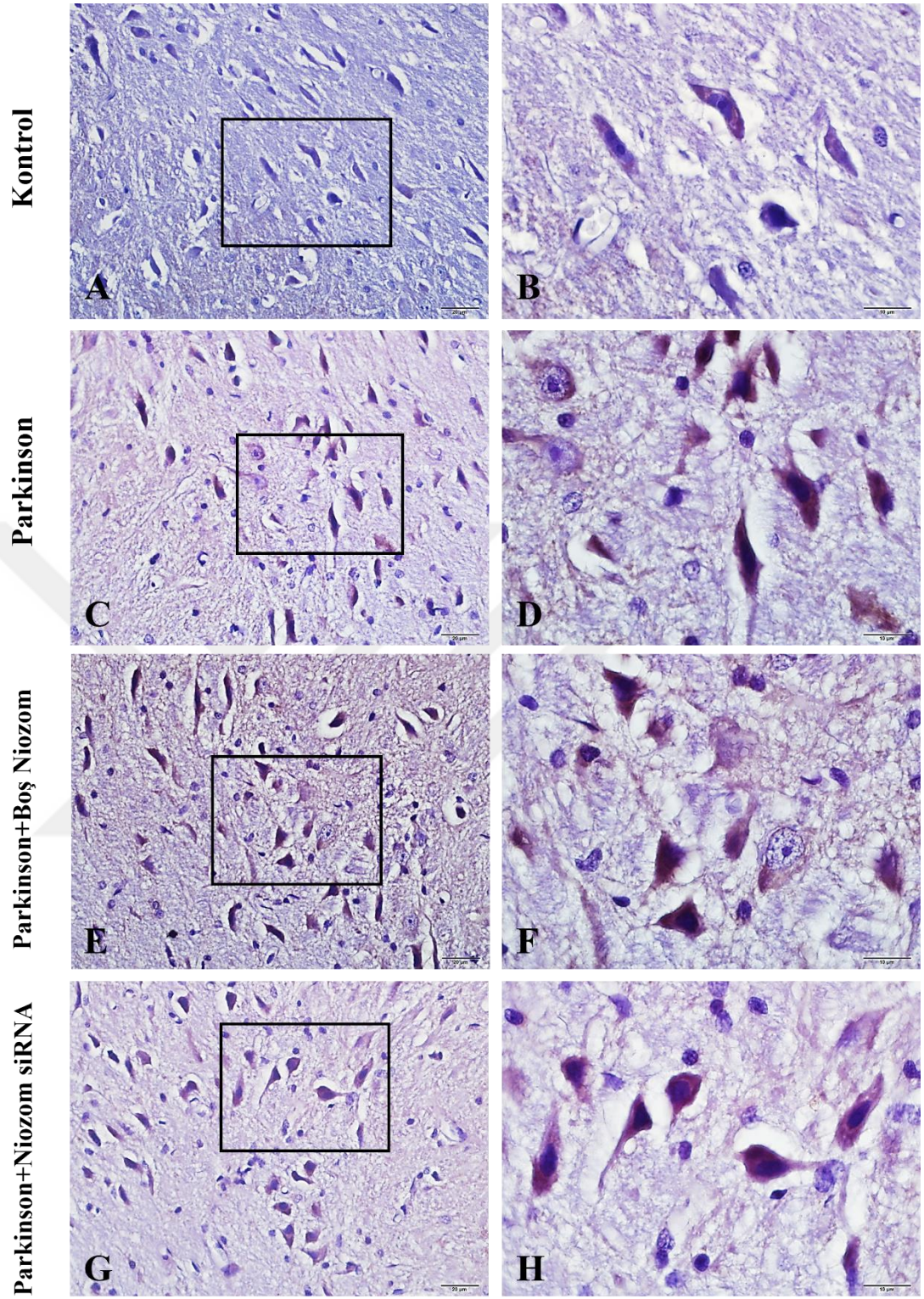


Şekil 26: Deney gruplarında gerçekleştirilen Beclin 1 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Gerçekleştirilen p62 immünohistokimyasına ait bulgular Kontrol grubundaki p62 protein ekspresyonunun tıpkı Beclin-1 gibi bazal seviyede olduğunu göstermektedir. Öte yandan, rotenon enjeksiyonu yapılan gruplarda p62 protein ekspresyonunun Kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubundaki p62 protein ekspresyon seviyesinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 27 ve Şekil 28).

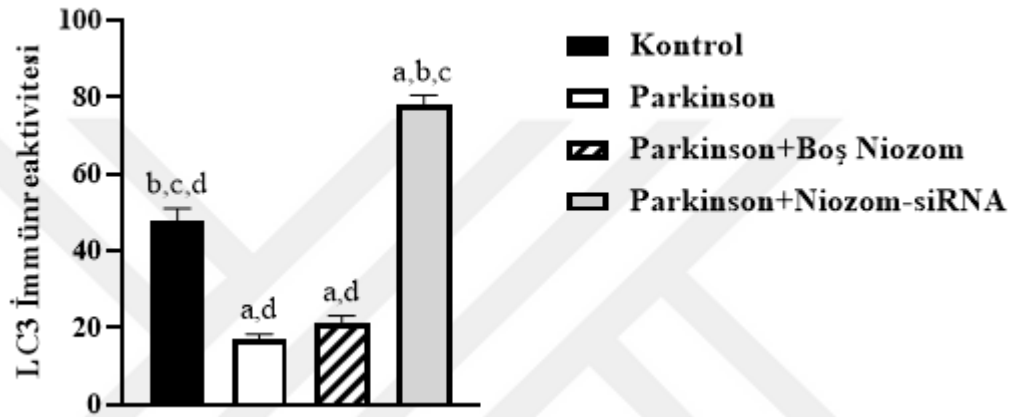


Şekil 27: Deney gruplarında p62 immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

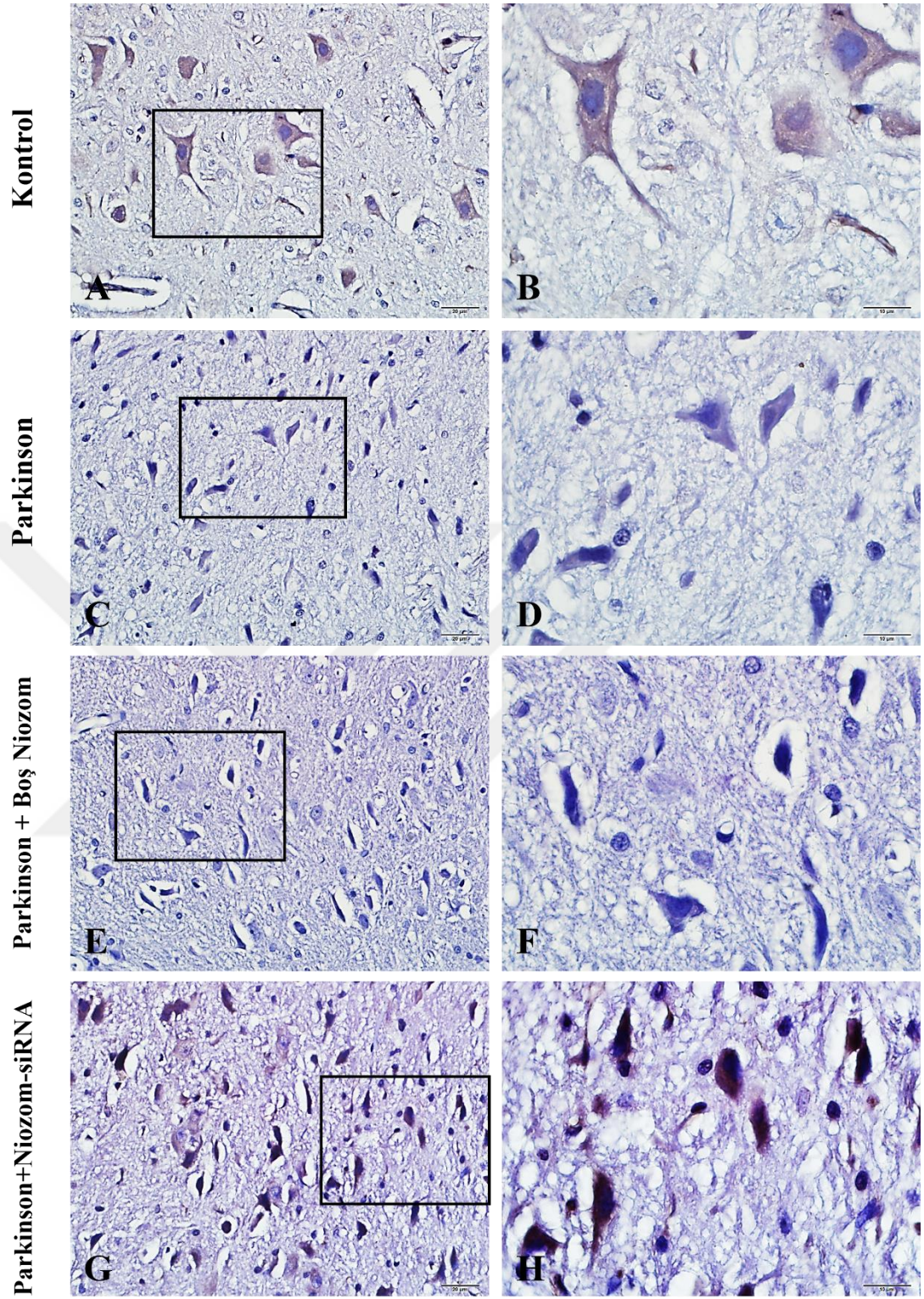


Şekil 28: Deney gruplarında gerçekleştirilen p62 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Gerçekleştirilen LC3II immünohistokimyasına ait bulgular rotenon enjeksiyonu yapılan Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında LC3II protein ekspresyon seviyesinin Kontrol grubuna oranla anlamlı derecede azaldığını göstermektedir. Bununla birlikte BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubundaki LC3II protein ekspresyon seviyesinin Kontrol, Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 29 ve Şekil 30).



Şekil 29: Deney gruplarında LC3II immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

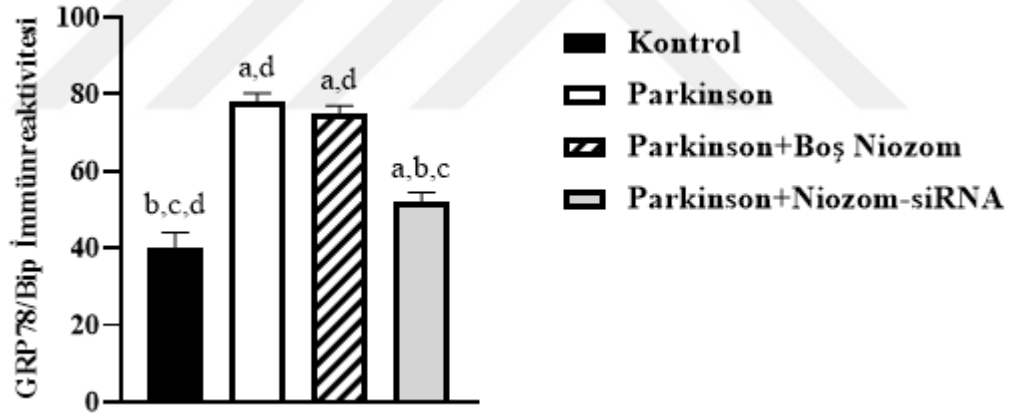


Şekil 30: Deney gruplarında gerçekleştirilen LC3II immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

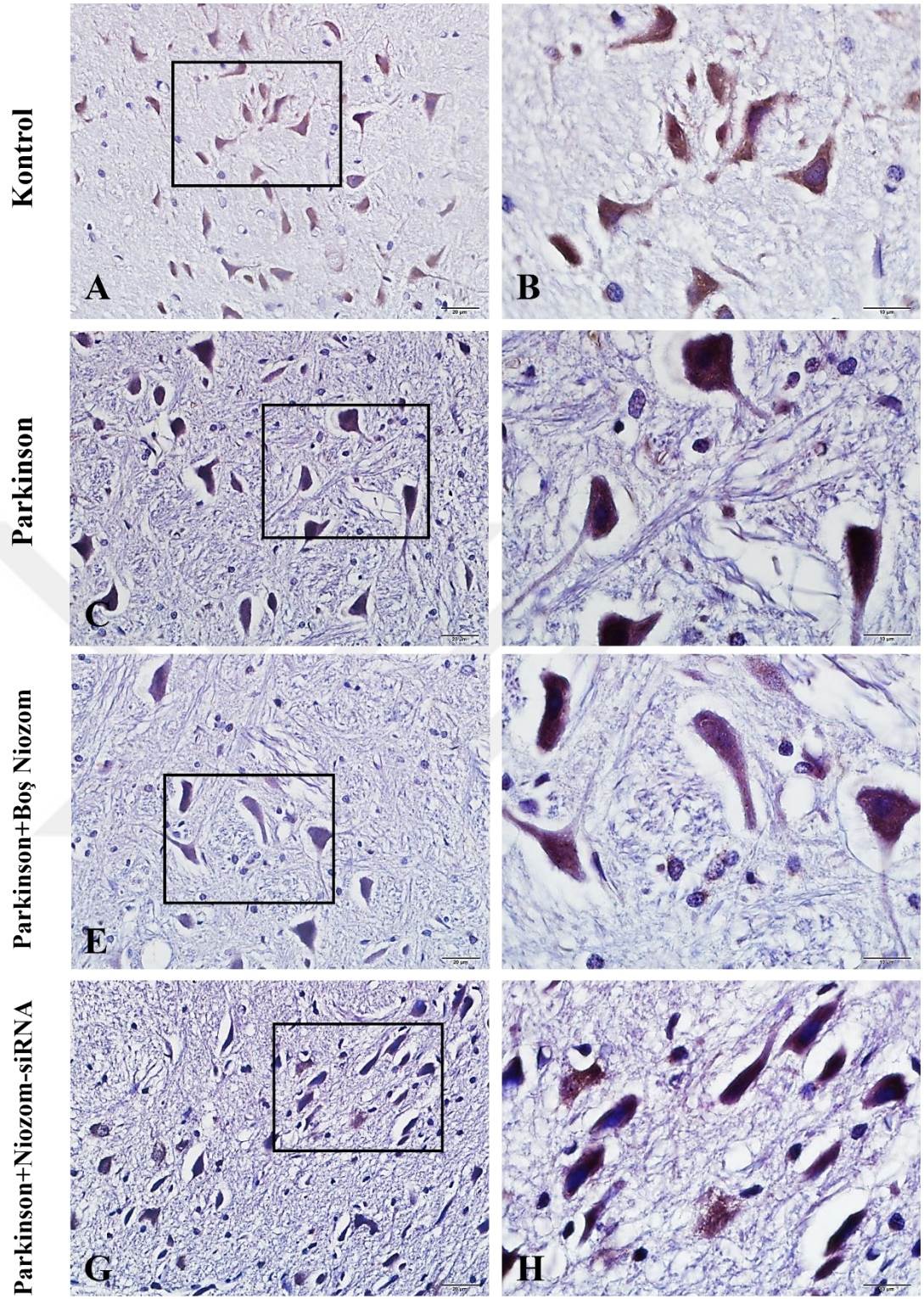
4.3.4.2.4. Grp78/Bip, PERK-1, ATF6, IRE1, CHOP İmmünohistokimyasal Boyamalarına Ait Bulgular

Rotenon ile tetiklenen *in vivo* PH modelinde BRCC3 gen nakavtının ERS süreci üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi için Grp78/Bip, ATF6, PERK-1, IRE1, CHOP proteinlerine yönelik immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen Grp78/Bip immünohistokimyasına ait bulgular, rotenon enjeksiyonu yapılan Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında Grp78/Bip pozitif hücre sayısının ve Grp78/Bip protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Rotenon ile PH modeli indüklenen ve daha sonrasında BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise Grp78/Bip protein ekspresyon şiddetinin rotenon enjeksiyonu yapılan diğer gruplara oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır (Şekil 31 ve Şekil 32).

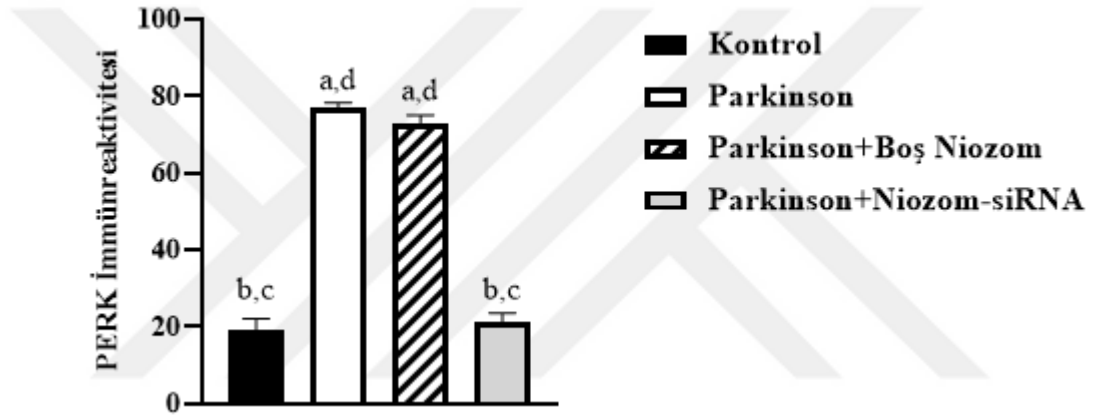


Şekil 31: Deney gruplarında Grp78/Bip immünreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

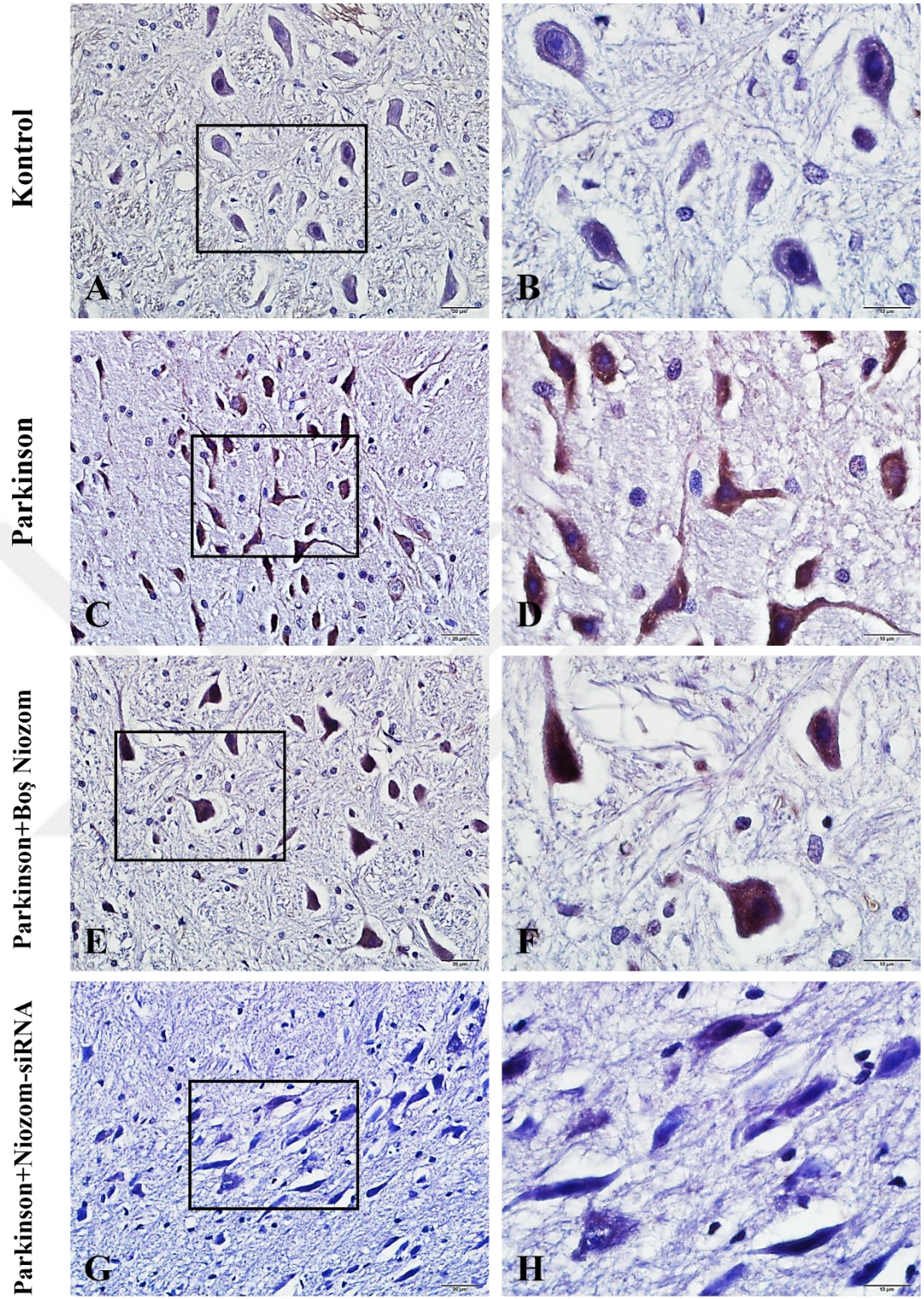


Şekil 32: Deney gruplarında gerçekleştirilen Grp78/Bip immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Gerçekleştirilen PERK-1 immünohistokimyasına ait bulgular, rotenon enjeksiyonu yapılan Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında PERK-1 pozitif hücre sayısının ve PERK-1 protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Rotenon ile PH modeli indüklenen ve daha sonrasında BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise PERK-1 protein ekspresyon şiddetinin rotenon enjeksiyonu yapılan diğer gruplara oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte, Parkinson+Niozom-siRNA grubundaki PERK-1 protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubu ile benzer olduğu görülmüştür (Şekil 33 ve Şekil 34).

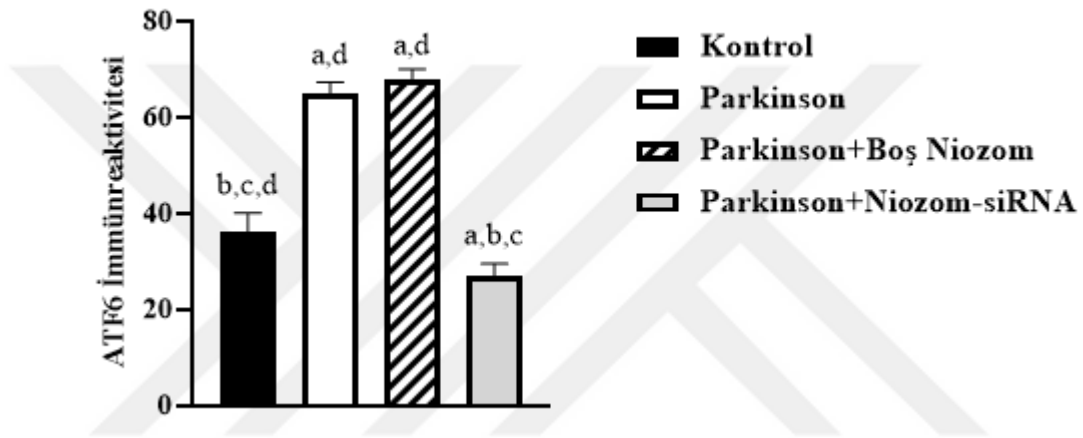


Şekil 33: Deney gruplarında PERK-1 immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

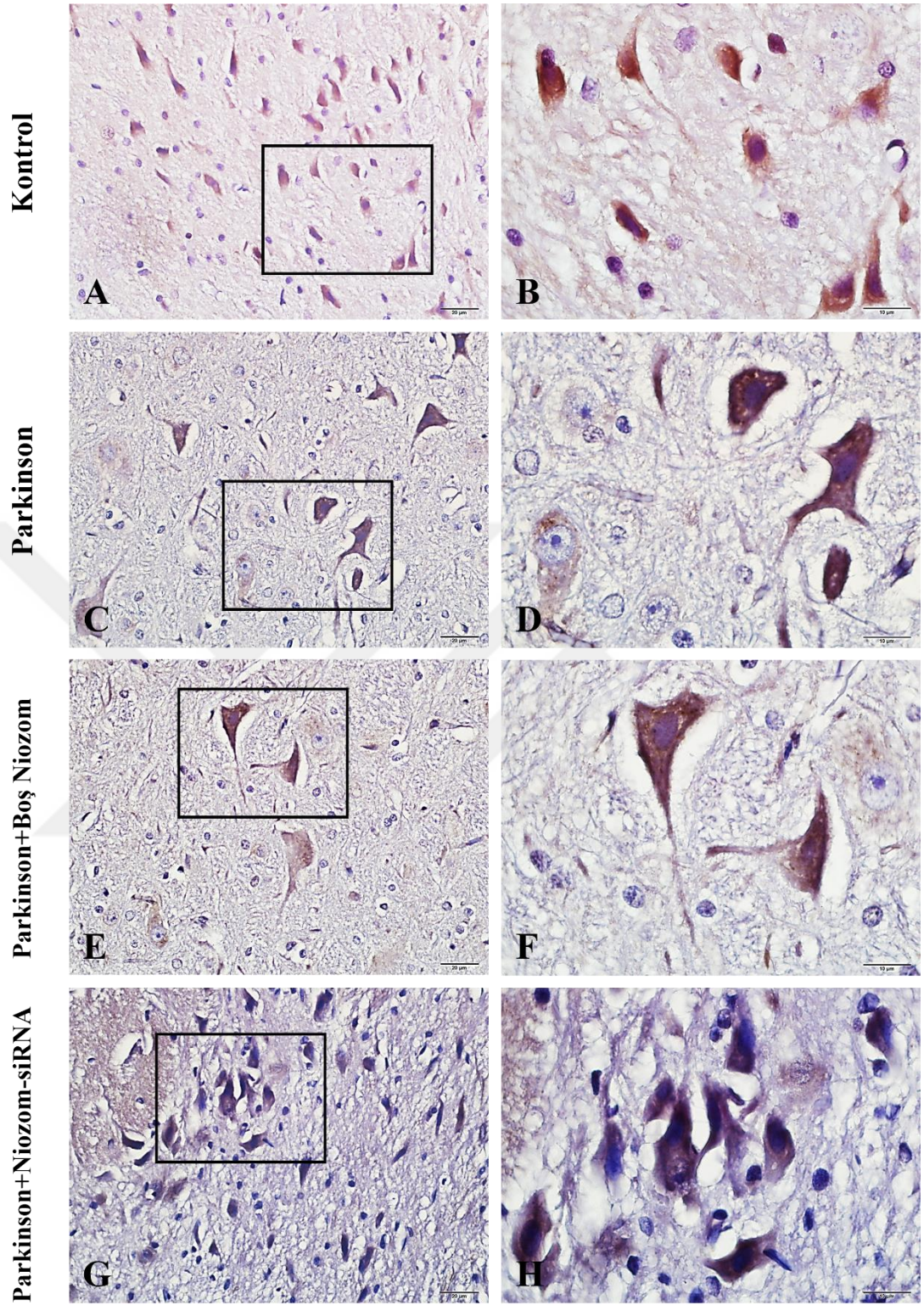


Şekil 34: Deney gruplarında gerçekleştirilen PERK-1 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Gerçekleştirilen ATF6 immünohistokimyasına ait bulgular, rotenon enjeksiyonu yapılan Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında ATF6 pozitif hücre sayısının ve ATF6 protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan, rotenon ile PH modeli indüklenen ve daha sonrasında BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise ATF6 protein ekspresyon şiddetinin hem Kontrol hem de rotenon enjeksiyonu yapılan gruplara oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır (Şekil 35 ve Şekil 36).

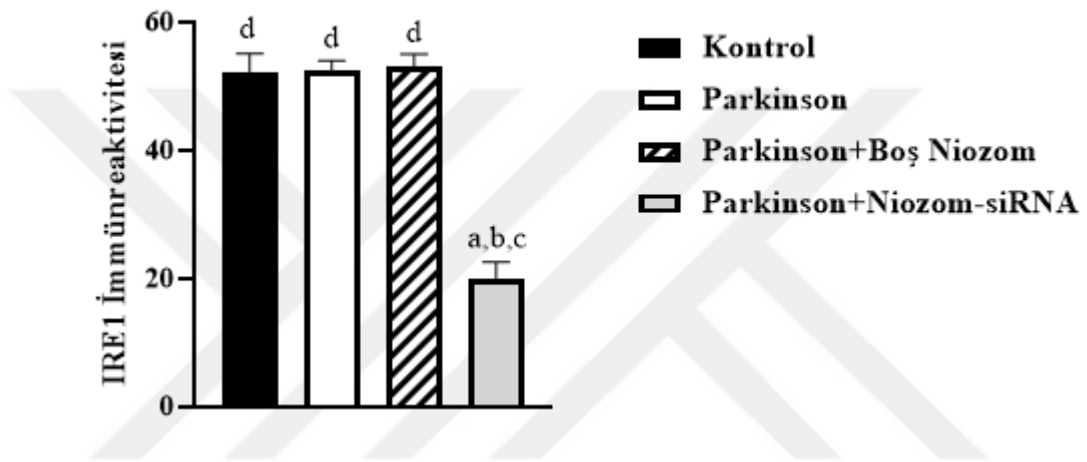


Şekil 35: Deney gruplarında ATF6 immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

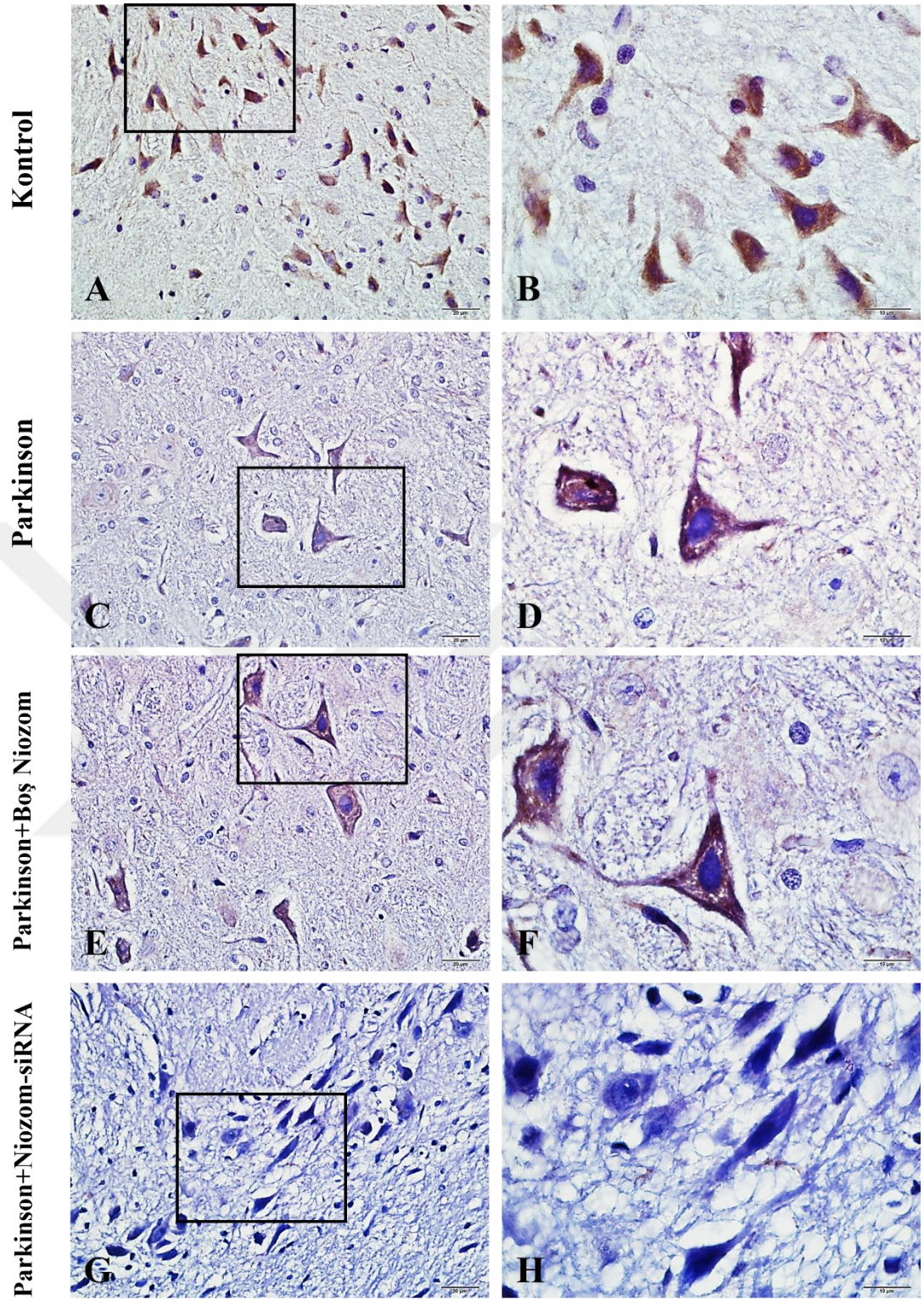


Şekil 36: Deney gruplarında gerçekleştirilen ATF6 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Gerçekleştirilen IRE1 immünohistokimyasına ait bulgular, rotenon enjeksiyonu yapılan Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında IRE1 pozitif hücre sayısının ve IRE1 protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubuna benzer olduğunu göstermektedir. Öte yandan, rotenon ile PH modeli indüklenen ve daha sonrasında BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise IRE1 protein ekspresyon şiddetinin hem Kontrol hem de rotenon enjeksiyonu yapılan diğer gruplara oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır (Şekil 37 ve Şekil 38).

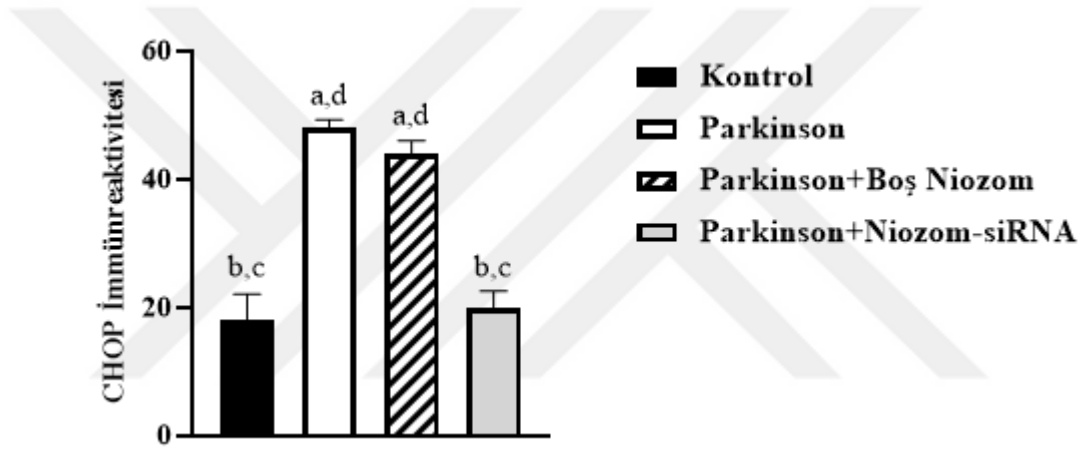


Şekil 37: Deney gruplarında IRE1 immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).

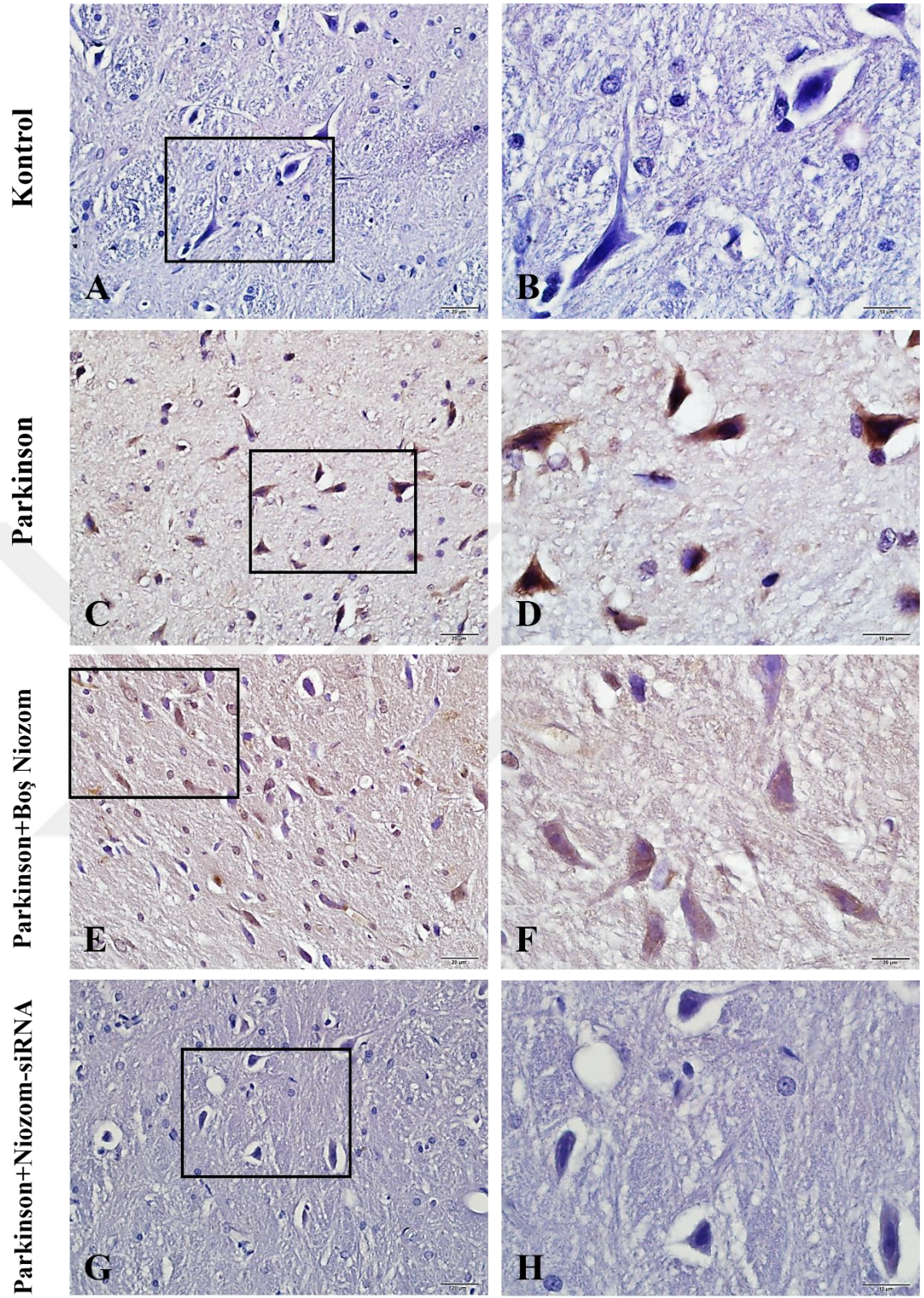


Şekil 38: Deney gruplarında gerçekleştirilen IRE1 immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

Gerçekleştirilen CHOP immünohistokimyasına ait bulgular, rotenon enjeksiyonu yapılan Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında CHOP pozitif hücre sayısının ve CHOP protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Rotenon ile PH modeli indüklenen ve daha sonrasında BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise CHOP protein ekspresyon şiddetinin rotenon enjeksiyonu yapılan diğer gruplara oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte, Parkinson+Niozom-siRNA grubundaki CHOP protein ekspresyon şiddetinin Kontrol grubu ile benzer olduğu görülmüştür (Şekil 39 ve Şekil 40).



Şekil 39: Deney gruplarında CHOP immünoreaktivitesine ait grafik. a: Kontrol grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), b: Parkinson grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), c: Parkinson+Boş Niozom grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$), d: Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre anlamlı değişim ($p<0.001$).



Şekil 40: Deney gruplarında gerçekleştirilen CHOP immünohistokimyasal boyamasına ait mikrograflar. A, C, E ve G (40X Büyütme). B, D, F ve H (100X Büyütme).

4.3.5. RT-qPCR Analizlerine Ait Bulgular

Oluşturulan PH modelinin ve bu modelde gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının otofaji ve ERS ile ilişkili moleküllerin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerin anlaşılabilmesi amacıyla RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 8).

Gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerine ait bulgular değerlendirildiğinde ERS ile ilişkili genlerden CHOP, PERK-1 ve IRE1 mRNA ekspresyonlarının Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında Kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan, BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise, CHOP, PERK-1 ve IRE1 mRNA ekspresyonlarının hem Kontrol hem de PH modeli indüklenen diğer gruplara oranla anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır.

ERS ile ilişkili bir diğer gen olan ATF6'ya ait değerlendirmede ise, Parkinson grubunda bu gene ait mRNA ekspresyon seviyesinin, diğer üç grubu oranla anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlenmiştir.

Grp78/Bip mRNA ekspresyonu analizlerinde ise PH modeli indüklenen bütün gruplarda Grp78/Bip mRNA ekspresyon seviyesinin Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek olduğu anlaşılmıştır. PH modeli indüklenen gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise Parkinson+Niozom-siRNA grubundaki mRNA ekspresyon seviyesinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarından yaklaşık 2,5 kat düşük olduğu not edilmiştir.

Otofaji ile ilişkili Beclin-1, p62 ve LC3II genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde ise, Beclin-1 mRNA ekspresyonunun, Parkinson+Boş Niozom ve Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında Kontrol ve Parkinson gruplarına oranla anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlenmiştir.

p62 genine ait değerlendirmede ise, PH modeli indüklenen bütün gruplarda p62 mRNA ekspresyonunun Kontrol grubuna oranla artış gösterdiği saptanmıştır. Bu gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, Parkinson grubundaki p62 mRNA ekspresyonunun Kontrol+Boş Niozom grubuna kıyasla yaklaşık 2,5 kat, Parkinson+Niozom-siRNA grubuna göre ise yaklaşık 5 kat daha yüksek olduğu anlaşılmıştır.

LC3II'ye ait değerlendirmede, LC3II mRNA ekspresyonunun hem Parkinson hem de Parkinson+Boş Niozom gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Öte yandan, yapılan değerlendirmede, Parkinson+Niozom-siRNA grubunda, LC3II mRNA ekspresyon seviyesinin diğer üç gruba oranla anlamlı derecede yükseliş gösterdiği saptanmıştır.

Otofaji ve ERS ile ilişkili genler dışında *in vivo* PH modelinde nakavtı gerçekleştirilen BRCC3 genine ait mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde ise rotenone enjeksiyonu yapılan gruplarda BRCC3 mRNA ekspresyonlarının Kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Bununla birlikte, niozom-siRNA ile gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise mRNA ekspresyon seviyesinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 8: *In vivo* deney gruplarında otofaji ve ERS ile ilişkili genlere ait mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Değer	Deney Grupları			
		Kontrol	Parkinson	Parkinson+Boş Niozom	Parkinson+Niozom-siRNA
BRCC3	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	16,11 (U)*	14,12 (U)*	2,92 (U)*,a,b
ATF6	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	58,48 (U)*	1,36 (U)	1,20 (D)
Beclin-1	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	1,93 (U)	9,06 (U)*	8,22 (U)*
CHOP	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	66,25 (U)*,c,d	27,09 (U)*	2,12 (D)#
Grp78/Bip	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	5,35 (U)*	5,02 (U)*	2,12 (U)*
PERK-1	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	8,05 (U)*	21,40 (U)*,e	2,67 (D)#
p62	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	11,08 (U)*	4,85 (U)*	2,67 (U)*
IRE1	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	2,44 (U)*	2,73 (U)*	2,94 (D)#
LC3II	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	1	15,77 (D)#	3,24 (D)#	4,05 (U)*,f

D: mRNA ekspresyon seviyesinde azalma

U: mRNA ekspresyon seviyesinde artış

*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış

#: Kontrol grubuna göre anlamlı azalış

a: Parkinson+BRCC3 grubunda, Parkinson grubuna göre 5,51 kat daha az eksprese ediliyor.

b: Parkinson+BRCC3 grubunda, Parkinson+Boş Niozom grubuna göre 4,83 kat daha az eksprese ediliyor

c: Parkinson grubunda, Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 2 kat fazla eksprese ediliyor

d: Parkinson grubunda, Parkinson+Boş Niozom grubuna oranla 139,10 kat fazla eksprese ediliyor

e: Parkinson+Boş Niozom grubunda, Parkinson+Niozom-siRNA grubuna oranla 57,13 kat fazla eksprese ediliyor

f: Parkinson+Niozom-siRNA, grubunda Parkinson grubuna oranla 63,86 kat daha fazla eksprese ediliyor



Tartışma

Parkinson Hastalığı (PH), en karakteristik belirtileri tremor, bradikinezi, musküler rijidite ve postrutal instabilite olan nörodejenaratif bir hastalıktır (Ye ve diğerleri, 2023). Modern tıp literatürüne ilk kez 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından kazandırılan ve 2018 yılı verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 7 ila 10 milyon kişiyi etkilediği bilinen (Kustrimovic ve diğerleri, 2018) bu hastalık üzerinde gerçekleştirilen prelinik ve klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar; mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stress, endoplazmik retikulum stresi ve nöroinflamasyon gibi moleküler süreçlerin PH'nin nöropatolojisinde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Alharthy ve diğerleri, 2023; Clemente-Suárez ve diğerleri, 2023). Bununla birlikte, karmaşık doğası nedeniyle etiyojisi hala tam anlamıyla aydınlatılamamış olan bu hastalığın günümüzde dahi kesin bir tedavisi bulunmamaktadır (Acharya, Chakraborty ve Chakraborty, 2019). Öyle ki, günümüzde PH tedavisinde kullanılan levodopa ve dopamin agonistleri temelli yaklaşımlar semptomatik olup, uzun zamanlı kullanımlarında ciddi yan etkiler oluşturmaktadır (Lees ve diğerleri, 2023). Bu nedenle, PH ile ilişkilendirilmiş moleküler süreçlerin düzenlenmesinde hedeflenebilecek gen ve gen ürünlerinin araştırıldığı prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, hedef genlerin siRNA'lar gibi komplementer nükleik asitler ile susturulduğu RNA interferens (RNAi) yaklaşımı PH'nin tedavisinde umut vaat etmektedir (D. Li, Mastaglia, Fletcher ve Wilton, 2020). Öte yandan, siRNA bazlı tedavi protokollerinde karşılaşılan en önemli zorluk, siRNA'ların ekstraselüler alanda enzimatik ve fagositik degradasyonu, hücresel bariyerler ve siRNA'lara karşı oluşturulan immün cevap nedeniyle hedef genlerin susturulamamasıdır (Tatiparti, Sau, Kashaw ve Iyer, 2017). Bu nedenle, *in vitro* ve *in vivo* siRNA susturumlarında taşıyıcı sistem kullanımı, siRNA bazlı tedavi yaklaşımlarının başarısını arttırmak için önemli bir olgudur (Dong, Siegwart ve Anderson, 2019). Non-iyonik surfaktanların hidrolizi ile elde edilebilen lipozom benzeri sentetik veziküller olan niozomların (S. Chen ve diğerleri, 2019), taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı birçok prelinik çalışmada bu sentetik veziküllerin subkutan, intravenöz, peroral ve transdermal olarak uygulanan terapötik ajanların etkinliğini arttırdığına, buna karşın bu maddelerin yan etkilerini azalttığına dair kanıtlar sunan çalışmaların (Abdelrahman ve diğerleri, 2017; S. Chen ve diğerleri, 2019; Zidan ve Habib, 2014) yanı sıra siRNA gibi biyo-stabilitesi düşük moleküllerin vücut içi taşınımında etkili olduğunu (Yang ve diğerleri, 2018) ve kan

beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiğini (Gharbavi ve diğerleri, 2018) gösteren çalışmaların varlığı RNAi bazlı tedavilerde taşıyıcı sistem olarak niozomların kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Bu literatür bilgileri doğrultusunda düşünüldüğünde, tez çalışması kapsamında rotenon ile indüklenen *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde niozom-siRNA kompleksleri ile gerçekleştirilen gen nakavtının “PH’nin tedavisinde kullanılma olasılığı olan bir terapötik yaklaşım tanımlanmasına prelinik veri sağlama” potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Öte yandan gerçekleştirilen tez çalışmasında oluşturulan niozom-siRNA komplekslerinin enjeksiyondan sonraki 5 saat içerisinde beyine ulaştığının ve bu kompleksin 24 saatten fazla dolaşımında kaldığının IVIS analizleri ile gösterilmiş olması bu niozom-siRNA komplekslerinin *in vivo* gen susturumu için uygun bir araç olabileceğini ortaya koymaktadır.

PH üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar PH vakalarının büyük bir çoğunluğunun sporadik formda olduğunu ortaya koymaktadır (Ganguly ve diğerleri, 2021). Bu nedenle tez çalışması kapsamında rotenon ile indüklenen *in vitro* ve *in vivo* sporadik PH modeli (Zeng, Geng ve Jia, 2018) oluşturulmuştur. Tez çalışması kapsamında PH modeli indüksiyonunda kullanılan rotenonun, mitokondriyal kompleks I’i inhibe ederek mitokondriyal disfonksiyona ve oksidatif strese neden olduğu böylece dopaminerjik nöronlarda hücre ölüm süreçlerini tetiklediği bilinmektedir (Chithra ve diğerleri, 2023). Buna ek olarak, rotenonun dopamin taşıyıcı proteine bağlanarak kolaylıkla kan beyin bariyerini geçtiği ve SNpc bölgesindeki dopaminerjik nöronlarda α -syn birikimini ve Lewy Cisimciği formasyonunu tetiklediği bildirilmiştir (Peshattiwar ve diğerleri, 2020). Örneğin, Radad ve ark, 20 nM rotenon ile 48 saat boyunca inkübe edilen sıçan primer orta beyin dopaminerjik nöron hattında TH pozitif hücre sayısının anlamlı ölçüde azaldığını ortaya koymuştur (Radad, Rausch ve Gille, 2006). Mohamed ve ark., ise ratlara 35 gün boyunca 2 mg/kg subkutan enjekte edilen rotenonun, bu ratların SNpc bölgesinde TH pozitif hücre sayısında azalmaya, α -syn ekspresyonunda ise artışa neden olduğunu rapor etmiştir (Mohamed, Abdel-Fattah, Abdel-Aleem, El-Sheikh ve Elbatch, 2023). Bu bağlamda TH’nin önemli bir dopaminerjik nöron belirtici, α -syn birikiminin ise PH’nin nöroatolojisi ile ilişkili bir süreç olduğu düşünüldüğünde rotenonun sporadik PH modellemesinde etkili bir ajan olduğu anlaşılmaktadır (Giráldez-Pérez ve diğerleri, 2014). Öte yandan, tez çalışması kapsamında 48 saat boyunca 20 nM rotenon ile

inkübe edilen primer orta beyin dopaminerjik hücre hattında TH pozitif hücre sayısında görülen anlamlı azalmaya ek olarak 35 gün boyunca hergün 2 mg/kg subkutan rotenon enjekte edilen sıçanlarda gözlemlenen TH pozitif hücre sayısındaki azalışa karşın α -syn birikimindeki artış literatürle uyumlu olup, tez kapsamında indüklenmek istenilen *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinin uygun biçimde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, tez çalışması kapsamında oluşturulan *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde niozom-siRNA kompleksi ile BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında TH pozitif hücre sayılarının ve TH ekspresyon seviyelerinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla yüksek olması BRCC3 gen nakavtının PH modellerinde koruyucu bir etki oluşturabileceğine düşündürmektedir. Cheng ve ark. tarafından 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada primer kortikal hücre hattında MPTP ile indüklenen *in vitro* PH modelinde shRNA ile gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının bu hücreleri NLRP3 inflamazom tarafından indüklenen nöroinflamasyona karşı koruduğunun gösterilmiş olması bu düşüncüyü desteklemektedir (Cheng ve diğerleri, 2020).

PH'de gözlemlenen bradikinezi ve yürüyüş bozukluğu gibi motor aktivite defektlerinin beyinde ortaya çıkan histopatolojik değişimler ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Magrinelli ve diğerleri, 2016). Buna ek olarak, rotenon ile PH modeli indüklenen hayvanlarda lokomotor aktivite defektlerinin yanı sıra orta beyin dokularında Lewy Cisimcikleri ve gliosis gibi histopatolojik değişikliklerin ortaya çıktığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (L. X. Liu ve diğerleri, 2018; S. M. Rocha ve diğerleri, 2022). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen davranış testleri ve histokimyasal analizlerden elde edilen bulgular literatürle uyumlu şekilde rotenon ile PH modeli indüklenen gruptaki hayvanlarda Lewy Cisimciği benzeri inklüzyonlar, gliosis ve yoğun dopaminerjik nöron kayıpları gibi histopatolojik değişikliklerin yanı sıra motor aktivite defektlerinin ortaya çıktığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, *in vivo* PH modelinde niozom-siRNA kompleksi ile BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda hem histopatolojik değişimlerin hem de motor aktivite defektlerinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla düşüş göstermesi, BRCC3 gen nakavtının dopaminerjik nöronlarda koruyucu bir etki oluşturabileceği düşüncesini desteklemektedir.

PH'nin nöropatolojisini aydınlatmak amacıyla yapılan birçok klinik çalışma, azalan antioksidan enzim aktivitesi ve artan lipid peroksidasyonu nedeniyle dopaminerjik

nöronlarda ortaya çıkan oksidatif stres koşullarının mitokondriyal disfonksiyona ve α -syn birikimine neden olarak PH'nin patogenezinde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Chakrabarti ve Bisaglia, 2023; de Farias ve diğerleri, 2016; Gökçe Çokal ve diğerleri, 2017). Öte yandan, rotenon ile indüklenen *in vivo* PH modelinde azalan antioksidan enzim (SOD) aktivitesi ve artan lipid peroksidasyon ürünü (MDA) seviyelerinin α -syn birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (Moradi Vastegani ve diğerleri, 2023). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen biyokimyasal analizler, rotenon enjeksiyonu yapılan gruplardaki hayvanların orta beyin dokularında, Kontrol grubuna kıyasla, SOD aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı, MDA seviyesinin ise anlamlı derecede artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Buna ek olarak, yapılan α -syn immünohistokimyasının sonuçları ise rotenon indüklenen gruplarda α -syn protein ekspresyonunun Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını göstermektedir. Elde edilen bulguların literatür ile uyumluluğu olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, niozom-siRNA kompleksi ile BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda SOD ve MDA seviyelerinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına kıyasla Kontrol grubuna daha yakın bulunmuştur. Ayrıca, bu gruptaki α -syn protein ekspresyonunun Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşüş gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bulgular ve literatür bilgileri birlikte ele alındığında, BRCC3 gen nakavtının antioksidan sistem aktivasyonunun geri kazanımına neden olarak α -syn birikimini baskıladığı söylenebilir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, hücrelerde yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin yıkımında görevli olan ubiquitin proteazom sistem (UPS) ve otofaji mekanizmalarında meydana gelen aksamaların, dopaminerjik nöronlarda α -syn protein agregatlarının birikimine ve Lewy Cisimciklerinin oluşumuna neden olduğunu ortaya koymaktadır (Lee ve diğerleri, 2023; Y. Li, Li ve Wu, 2022). Öte yandan, UPS'de görevli ligaz enzimlerince gerçekleştirilen lizin 63 (K63) ubiquitinasyonunun hücrelerde otofajiyi tetiklediği (Kwon ve Ciechanover, 2017) ve K63 ubiquitin paterninin insan hücrelerinde α -syn'nin lizozomal yıkımını tetiklediği rapor edilmiştir (Tofaris ve diğerleri, 2011). Ayrıca, bir K63 deubikuitinaz olan BRCC3'ün TRIM14 ve USP14 ile kompleks oluşturarak hücrelerde otofajik degradasyon sürecini baskıladığı bildirilmiştir (D. Liu, Jin ve Cui, 2022). Bu literatür bilgileri doğrultusunda düşünüldüğünde, beyinde ekspresyonu ve enzimatik aktivitesi artan BRCC3'ün UPS ve otofaji süreçlerini baskılayarak PH patogenezinde rol oynayabileceğine dair bir

çıkarımda bulunulabilir. Bununla birlikte, tez çalışmasının *in vitro* ve *in vivo* basamakların gerçekleştirilen immünohistokimya ve RT-qPCR analizlerinde Parkinson gruplarındaki BRCC3 protein ve mRNA ekspresyon seviyelerindeki artışa karşın aynı gruplarda otofajinin temel belirteci olarak kabul edilen LC3II (Kuşçu, Gürel, Buhur, Oltulu, ve diğerleri, 2022) ekspresyonundaki azalış bu çıkarımı desteklemektedir. Diğer taraftan, niozom-siRNA kompleksi ile gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA gruplarında ise LC3II ile Beclin-1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin hem Kontrol hem de Parkinson grubuna kıyasla yüksek çıkması bu çıkarımı destekleyen bir diğer olgudur. Öte yandan, UPS ile otofajinin kesişim noktasında bulunan (Shin, Park ve Chung, 2020) ve MPTP ile indüklenen PH modelinde dopaminerjik nöron hasarına karşı koruyucu bir rol üstlendiği gösterilen p62 (Y. Liu ve diğerleri, 2021) için elde edilen ve literatür ile örtüşmeyen sonuçlar ise PH modellerinde BRCC3'ün rolünün araştırıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

Hücrelerde kalsiyum homeostazisinin bozulması, hipoksi ve oksidatif stres durumlarında endoplazmik retikulum lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış polipeptidlerin birikimi sonucunda ortaya çıkan endoplazmik retikulum stresi (ERS), PH patogenezinde rol oynayan önemli bir moleküler aktördür (Colla, 2019; Omura ve diğerleri, 2013). Öyle ki, Conn ve ark. tarafından yapılan postmortem beyin örnekleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, ERS cevabının oluşumunda görevli olan PERK/eIF2 α gibi proteinlerin Lewy Cisimcikleri içerisinde yoğun şekilde biriktiği gösterilmiştir (Conn ve diğerleri, 2004). Buna ek olarak, yakın zamanda yapılan çalışmalarda rotenon ile indüklenen PH modellerinde Grp78/Bip, PERK ve CHOP gibi ERS ilişkili moleküllerin dopaminerjik nöronlardaki ekspresyon seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (Michel ve diğerleri, 2022; Motawi ve diğerleri, 2022). Tez çalışmasının *in vitro* ve *in vivo* basamağında gerçekleştirilen immünohistokimya ve RT-qPCR analizlerinden elde edilen sonuçlar, literatüre benzer şekilde Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarında ERS ilişkili genlere ait mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde yükseldiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, niozom-siRNA kompleksi ile BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda ise ERS ilişkili bu moleküllerin hem mRNA hem de protein ekspresyon seviyelerinin Parkinson ve Parkinson+Boş Niozom gruplarına oranla anlamlı derecede düşüş gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bu

bulgular, *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde gerçekleştirilen BRCC3 nakavtının rotenon maruziyeti sonrası artış gösteren ve α -syn birikimi ile yakından ilişkili olan ERS'nin (Colla, 2019) baskılanması üzerinden dopaminerjik nöronlarda koruyucu bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, 2019 yılında fare spinal kord nöronları üzerinde yapılan bir çalışmada mitokondriyal ubikuitin ligaz (MITOL) enzimi tarafından gerçekleştirilen IRE1 α K63 poli-ubikuitinasyonunun, ERS'nin hafifletilmesin ve ERS bağıntılı apoptozun baskılanmasında kritik bir basamak olabileceğinin gösterilmiş olması (Takeda ve diğerleri, 2019), bir K63 deubikuitinaz olan BRCC3'ün nakavtının dopaminerjik nöronlarda ERS bağıntılı patolojik süreçlerin baskılanmasında etkili bir yaklaşım olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Bununla birlikte, *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde, glial aktivasyon ve α -syn yıkımı süreçleri üzerinden dopaminerjik nöronlarda koruyucu etki oluşturduğu bilinen ATF6 (Credle ve diğerleri, 2015; Hashida ve diğerleri, 2012) mRNA ve protein ekspresyonlarının BRCC3 gen nakavtı gerçekleştirilen Parkinson+Niozom-siRNA grubunda diğer bütün gruplara kıyasla anlamlı bir düşüş gösterdiğinin saptanmış olması BRCC3 gen nakavtının ATF6 aracılı yolak ile ilişkisini göstermekle birlikte literatür ile örtüşmeyen bu sonuçlar PH modellerinde BRCC3'ün rolünün araştırıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğuna dair düşüncayı desteklemektedir.

Özetle, tez çalışması kapsamında oluşturulan *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde niozom-siRNA kompleksi ile gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının, otofaji ve ERS'de görevli moleküllerin ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesi ve antioksidan sistem aktivasyonunun geri kazanımı yoluyla dopaminerjik nöronlar üzerinde koruyucu bir etki oluşturduğu anlaşılmıştır. Yapılan analizlerden elde edilen bulgular literatür bilgileri ile birlikte ele alındığında, bu koruyucu etkinin altında yatan temel moleküler mekanizmanın nöronlarda otofaji, UPS ve ERS'nin düzenlenmesinde görevli olduğu bilinen K63 ubikuitinasyon sürecinin, K63 deubikuitinaz aktivitesine sahip BRCC3 nakavtı ile düzenlenmesi olabileceği görülmüştür. Öte yandan, p62 ve ATF6 ekspresyonlarında elde edilen ve literatür ile uyuşmayan bulgular BRCC3'ün PH ile ilişkisini araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Tez çalışması kapsamında rotenon ile indüklenen *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinde niozom-siRNA kompleksi ile gerçekleştirilen BRCC3 gen nakavtının otofaji ve ERS ile ilişkili moleküllerin regülasyonu ve antioksidan sistemin geri kazanımı yoluyla dopaminerjik nöronlar üzerinde koruyucu bir etki oluşturduğu; bu koruyucu etkinin ise rotenon maruziyeti sonrası orta beyinde gözlemlenen histopatolojik değişimlerin ve hayvanlarda ortaya çıkan motor aktivite defektlerinin hafifletilmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak, bu koruyucu etkinin altında yatan temel moleküler mekanizmanın nöronlarda otofaji, UPS ve ERS'nin düzenlenmesinde görevli olduğu bilinen K63 ubikuitinasyon sürecinin, K63 deubikuitinaz aktivitesine sahip BRCC3 nakavtı ile düzenlenmesi olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, yaptığımız tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgular BRCC3'ün PH'de potansiyel bir terapötik hedef olabileceğine dair fikir vermektedir. Bununla birlikte, BRCC3'ün PH'de potansiyel bir terapötik hedef olarak tanımlanabilmesi için bu molekülün dopaminerjik nöron homeostazı ve PH nöropatogenezindeki rolünü farklı moleküler süreçler üzerinden araştıran preklinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Abdelrahman, F. E., Elsayed, I., Gad, M. K., Elshafeey, A. H. ve Mohamed, M. I. (2017). Response surface optimization, Ex vivo and In vivo investigation of nasal spanlastics for bioavailability enhancement and brain targeting of risperidone. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1–2), 1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.07.050
- Abusrir, A. H., Elsekaily, W. ve Bohlega, S. (2022). Tremor in Parkinson's Disease: From Pathophysiology to Advanced Therapies. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*, 12(1), 29. doi:10.5334/tohm.712
- Acharya, R., Chakraborty, M. ve Chakraborty, J. (2019). Prospective treatment of Parkinson's disease by a siRNA–LDH nanoconjugate. *MedChemComm*, 10(2), 227. doi:10.1039/C8MD00501J
- Acikgoz, E., Duzagac, F., Guven, U., Yigitturk, G., Kose, T. ve Oktem, G. (2022). “Double hit” strategy: Removal of sialic acid from the dendritic cell surface and loading with CD44+/CD24-/low cell lysate inhibits tumor growth and metastasis by targeting breast cancer stem cells. *International Immunopharmacology*, 107, 108684. doi:10.1016/J.INTIMP.2022.108684
- Adam, H., Gopinath, S. C. B., Md Arshad, M. K., Adam, T., Parmin, N. A., Husein, I. ve Hashim, U. (2023). An update on pathogenesis and clinical scenario for Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *3 Biotech 2023 13:5*, 13(5), 1–18. doi:10.1007/S13205-023-03553-8
- Alexopoulou, Z., Lang, J., Perrett, R. M., Elschami, M., Hurry, M. E. D., Kim, H. T., ... Tofaris, G. K. (2016). Deubiquitinase Usp8 regulates α -synuclein clearance and modifies its toxicity in Lewy body disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(32), E4688–E4697. doi:10.1073/pnas.1523597113
- Alharthy, K. M., Althurwi, H. N., Albaqami, F. F., Altharawi, A., Alzarea, S. I., Al-Abbasi, F. A., ... Kazmi, I. (2023). Barbigerone Potentially Alleviates Rotenone-Activated Parkinson's Disease in a Rodent Model by Reducing Oxidative Stress and Neuroinflammatory Cytokines. *ACS Omega*, 8(5), 4608–4615. doi:10.1021/ACSOMEGA.2C05837/ASSET/IMAGES/LARGE/AO2C05837_0006.JPEG
- Bologna, M., Espay, A. J., Fasano, A., Paparella, G., Hallett, M. ve Berardelli, A. (2023). Redefining Bradykinesia. *Movement Disorders*, 38(4), 551–557.

doi:10.1002/mds.29362

- Bologna, M., Paparella, G., Fasano, A., Hallett, M. ve Berardelli, A. (2020). Evolving concepts on bradykinesia. *Brain*, 143(3), 727–750. doi:10.1093/brain/awz344
- Calabresi, P., Mechelli, A., Natale, G., Volpicelli-Daley, L., Di Lazzaro, G. ve Ghiglieri, V. (2023). Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell death & disease*, 14(3), 176. doi:10.1038/s41419-023-05672-9
- Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E. ve Greenamyre, J. T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 34(2), 279–290. doi:10.1016/J.NBD.2009.01.016
- Castonguay, A.-M., Gravel, C. ve Lévesque, M. (2021). Treating Parkinson's Disease with Antibodies: Previous Studies and Future Directions. *Journal of Parkinson's Disease*, 11(1), 71–92. doi:10.3233/JPD-202221
- Chakrabarti, S. ve Bisaglia, M. (2023). Oxidative Stress and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: The Role of Dopamine Oxidation Products. *Antioxidants*, 12(4). doi:10.3390/ANTIOX12040955
- Chakraborty, J., Stockum, S., Marchesan, E., Caicci, F., Ferrari, V., Rakovic, A., ... Ziviani, E. (2018). USP 14 inhibition corrects an in vivo model of impaired mitophagy. *EMBO Molecular Medicine*, 10(11). doi:10.15252/emmm.201809014
- Chen, R., Berardelli, A., Bhattacharya, A., Bologna, M., Chen, K.-H. S., Fasano, A., ... Udupa, K. (2022). Clinical neurophysiology of Parkinson's disease and parkinsonism. *Clinical Neurophysiology Practice*, 7, 201–227. doi:10.1016/j.cnp.2022.06.002
- Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M. ve Wen, J. (2019, 1 Kasım). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.ejpb.2019.08.015
- Chen, Y., Zhang, D. Q., Liao, Z., Wang, B., Gong, S., Wang, C., ... Xu, J. P. (2015). Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1), 1–14. doi:10.1186/1750-1326-10-4

- Cheng, X., Xu, S., Zhang, C., Qin, K., Yan, J. ve Shao, X. (2020). The BRCC3 regulated by Cdk5 promotes the activation of neuronal NLRP3 inflammasome in Parkinson's disease models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(3), 647–654. doi:10.1016/j.bbrc.2019.11.141
- Chithra, Y., Dey, G., Ghose, V., Chandramohan, V., Gowthami, N., Vasudev, V. ve Srinivas Bharath, M. M. (2023). Mitochondrial Complex I Inhibition in Dopaminergic Neurons Causes Altered Protein Profile and Protein Oxidation: Implications for Parkinson's disease. *Neurochemical research*, 48(8), 2360–2389. doi:10.1007/S11064-023-03907-X
- Chopade, P., Chopade, N., Zhao, Z., Mitragotri, S., Liao, R. ve Chandran Suja, V. (2023). Alzheimer's and Parkinson's disease therapies in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 8(1). doi:10.1002/BTM2.10367
- Clemente-Suárez, V. J., Redondo-Flórez, L., Beltrán-Velasco, A. I., Ramos-Campo, D. J., Belinchón-deMiguel, P., Martínez-Guardado, I., ... Tornero-Aguilera, J. F. (2023). Mitochondria and Brain Disease: A Comprehensive Review of Pathological Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Biomedicines 2023*, Vol. 11, Page 2488, 11(9), 2488. doi:10.3390/BIOMEDICINES11092488
- Colla, E. (2019). Linking the endoplasmic reticulum to Parkinson's disease and alpha-synucleinopathy. *Frontiers in Neuroscience*, 13(MAY), 461767. /pmc/articles/PMC6550095/?report=abstract adresinden erişildi.
- Conn, K. J., Gao, W., McKee, A., Lan, M. S., Ullman, M. D., Eisenhauer, P. B., ... Wells, J. M. (2004). Identification of the protein disulfide isomerase family member PDip in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. *Brain Research*, 1022(1–2), 164–172. doi:10.1016/j.brainres.2004.07.026
- Cooper, J. M., Wiklander, P. B. O., Nordin, J. Z., Al-Shawi, R., Wood, M. J., Vithlani, M., ... Alvarez-Erviti, L. (2014). Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement Disorders*, 29(12), 1476–1485. doi:10.1002/mds.25978
- Costa, C. A. da, Manaa, W. El, Duplan, E. ve Checler, F. (2020). The Endoplasmic Reticulum Stress/Unfolded Protein Response and Their Contributions to Parkinson's Disease Physiopathology. *Cells*, 9(11). doi:10.3390/CELLS9112495
- Credle, J. J., Forcelli, P. A., Delannoy, M., Oaks, A. W., Permaul, E., Berry, D. L., ... Sidhu, A. (2015). α -Synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into

- COP2 vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 76, 112–125. doi:10.1016/J.NBD.2015.02.005
- de Farias, C. C., Maes, M., Bonifácio, K. L., Bortolasci, C. C., de Souza Nogueira, A., Brinholi, F. F., ... Barbosa, D. S. (2016). Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. *Neuroscience Letters*, 617, 66–71. doi:10.1016/J.NEULET.2016.02.011
- Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., ... Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet. Neurology*, 8(12), 1150–1157. doi:10.1016/S1474-4422(09)70238-8
- Dirkx, M. F. ve Bologna, M. (2022). The pathophysiology of Parkinson's disease tremor. *Journal of the Neurological Sciences*, 435, 120196. doi:10.1016/j.jns.2022.120196
- Dong-Chen, X., Yong, C., Yang, X., Chen-Yu, S. T. ve Li-Hua, P. (2023). Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1, 8(1), 1–18. doi:10.1038/s41392-023-01353-3
- Dong, Y., Siegwart, D. J. ve Anderson, D. G. (2019). Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 144, 133–147. doi:10.1016/j.addr.2019.05.004
- Dovonou, A., Bolduc, C., Soto Linan, V., Gora, C., Peralta, M. R. ve Lévesque, M. (2023). Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Translational neurodegeneration*, 12(1). doi:10.1186/S40035-023-00368-8
- Drummond, M. J., Glynn, E. L., Lujan, H. L., Dicarlo, S. E. ve Rasmussen, B. B. (2008). Gene and protein expression associated with protein synthesis and breakdown in paraplegic skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, 37(4), 505–513. doi:10.1002/mus.20976
- Duplan, E., Giaime, E., Viotti, J., Sévalle, J., Corti, O., Brice, A., ... Da Costa, C. A. (2013). ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X-box binding protein XBP-1. *Journal of Cell Science*, 126(9), 2124–2133.

doi:10.1242/jcs.127340

- Ferreira-Sánchez, M. D. R., Moreno-Verdú, M. ve Cano-de-la-Cuerda, R. (2020). Quantitative Measurement of Rigidity in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(3). doi:10.3390/s20030880
- Ganguly, U., Singh, S., Pal, S., Prasad, S., Agrawal, B. K., Saini, R. V ve Chakrabarti, S. (2021). Alpha-Synuclein as a Biomarker of Parkinson's Disease: Good, but Not Good Enough. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 702639. doi:10.3389/fnagi.2021.702639
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M. A. ve Ascherio, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 76(10), 863–869. doi:10.1212/WNL.0b013e31820f2d79
- Garabadu, D. ve Agrawal, N. (2020). Naringin Exhibits Neuroprotection Against Rotenone-Induced Neurotoxicity in Experimental Rodents. *NeuroMolecular Medicine*, 22(2), 314–330. doi:10.1007/s12017-019-08590-2
- Gharbavi, M., Amani, J., Kheiri-Manjili, H., Danafar, H. ve Sharafi, A. (2018). Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. *Advances in Pharmacological Sciences*. Hindawi Limited. doi:10.1155/2018/6847971
- Giráldez-Pérez, R. M., Antolín-Vallespín, M., Muñoz, M. D. ve Sánchez-Capelo, A. (2014). Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 1–17. doi:10.1186/S40478-014-0176-9/FIGURES/1
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K. ve Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nature reviews. Neurology*, 9(1), 13–24. doi:10.1038/NRNEUROL.2012.242
- Goenawan, H., Kiasati, S., Sylviana, N., Megantara, I. ve Lesmana, R. (2023). Exercise-Induced Autophagy Ameliorates Motor Symptoms Progressivity in Parkinson's Disease Through Alpha-Synuclein Degradation: A Review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Volume 19, 1253–1262. doi:10.2147/NDT.S401416
- Gökçe Çokal, B., Yurtdaş, M., Keskin Güler, S., Güneş, H. N., Ataç Uçar, C., Aytaç, B., ... Çubukçu, H. C. (2017). Serum glutathione peroxidase, xanthine oxidase, and superoxide dismutase activities and malondialdehyde levels in patients with

- Parkinson's disease. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 38(3), 425–431. doi:10.1007/S10072-016-2782-8
- Greenland, J. C. ve Barker, R. A. (2018). The Differential Diagnosis of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* içinde (ss. 109–128). Codon Publications. doi:10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch6
- Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical biochemistry*, 473, 63–65. doi:10.1016/J.AB.2014.12.007
- Gupta, I., Singh, K., Varshney, N. K. ve Khan, S. (2018). Delineating crosstalk mechanisms of the ubiquitin proteasome system that regulate apoptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 25. doi:10.3389/fcell.2018.00011
- Gurel, C., Kuscü, G. C., Buhur, A., Dagdeviren, M., Oltulu, F., Karabay Yavasoglu, N. U. ve Yavasoglu, A. (2019). Fluvastatin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats by reducing oxidative stress and regulating the blood-testis barrier via mTOR signaling pathway. *Human & experimental toxicology*, 38(12), 1329–1343. doi:10.1177/0960327119862006
- Harischandra, D. S., Ghaisas, S., Zenitsky, G., Jin, H., Kanthasamy, A., Anantharam, V. ve Kanthasamy, A. G. (2019). Manganese-induced neurotoxicity: New insights into the triad of protein misfolding, mitochondrial impairment, and neuroinflammation. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 665. doi:10.3389/fnins.2019.00654
- Hashida, K., Kitao, Y., Sudo, H., Awa, Y., Maeda, S., Mori, K., ... Hori, O. (2012). ATF6alpha promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PloS one*, 7(10). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0047950
- Hou, X., Watzlawik, J. O., Fiesel, F. C. ve Springer, W. (2020, 3 Nisan). Autophagy in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press. doi:10.1016/j.jmb.2020.01.037
- Huang, X., Gan, H., Tan, J., Wang, T., Zhao, J. ve Zhao, Y. (2021). BRCC3 promotes activation of the NLRP6 inflammasome following cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. *Neuroscience Letters*, 756, 135954. doi:10.1016/J.NEULET.2021.135954

- Huang, Y., Chen, J., Chen, X., Gao, J. ve Liang, W. (2008). PEGylated synthetic surfactant vesicles (Niosomes): novel carriers for oligonucleotides. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2), 607–614. doi:10.1007/s10856-007-3193-4
- Hwang, S. K., Tyszkiewicz, C., Morin, J., Point, G. R. ve Liu, C. N. (2021). Novel in vivo and ex vivo hybrid in vivo imaging system (IVIS) imaging offers a convenient and precise way to measure the glomerular filtration rate in conscious mice. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 110, 107084. doi:10.1016/J.VASCN.2021.107084
- Jankovic, J. ve Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(8), 795–808. doi:10.1136/JNNP-2019-322338
- Kalpana, K., Priyadarshini, E., Sreeja, S., Jagan, K. ve Anuradha, C. V. (2018). Scopoletin intervention in pancreatic endoplasmic reticulum stress induced by lipotoxicity. *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 857–869. doi:10.1007/s12192-018-0893-2
- Karvandi, M. S., Sheikhzadeh Hesari, F., Aref, A. R. ve Mahdavi, M. (2023). The neuroprotective effects of targeting key factors of neuronal cell death in neurodegenerative diseases: The role of ER stress, oxidative stress, and neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1105247. doi:10.3389/FNCEL.2023.1105247
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., ... Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608. doi:10.1038/33416
- Koeglsperger, T., Rumpf, S. L., Schließer, P., Struebing, F. L., Brendel, M., Levin, J., ... Herms, J. (2023). Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*, 18(1). doi:10.1186/S13024-023-00622-7
- Kook, S., Zhan, X., Thibeault, K., Ahmed, M. R., Gurevich, V. V. ve Gurevich, E. V. (2020). Mdm2 enhances ligase activity of parkin and facilitates mitophagy. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-61796-4
- Kouli, A., Torsney, K. M. ve Kuan, W.-L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and*

doi:10.15586/CODONPUBLICATIONS.PARKINSONSDISEASE.2018.CH1

Kumari, N., Lee, K. K. ve Jha, S. (2018). Targeting the Ubiquitin Proteasome System in Cancer. *Neoplasm* içinde (1. bs., ss. 203–243). InTech. doi:10.5772/intechopen.76705

Kuşçu, G. C., Gürel, Ç., Buhur, A., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Köse, T., Yavaşoğlu, A. ve Oltulu, F. (2022). Fluvastatin alleviates doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in rats via regulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis associated genes expressions. *Drug and chemical toxicology*. doi:10.1080/01480545.2022.2043351

Kuşçu, G. C., Gürel, Ç., Buhur, A., Oltulu, F., Akman, L., Köse, T., ... Yavaşoğlu, A. (2022). The regulatory effects of clomiphene and tamoxifen on mTOR and LC3-II expressions in relation to autophagy in experimental polycystic ovary syndrome (PCOS). *Molecular Biology Reports*, 49(3), 1721–1729. doi:10.1007/s11033-021-06981-y

Kustrimovic, N., Comi, C., Magistrelli, L., Rasini, E., Legnaro, M., Bombelli, R., ... Cosentino, M. (2018). Parkinson's disease patients have a complex phenotypic and functional Th1 bias: cross-sectional studies of CD4+ Th1/Th2/T17 and Treg in drug-naïve and drug-treated patients. *Journal of neuroinflammation*, 15(1). doi:10.1186/S12974-018-1248-8

Kwon, Y. T. ve Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11), 873–886. doi:10.1016/j.tibs.2017.09.002

Lázaro, D. F. ve Outeiro, T. F. (2020). The Interplay Between Proteostasis Systems and Parkinson's Disease. R. Barrio, J. D. Sutherland ve M. S. Rodriguez (Ed.), *Advances in experimental medicine and biology* içinde (C. 1233, ss. 223–236). Cha: NLM (Medline). doi:10.1007/978-3-030-38266-7_9

Lee, J., Sung, K. W., Bae, E. J., Yoon, D., Kim, D., Lee, J. S., ... Kwon, Y. T. (2023). Targeted degradation of α -synuclein aggregates in Parkinson's disease using the AUTOTAC technology. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), 1–21. doi:10.1186/S13024-023-00630-7/FIGURES/5

Lees, A., Tolosa, E., Stocchi, F., Ferreira, J. J., Rascol, O., Antonini, A. ve Poewe, W. (2023). Optimizing levodopa therapy, when and how? Perspectives on the

- importance of delivery and the potential for an early combination approach. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 23(1), 15–24. doi:10.1080/14737175.2023.2176220
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., ... Polymeropoulos, M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395(6701), 451–452. doi:10.1038/26652
- Li, D., Mastaglia, F. L., Fletcher, S. ve Wilton, S. D. (2020). Progress in the molecular pathogenesis and nucleic acid therapeutics for Parkinson's disease in the precision medicine era. *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2650–2681. doi:10.1002/MED.21718
- Li, Y., Li, S. ve Wu, H. (2022). Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress. *Cells*, 11(5). doi:10.3390/CELLS11050851
- Lim, K. L., Chew, K. C. M., Tan, J. M. M., Wang, C., Chung, K. K. K., Zhang, Y., ... Dawson, T. M. (2005). Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: Implications for lewy body formation. *Journal of Neuroscience*, 25(8), 2002–2009. doi:10.1523/JNEUROSCI.4474-04.2005
- Liu, D., Jin, S. ve Cui, J. (2022). The TRIM14-USP14-BRCC3 complex epigenetically regulates inflammation through inhibiting OPTN-mediated autophagic degradation of KDM4D. *Autophagy*, 18(8), 2001. doi:10.1080/15548627.2022.2055286
- Liu, L. X., Du, D., Wang, Z. Q., Fang, Y., Zheng, T., Dong, Y. C., ... Du, J. (2018). Differences in brain pathological changes between rotenone and 6-hydroxydopamine Parkinson's disease models. *Neural Regeneration Research*, 13(7), 1276. doi:10.4103/1673-5374.235076
- Liu, Y., Huang, Q., Wei, Z., Ma, S., Woodgett, J. R., Li, M. ve Li, J. (2021). GSK-3 mediates nuclear translocation of p62/SQSTM1 in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 763, 136177. doi:10.1016/J.NEULET.2021.136177
- Lu, J., Wu, M. ve Yue, Z. (2020). Autophagy and parkinson's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1207, 21–51. doi:10.1007/978-981-15-4272-5_2/COVER
- Magrinelli, F., Picelli, A., Tocco, P., Federico, A., Roncari, L., Smania, N., ...

- Tamburin, S. (2016). Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. *Parkinson's Disease*, 2016. doi:10.1155/2016/9832839
- Mcdonald, C., Gordon, G., Hand, A., Walker, R. W. ve Fisher, J. M. (2018). 200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson? *Age and Ageing*, 47(2), 209–214. doi:10.1093/AGEING/AFX196
- McKeon, J. E., Sha, D., Li, L. ve Chin, L. S. (2015). Parkin-mediated K63-polyubiquitination targets ubiquitin C-terminal hydrolase L1 for degradation by the autophagy-lysosome system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(9), 1811–1824. doi:10.1007/s00018-014-1781-2
- Mercado, G., Castillo, V., Soto, P. ve Sidhu, A. (2016, 1 Ekim). ER stress and Parkinson's disease: Pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Research*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.042
- Meyer, T., Jahn, N., Lindner, S., Röhner, L., Dolnik, A., Weber, D., ... Krönke, J. (2020). Functional characterization of BRCC3 mutations in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22.1). *Leukemia*, 34(2), 404–415. doi:10.1038/s41375-019-0578-6
- Michel, H. E., Tadros, M. M., Hendy, M. S., Mowaka, S. ve Ayoub, B. M. (2022). Omarigliptin attenuates rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Possible role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and immune modulation. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 113015. doi:10.1016/J.FCT.2022.113015
- Minchev, D., Kazakova, M. ve Sarafian, V. (2022). Neuroinflammation and Autophagy in Parkinson's Disease—Novel Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14997. doi:10.3390/ijms232314997
- Miyazaki, I. ve Asanuma, M. (2020). The Rotenone Models Reproducing Central and Peripheral Features of Parkinson's Disease. *NeuroSci 2020, Vol. 1, Pages 1-14*, 1(1), 1–14. doi:10.3390/NEUROSCI1010001
- Mohamed, A. S., Abdel-Fattah, D. S., Abdel-Aleem, G. A., El-Sheikh, T. F. ve Elbatch, M. M. (2023). Biochemical study of the effect of mesenchymal stem cells-derived exosome versus l-Dopa in experimentally induced Parkinson's disease in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 478(12), 2795–2811. doi:10.1007/S11010-023-04700-8/FIGURES/13
- Moradi Vastegani, S., Khoshnam, S. E., Ghafouri, S., Bakhtiari, N., Farbood, Y. ve

- Sarkaki, A. (2023). Anethole attenuates motor dysfunctions, striatal neuronal activity deficiency and blood brain barrier permeability by decreasing striatal α -synuclein and oxidative stress in rotenone-induced Parkinson's disease of male rats. *PloS one*, 18(11), e0294612. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0294612
- Motawi, T. K., Al-Kady, R. H., Abdelraouf, S. M. ve Senousy, M. A. (2022). Empagliflozin alleviates endoplasmic reticulum stress and augments autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Targeting the GRP78/PERK/eIF2 α /CHOP pathway and miR-211-5p. *Chemico-Biological Interactions*, 362, 110002. doi:10.1016/J.CBI.2022.110002
- Moulahoum, H., Sanli, S., Timur, S. ve Zihnioglu, F. (2019). Potential effect of carnosine encapsulated niosomes in bovine serum albumin modifications. *International journal of biological macromolecules*, 137, 583–591. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.003
- Nechushtai, L., Frenkel, D. ve Pinkas-Kramarski, R. (2023). Autophagy in Parkinson's Disease. *Biomolecules*, 13(10). doi:10.3390/BIOM13101435
- Ni, H., Gong, Y., Yan, J.-Z. ve Zhang, L.-L. (2010). Autophagy inhibitor 3-methyladenine regulates the expression of LC3, Beclin-1 and ZnTs in rat cerebral cortex following recurrent neonatal seizures. *World journal of emergency medicine*, 1(3), 216–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214972> adresinden erişildi.
- Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Khair, S. B. A. ve Haque, M. E. (2015). Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 5499–5510. doi:10.2147/DDDT.S90616
- Olzmann, J. A., Li, A., Chudaev, M. V., Chen, J., Perez, F. A., Palmiter, R. D. ve Chin, L. S. (2007). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *Journal of Cell Biology*, 178(6), 1025–1038. doi:10.1083/jcb.200611128
- Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Matsubara, K. ve Nomura, Y. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress and Parkinson's Disease: The Role of HRD1 in Averting Apoptosis in Neurodegenerative Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. doi:10.1155/2013/239854
- Ostendorf, F., Metzendorf, J., Gold, R., Haghikia, A. ve Tönges, L. (2020). Propionic

- acid and fasudil as treatment against rotenone toxicity in an in vitro model of Parkinson's disease. *Molecules*, 25(11). doi:10.3390/molecules25112502
- Pengnam, S., Patrojanasophon, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Yingyongnarongkul, B. ek, Radchatawedchakoon, W. ve Opanasopit, P. (2019). A novel plier-like gemini cationic niosome for nucleic acid delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 325–333. doi:10.1016/j.jddst.2019.04.032
- Pengnam, S., Plainwong, S., Patrojanasophon, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Radchatawedchakoon, W., ... Opanasopit, P. (2020). Effect of hydrophobic tails of plier-like cationic lipids on nucleic acid delivery and intracellular trafficking. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118798. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118798
- Peshattiwar, V., Muke, S., Kaikini, A., Bagle, S., Dighe, V. ve Sathaye, S. (2020). Mechanistic evaluation of Ursolic acid against rotenone induced Parkinson's disease- emphasizing the role of mitochondrial biogenesis. *Brain research bulletin*, 160, 150–161. doi:10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.03.003
- Pfeiffer, R. F. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 22 Suppl 1, S119–S122. doi:10.1016/J.PARKRELDIS.2015.09.004
- Py, B. F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H. ve Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Molecular Cell*, 49(2), 331–338. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.009
- Radad, K., Rausch, W. D. ve Gille, G. (2006). Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International*, 49(4), 379–386. doi:10.1016/J.NEUINT.2006.02.003
- Rao, Z., Chen, X., Wu, J., Xiao, M., Zhang, J., Wang, B., ... Chen, Y. (2019). Vitamin D Receptor Inhibits NLRP3 Activation by Impeding Its BRCC3-Mediated Deubiquitination. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.02783
- Raza, C., Anjum, R. ve Shakeel, N. ul A. (2019, 1 Haziran). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.lfs.2019.03.057
- Repici, M. ve Giorgini, F. (2019). DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and

- Therapeutic Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1377. doi:10.3390/jcm8091377
- Rizek, P., Kumar, N. ve Jog, M. S. (2016). An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *CMAJ*, 188(16), 1157–1165. doi:10.1503/CMAJ.151179/-/DC1
- Rocha, E. M., De Miranda, B. ve Sanders, L. H. (2018, 1 Ocak). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. Academic Press Inc. doi:10.1016/j.nbd.2017.04.004
- Rocha, S. M., Bantle, C. M., Aboellail, T., Chatterjee, D., Smeyne, R. J. ve Tjalkens, R. B. (2022). Rotenone induces regionally distinct α -synuclein protein aggregation and activation of glia prior to loss of dopaminergic neurons in C57Bl/6 mice. *Neurobiology of disease*, 167, 105685. doi:10.1016/J.NBD.2022.105685
- Ruan, J., Schlüter, D. ve Wang, X. (2020). Deubiquitinating enzymes (DUBs): DoUBle-edged swords in CNS autoimmunity. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 102. doi:10.1186/s12974-020-01783-8
- Shin, W. H., Park, J. H. ve Chung, K. C. (2020). The central regulator p62 between ubiquitin proteasome system and autophagy and its role in the mitophagy and Parkinson's disease. *BMB Reports*, 53(1), 56. doi:10.5483/BMBREP.2020.53.1.283
- Song, J.-X., Lu, J.-H., Liu, L.-F., Chen, L.-L., Durairajan, S. S. K., Yue, Z., ... Li, M. (2014). HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/ α -synuclein overexpression. *Autophagy*, 10(1), 144–154. doi:10.4161/auto.26751
- Stykel, M. G., Humphries, K. M., Kamski-Hennekam, E., Buchner-Duby, B., Porte-Trachsel, N., Ryan, T., ... Ryan, S. D. (2021). α -Synuclein mutation impairs processing of endomembrane compartments and promotes exocytosis and seeding of α -synuclein pathology. *Cell Reports*, 35(6), 109099. doi:10.1016/j.celrep.2021.109099
- Sun, X., Liu, J., Crary, J. F., Malagelada, C., Sulzer, D., Greene, L. A. ve Levy, O. A. (2013). ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of parkin. *Journal of Neuroscience*, 33(6), 2398–2407. doi:10.1523/JNEUROSCI.2292-12.2013

- Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139(S1), 318–324. doi:10.1111/jnc.13691
- Takeda, K., Nagashima, S., Shiiba, I., Uda, A., Tokuyama, T., Ito, N., ... Yanagi, S. (2019). MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE 1 α ubiquitylation at ER –mitochondria contact sites . *The EMBO Journal*, 38(15). doi:10.15252/embj.2018100999
- Tan, J. M. M., Wong, E. S. P., Dawson, V. L., Dawson, T. ve Lim, K.-L. (2008). Lysine 63-linked polyubiquitin potentially partners with p62 to promote the clearance of protein inclusions by autophagy. doi:10.4161/auto.5444
- Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S. ve Iyer, A. (2017). siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials*, 7(4), 77. doi:10.3390/nano7040077
- Thabet, Y., Elsabahy, M. ve Eissa, N. G. (2022). Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods*, 199, 9–15. doi:10.1016/J.YMETH.2021.05.004
- Thirugnanam, T. ve Santhakumar, K. (2022). Chemically induced models of Parkinson's disease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 252, 109213. doi:10.1016/J.CBPC.2021.109213
- Tofaris, G. K., Kim, H. T., Hourez, R., Jung, J. W., Kim, K. P. ve Goldberg, A. L. (2011). Ubiquitin ligase Nedd4 promotes α -synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), 17004–17009. doi:10.1073/pnas.1109356108
- Walden, H. ve Muqit, M. M. K. (2017, 1 Mayıs). Ubiquitin and Parkinson's disease through the looking glass of genetics. *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd. doi:10.1042/BCJ20160498
- Wang, D.-H., Song, W., Wei, S.-W., Zheng, Y.-F., Chen, Z.-S., Han, J.-D., ... Bai, S.-N. (2018). Characterization of the Ubiquitin C-Terminal Hydrolase and Ubiquitin-Specific Protease Families in Rice (*Oryza sativa*). *Frontiers in Plant Science*, 9, 1636. doi:10.3389/fpls.2018.01636
- Weinert, M., Selvakumar, T., Tierney, T. S. ve Alavian, K. N. (2015). Isolation, culture and long-term maintenance of primary mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rodent brains. *Journal of Visualized Experiments*, (96), 52475.

doi:10.3791/52475

- Williams, B. L. ve Lipkin, W. I. (2006). Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration in Rats Neonatally Infected with Borna Disease Virus. *Journal of Virology*, 80(17), 8613–8626. doi:10.1128/jvi.00836-06
- Wrangel, C. von, Schwabe, K., John, N., Krauss, J. K. ve Alam, M. (2015). The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: Behavioral and electrophysiological findings. *Behavioural Brain Research*, 279, 52–61. doi:10.1016/j.bbr.2014.11.002
- Yan, Y. Q., Fang, Y., Zheng, R., Pu, J. L. ve Zhang, B. R. (2020, 15 Ekim). NLRP3 Inflammasomes in Parkinson's disease and their Regulation by Parkin. *Neuroscience*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.08.004
- Yanagi, T., Tachikawa, K., Wilkie-Grantham, R., Hishiki, A., Nagai, K., Toyonaga, E., ... Matsuzawa, S. (2016). Lipid Nanoparticle-mediated siRNA Transfer Against PCTAIRE1/PCTK1/Cdk16 Inhibits In Vivo Cancer Growth. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 5(6), e327. doi:10.1038/mtna.2016.40
- Yang, C., Gao, S., Song, P., Dagnæs-Hansen, F., Jakobsen, M. ve Kjems, J. (2018). Theranostic Niosomes for Efficient siRNA/MicroRNA Delivery and Activatable Near-Infrared Fluorescent Tracking of Stem Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(23), 19494–19503. doi:10.1021/acsami.8b05513
- Ye, H., Robak, L. A., Yu, M., Cykowski, M. ve Shulman, J. M. (2023). Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-034145>, 18, 95–121. doi:10.1146/ANNUREV-PATHMECHDIS-031521-034145
- Youssef, P., Hughes, L., Kim, W. S., Halliday, G. M., Lewis, S. J. G., Cooper, A. ve Dzamko, N. (2023). Evaluation of plasma levels of NFL, GFAP, UCHL1 and tau as Parkinson's disease biomarkers using multiplexed single molecule counting. *Scientific Reports*, 13(1), 5217. doi:10.1038/S41598-023-32480-0
- Zeng, X. S., Geng, W. S. ve Jia, J. J. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*, 10. doi:10.1177/1759091418777438/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1759091418777438-FIG2.JPEG
- Zhang, C., Tang, Y., Li, Y., Xie, L., Zhuang, W., Liu, J. ve Gong, J. (2017). Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial

- ischemia/reperfusion in rats. *PLoS ONE*, 12(6). doi:10.1371/journal.pone.0179042
- Zhang, F. ve Zhou, Q. (2018). Knockdown of BRCC3 exerts an anti-tumor effect on cervical cancer in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 4886–4894. doi:10.3892/mmr.2018.9511
- Zhang, L. ze, Qi, W. hai, Zhao, G., Liu, L. xun, Xue, H., Hu, W. xiu, ... Li, C. sheng. (2019). Correlation between PTEN and P62 gene expression in rat colorectal cancer cell. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(8), 1986–1990. doi:10.1016/j.sjbs.2019.08.006
- Zhang, Q., Chen, S., Yu, S., Qin, J., Zhang, J., Cheng, Q., ... Ding, F. (2016). Neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone injury in primary cultured midbrain neurons and in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 108, 238–251. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2016.04.025
- Zhang, W., Tao, S., Wang, T., Zhang, J., Liu, X., Li, Y., ... Yin, R. (2020). ABRO1 stabilizes the deubiquitinase BRCC3 through inhibiting its degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase WWP2. *FEBS Letters*, 1873-3468.13970. doi:10.1002/1873-3468.13970
- Zhang, X., Linder, S. ve Bazzaro, M. (2020). Drug Development Targeting the Ubiquitin–Proteasome System (UPS) for the Treatment of Human Cancers. *Cancers*, 12(4), 902. doi:10.3390/cancers12040902
- Zidan, A. S. ve Habib, M. J. (2014). Maximized mucoadhesion and skin permeation of anti-AIDS-loaded niosomal gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(3), 952–964. doi:10.1002/jps.23867

Ekler

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2021-041
KONU: Onay

23.06.2021

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda "ROTENON İLE İNDÜKLENEN PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE BRCC3 GEN NAKAVTİNİN OTOFAJİ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU, EÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD.
Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU, EÜ Fen Fak. Biyoloji Bölümü
Doç. Dr. Fatih OLTULU, EÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD.
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI, EÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.
Doç. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL, EÜ Ecz. Fak. Farmasötik Teknoloji AD.
Doç. Dr. Nur Selvi GÜNEL, EÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.
Araş. Gör. Çevik GÜREL, EÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD.
Dok. Öğr. Gökçe Ceren KUŞÇU, EÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD.

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 98 adet erkek ve 2 adet dişi Sprague Dawley sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Oturma katılmadı

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU
Oturma katılmadı

Prof. Dr. Aytül ÖNAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Uğur KAYA (KATILMADI)

Prof. Dr. Okan BİLGE

Doç. Dr. Tayfun YOLDAŞ (KATILMADI)

Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI

Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

Özcan NALBANTOĞLU (KATILMADI)

Melek Merve AFŞAROĞLU (KATILMADI)

Teşekkür

Yüksek Lisans ve Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve birikimyle akademik yaşamıma ışık tutan Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU'na

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında geçirdiğim 9 sene içerisinde akademik anlamda vermiş olduğu desteğin yanı sıra bu süreçte gösterdiği sevecen ve içten tutumu nedeniyle, abim Doç. Dr. Fatih OLTULU'ya

Yine bu dönem içerisinde vermiş oldukları bilimsel ve akademik katkıların yanı sıra, takınmış oldukları anlayışlı tutum ve desteklerinden dolayı anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşegül UYSAL, Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ, Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM ve Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen niozom-siRNA sentezi sırasında vermiş oldukları paha biçilmez destekleri nedeniyle Doktora Öğrencisi Ezgi TUT ve Prof. Dr. Emin İlker MEDİNE'ye

ELISA ve IVIS analizlerinin gerçekleştirilmesi ve yorumlanmasında vermiş oldukları değerli desteklerden dolayı Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU, Doktora Öğrencisi Cem GÜLER ve Ebru ŞANCI'ya

Yüksek Lisans öğrenimimin ilk gününden itibaren sorduğum her soruyu büyük bir içtenlikle cevaplayan ve doktora tezimin *in vitro* kısmında değerli katkılar sunan Doç. Dr. Eda AÇIKGÖZ'e

RT-qPCR analizlerinde vermiş olduğu desteğin yanı sıra doktora öğrenimim boyunca bana katmış olduğu akademik bilgi ve birikim nedeniyle ablam Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya

Doktora eğitimim boyunca bana yapmış olduğu ablalık ve psikolojik mentörlüğün yanı sıra akademik katkıları nedeniyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İlkben GÜNÜŞEN'e

Oluşturdıkları huzurlu çalışma ortamı nedeniyle, mesai arkadaşlarım Uzm. Dr. Aylin GÖKHAN, Dr. Kubilay Doğan KILIÇ, Doktora Öğrencisi Cansın ŞİRİN TOMRUK ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Volkan GÖRGÜLÜ'ye

Hem Yüksek Lisans hem de Doktora öğrenimim sürecinde hep yanımda olan, gerektiği zaman desteklerini bir an olsun benden esirgemeyen can dostum, kardeşim Dr. Aylin BUHUR’a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını TOA-2021-23270 kodlu proje ile destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkürlerimi sunarım.

9 yıllık öğrenim sürecimin her saniyesini birlikte paylaştığımız ve bu öğrenim sürecinin bana kazandırdığı en büyük hediye olan hayat arkadaşım ve can yoldaşım Dr. Gökçe Ceren KUŞÇU’ya bu dönemde karşılaştığımız bütün akademik ve yaşamsal zorluklarda sağladığı dayanma gücü ve gösterdiği sabır için teşekkür ederim.

Yaşama tutunduğumdan bu yana en yakın arkadaşlarım olan Annem Saliç GÜREL ve Babam Hayri GÜREL’e bana kattıkları değerler, her geçen gün katlanarak arttığını gördüğüm sevgileri ve bu güne ulaşmamda şüphesiz en büyük iticici güç olan destekleri için teşekkür ederim.

İzmir, 9.01.2024

Arş. Gör. Çevik GÜREL

Özgeçmiş

Adı Soyadı: Çevik GÜREL

Öğrenim Durumu:

Lisans	Biyoloji Bölümü	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2008-2012
Y. Lisans	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2012-2015
Y.Lisans	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Ege Üniversitesi	2015-2018
Doktora	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Ege Üniversitesi	2018-Devam

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Ankilozan Spondilit Hastalarında Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktörü (MIF) Geninin -173 G>C Polimorfizminin Araştırılması. **Danışman:** Yrd. Doç. Dr. Serbülent YİĞİT

Doksorubisin ile İndüklenen Sıçan Testis Hasarı Modelinde Fluvastatinin Olası Koruyucu ve Tedavi Edici Etkilerinin Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi. **Danışman:** Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Doktora Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Deneyssel Parkinson Hastalığı Modelinde BRCC3 Gen Nakavtının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. **Danışman:** Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Türk Histoloji- Embriyoloji Derneği

ESERLER

A. Makaleler

A1. SCI ve SCI-Expanded kapsamındaki dergilerde yayımlanmış uluslararası makaleler:

A1.1. Tekcan, A., Yigit, S., Rustemoglu, A., **Gurel, C.**, Sahin, S., & Tasliyurt, T. (2013). The investigation of obesity susceptibility with IL-4 gene intron 3 VNTR and IL-6 gene-597G/A polymorphisms in a Turkish population. *International Journal of Human Genetics*, 13(4), 209-213. <https://doi.org/10.1080/09723757.2013.11886219>

A1.2. Gürel, Ç., İnandır, A., Nursal, A. F., Tekcan, A., Rüstemoğlu, A., & Yigit, S. (2016). Evaluation of MIF -173 G/C Polymorphism in Turkish Patients with Ankylosing Spondylitis. *Balkan medical journal*, 33(6), 614–619. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2016.141103>

A1.3. Gurel, C., Inetas, G., Hortu, I., Tunc, E., Kuscü, G. C., Dindaroglu, F. C., Sahin, O., Buhur, A., & Oktem, G. (2019). Cancer and Cancer Stem Cells: New Molecular Perspectives. *Critical reviews in oncogenesis*, 24(1), 99–104. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2019029628>

A1.4. Oltulu, F., Kocatürk, D. Ç., Adalı, Y., Özdil, B., Açıkgoz, E., **Gürel, Ç.**, Karabay Yavasoglu, N. U., & Aktuğ, H. (2019). Autophagy and mTOR pathways in mouse embryonic stem cell, lung cancer and somatic fibroblast cell lines. *Journal of cellular biochemistry*, 120(10), 18066–18076. <https://doi.org/10.1002/jcb.29110>

A1.5. Oltulu, F., Buhur, A., **Gürel, Ç.**, Kuşçu, G. C., Dağdeviren, M., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Köse, T., & Yavaşoğlu, A. (2019). Mid-dose losartan mitigates diabetes-induced hepatic damage by regulating iNOS, eNOS, VEGF, and NF-κB expressions. *Turkish journal of medical sciences*, 49(5), 1582–1589. <https://doi.org/10.3906/sag-1901-15>

A1.6. Gurel, C., Kuscü, G. C., Buhur, A., Dagdeviren, M., Oltulu, F., Karabay Yavasoglu, N. U., & Yavasoglu, A. (2019). Fluvastatin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats by reducing oxidative stress and regulating the blood-

testis barrier via mTOR signaling pathway. *Human & experimental toxicology*, 38(12), 1329–1343. <https://doi.org/10.1177/0960327119862006>

A1.7. Gürel, Ç., Kuşçu, G. C., Yavaşoğlu, A., & Biray Avcı, Ç. (2020). The clues in solving the mystery of major psychosis: The epigenetic basis of schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 113, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.03.005>

A1.8. Yigitturk, G., Erbas, O., Karabay Yavasoglu, N. U., Acikgoz, E., Buhur, A., Gokhan, A., Gürel, C., Gunduz, C., & Yavasoglu, A. (2022). The neuro-restorative effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on a mouse model of diabetic neuropathy. *Neurological research*, 44(2), 156–164. <https://doi.org/10.1080/01616412.2021.1967679>

A1.9. Kuşçu, G. C., Gürel, Ç., Buhur, A., Oltulu, F., Akman, L., Köse, T., Yavaşoğlu, N. Ü. K., & Yavaşoğlu, A. (2022). The regulatory effects of clomiphene and tamoxifen on mTOR and LC3-II expressions in relation to autophagy in experimental polycystic ovary syndrome (PCOS). *Molecular biology reports*, 49(3), 1721–1729. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06981-y>

A1.10. Demir, A., Çamlar, M., Kuşçu, G. C., Gürel, Ç., Oltulu, F., Oren, M., Aldağ, C., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Sandal, E., & Özer, F. (2022). How Safe Is the Use of Intrathecal Vancomycin?. *World neurosurgery*, 160, e55–e60. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2021.12.082>

A1.11. Gunusen, I., Akdemir, A., Gürel, C., Sargin, A., Taskiran, D., Kuscu, G. C., Celik, K., & Karaman, S. (2022). The Effects of Different Pressure Pneumoperitoneum Models Created By Standard or Heated-Humidified CO₂ Insufflation on Ovary and Peritoneum: an Experimental Study in Rats. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 29(4), 1197–1208. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00878-2>

A1.12. Kuşçu, G. C., Gürel, Ç., Buhur, A., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Köse, T., Yavaşoğlu, A., & Oltulu, F. (2023). Fluvastatin alleviates doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in rats via regulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis

associated genes expressions. *Drug and chemical toxicology*, 46(2), 400–411.
<https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2043351>

A1.13. Buhur, A., **Gürel, Ç.**, Kuşçu, G. C., Yiğittürk, G., Oltulu, F., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Uysal, A., & Yavaşoğlu, A. (2023). Is losartan a promising agent for the treatment of type 1 diabetes-induced testicular germ cell apoptosis in rats?. *Molecular biology reports*, 50(3), 2195–2205. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08172-9>

A2. ULAKBİLİM tarafından taranan ulusal hakemli dergilerde yayımlanmış makaleler:

A2.1. **Gürel, Ç.**, Nursal, A. F., & Yiğit, S. (2016). Epigenetik ve kanser. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*, 2(1), 45-51.

A2.2. Oltulu, F., Özdiş, B., **Gürel, Ç.**, Açıkgöz, E., Kocatürk, D. Ç., Adalı, Y., ... & Aktuğ, H. (2018). EMG, MAPK ve inflamasyona yakından bakış: Fare embriyonik kök hücre, somatik ve kanser hücrelerinde ne farklıdır?. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 32(3), 201-212.

A2.3. Köse, C., Vatansever, S., İnan, S., Kırmaz, C., **Gürel, Ç.**, Erişik, D., ... & Özbilgin, K. (2022). Evaluation of JAK/STAT Signaling Pathway-associated Protein Expression at Implantation Period: An Immunohistochemical Study in Rats. *Journal of Tepecik Education & Research Hospital*, 32(1).

B. Bildiriler

B1. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler:

B1.1. Oltulu, F., Kocatürk, D. C., Adalı, Y., Özdiş, B., Açıkgöz, E., **Gürel, C.**, ... & Aktuğ, H. (2017). Compairment of autophagy and mTOR pathways in mouse embryonic stem cell, lung cancer and somatic fibroblast cell lines in molecular analysis base.

B1.2. Oltulu, F., Özdiş, B., **Gürel, C.**, Açıkgöz, E., Kocatürk, D. C., Adalı, Y., ... & Aktuğ, H. (2017). Expressional assessment of mouse embryonic stem cell, lung cancer and somatic fibroblast cell lines on the basis of EMT, MAPK and Inflammation.

B1.3. Oltulu, F., **Gürel, Ç.** (2019). Histochemical and immunohistochemical evaluation of possible protective and therapeutic effects of fluvastatin in doxorubicin-induced rat nephrotoxicity model

B2. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

B2.1. Gürel Ç, Kuşçu GC, Buhur A, Oltulu F, Karabay Yavaşoğlu NÜ, Yiğittürk G, Altuğ Yavaşoğlu A. Doksorubisin ile İndüklenen Sıçan Testis Hasarı Modelinde Fluvastatinin Olası Koruyucu ve Tedavi Edici Etkilerinin Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018, Antalya. **Sözlü Bildiri.**

B2.2. Kuşçu GC, Buhur A, **Gürel Ç,** Oltulu F, Yavasoglu N, Yiğittürk G, Akman L, Yavaşoğlu A. Deneysel Polikistik Over Sendromu (Pkos) Modelinde Tamoksifen ve Klorfenin Ovaryum Dokusu Üzerine Etkilerinin Otofajik Açından Değerlendirilmesi. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya. **Poster.**

B2.3. Buhur A, Yiğittürk G, **Gürel Ç,** Kuşçu GC, Oltulu F, Karabay Yavaşoğlu NÜ, Uysal A, Yavaşoğlu A. Diyabetin neden olduğu testis hasarı üzerine Losartan'ın olası anti-apoptotik etkisinin araştırılması. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya. **Poster.**

C. Araştırma Faaliyetleri

C1. Ulusal Kaynaklı Araştırma Projeleri:

C1.1. Doksorubisin ile indüklenen sıçan nefrotoksisite ve kardiyotoksisite modelinde fluvastatin'in olası koruyucu ve tedavi edici etkilerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Araştırma Fonu. Genel Araştırma Projesi (GAP). 18/TIP/016. **Araştırmacı,** 2020.

C1.2. Rotenon ile İndüklenen Parkinson Hastalığı Modelinde BRCC3 Gen Nakavtının Otofaji ve Endoplazmik Retikulum Stresi Yolakları Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Araştırma Fonu. Çok Disiplinli Öncelikli Alan Araştırma Projesi (ÖNAP). TOA-2021-23270. **Araştırmacı,** Devam ediyor.

C1.3. Sialiltransferaz regülasyonunun meme kanseri gelişimi ve metastatik süreçte etkilerinin incelenmesi. Ege Üniversitesi Araştırma Fonu. Genel Araştırma Projesi (GAP). TGA-2022-23366. **Araştırmacı,** Devam ediyor

C1.4. İmplant Medikal Cihazlar İçin 3b Yazıcıda Basılan, Vücut İçine Yerleştirilen Termoelektrik Güç Üretim Sisteminin Geliştirilmesi. TÜBİTAK 1001 Projesi. 121M532. **Bursiyer,** Devam Ediyor.

C1.5. Akalazya alt tiplerinin etyopatogenezinde yer alan hücresel mekanizmaların incelenmesi. Ege Üniversitesi Araştırma Fonu. Çok Disiplinli Öncelikli Alan Projesi (ÖNAP). TOA 2021-23040. **Araştırmacı,** Devam Ediyor.

C1.6. Streptozotosin ile İndüklenen Deneysel Diyabet Modelinde Endoplazmik Retikulum Stresi İnhibisyonunun Ovaryum Dokusu Üzerine Etkilerinin Araştırılması. TÜBİTAK 1002 A Projesi. 222S309. **Araştırmacı**, Devam Ediyor

C1.7. Deneysel Endometrium Kanseri Modelinde Kemoterapötik Tedaviye Adjuvan Olarak Uygulanan Propofolün Kemorezistans ve Metastaz Yolakları Üzerine Etkilerinin Moleküler ve Histolojik Açıdan İncelenmesi. TÜBİTAK 1001 Projesi. 123S068. **Araştırmacı**, Devam Ediyor

C1.8. Meme Kanseri Tedavisinde Paclitaxel Duyarlılığının Geri Kazanılması İle İlişkili Glutasyon Metabolizması Genlerinin Farklı Gen Düzenleme Teknolojileriyle Terapötik Olarak Hedeflenmeleri. TÜBİTAK 1001 Projesi. 123Z612. **Araştırmacı**, Devam Ediyor

C1.9. Xenograft Over Kanseri Modelinde Kanseri Köklülük Kinaz İnhibitörü Olan Amcasertib'in *in vivo* Anti-tümoral Etkilerinin Araştırılması. TÜSEB A Grubu Araştırma Projesi. 18036. **Araştırmacı**, Devam Ediyor

C1.10. Üçlü Negatif Meme Kanseri Konvansiyonel Tedavisinde Epigenetik Ajan ile Adjuvan İmmünoterapi Kombine Kullanımı: Yeni Nesil İlaç Stratejisinin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Araştırılması. TÜSEB B Grubu Araştırma Projesi. 24430. **Araştırmacı**, Devam Ediyor.

C1.11. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde PCAF Gen Nakavtının Nörodejenerasyonla İlişkili Süreçler Üzerine Etkileri. TÜSEB B Grubu Araştırma Projesi. 22703. **Araştırmacı**, Devam Ediyor.

D. Diğer Faaliyetler

D1. Katıldığı Kurslar:

D1.1. Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (EÜHADYЕК) tarafında düzenlenen “**80 saatlik Deney Hayvanı Kullanımı**” Sertifikası (Mart 2017, İzmir).

D1.2. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı tarafından düzenlenen “**Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu IV. Modül Western Blotting Kullanım Kursu**” Sertifikası (Mayıs 2018, İstanbul).

D1.3. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Dokuz Eylül Üniversitesi Ulusal Klinik Araştırma Altyapı Ağı (TUCRIN) Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından düzenlenen “**Temel Klinik Araştırma (İyi Klinik Uygulama) Eğitimi**” Sertifikası (Nisan 2021, Online).

D2. Katıldığı Toplantılar:

D2.1. Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD tarafından düzenlenen “Türkçe Bilim Dili” çalıştayına katılım (20 Kasım 2015, Manisa).

D2.2. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD tarafından düzenlenen “Gamet Biyolojisi Makale Kulübü 14. Toplantısı’na” katılım (21 Kasım 2015, Manisa).

D2.3. Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD tarafından düzenlenen “XIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi’ne” katılım (30 Nisan-3 Mayıs 2016, İzmir).

D2.4. Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi’nin (İBG) düzenlediği “Metabolism and Cancer Symposium” katılım (10 Mayıs 2016, İzmir).

D2.5. Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Biyoetik Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİYOMER) tarafından gerçekleştirilen “I. Kök Hücre ve Biyoetik Sempozyumu’na” katılım (13 Mayıs 2016, Muğla).

D2.6. “14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi’ne” katılım (10-13 Mayıs 2018, Antalya).

D2.7. Kök Hücre ve Hücresel Tedavi Derneği, Ege Üniversitesi ve Celal Bayar Üniversitesi tarafından düzenlenen “3. Kök Hücre Toplantıları’na” katılım (31 Ekim 2018, İzmir).

D2.8. İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü (İÜGEN) tarafından düzenlenen “18th Molecular Biology and Genetics Winter School” katılım (26-28 Mart 2021, Online).

D2.9. İstanbul Üniversitesi Biyolojik Bilimler Kulübü tarafından düzenlenen “Biyolojinin Hayat Ağacı: Nisan” etkinliğine katılım (10-11 Nisan 2021, Online).

D2.10. Yeditepe Üniversitesi Biyoteknoloji Topluluğu tarafından düzenlenen “8. Ulusal Genetik ve Biyomühendislik Kongresi’ne” katılım (17 Nisan 2021, Online).

D2.11. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi ABANT KÖK Kök Hücre Topluluğu tarafından düzenlenen “1. Kök Hücre Sempozyumu’na” katılım (24 Nisan 2021, Online).

D2.12. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Neocortex Kulübü tarafından düzenlenen “3. Sinirbilim Günleri’ne” katılım (24-25 Nisan 2021, Online).

D2.13. Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Genetik ve Bilim Kulübü tarafından düzenlenen “Biyoteknoloji ve Yapay Zeka Konferansı’na” katılım (24-25 Nisan 2021, Online).

D2.14. Ege Üniversitesi Ege Bilimsel Araştırma Topluluğu EBAT tarafından düzenlenen “Sinirbilim Sempozyumu’na” katılım (24-25 Nisan 2021, Online).

D2.15. Bursa Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Topluluğu Ulugen tarafından düzenlenen “Ulugen Kanser Sempozyumu’na” katılım (1-2 Mayıs 2021, Online).

D2.16. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı AREL tarafından düzenlenen “International Symposium of Cellular Therapies and Cancer: From Lab Bench to Clinic” katılım (19-20 Mayıs 2021, Online).

D2.17. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı AREL tarafından düzenlenen “International Symposium of Cellular Therapies and Regenerative Medicine: From Lab Bench to Clinic” katılım (21-22 Mayıs 2021, Online)