



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**BV-2 MİKROGLİAL HÜCRE HATTINDA FİBRİL FORMDAKİ  
ALFA-SİNÜKLEİN UYGULANMASININ *LRRK2*  
METİLASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Meliha Sümeyye AKAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Fatma Nihan CANKARA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından 8310 nolu proje ile desteklenmektedir**

**ISPARTA – 2022**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/07/2022

Danışman : Doç. Dr. Fatma Nihan CANKARA  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD

Üye : Doç. Dr. Salim Yalçın İNAN  
Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü  
Tıbbi Farmakoloji ABD

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nadire ESER  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü  
Farmakoloji ABD

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY  
Enstitü Müdürü

## **BEYAN**

“BV-2 Mikroglial Hücre Hattında Fibril Formdaki Alfa-Sinüklein Uygulanmasının LRRK2 Metilasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hazırlayan

**Meliha Sümeyye AKAN**

Danışman

**Doç. Dr. Fatma Nihan CANKARA**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ilgisini, bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen, sabırlı, anlayışlı, hoşgörülü yaklaşımıyla beni yüreklendiren, tükenmez enerjisi ile yol gösteren, ufkumu açan, bakış açımı değiştiren, mesai mefhumu gözetmeksizin her an ulaşabilmeme imkan sağlayan, güzel bir çalışma ortamı sunarak laboratuvarın tüm imkanlarını kullanmama izin veren çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Fatma Nihan CANKARA'ya sonsuz saygı, teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım sürecinde gece gündüz demeden tüm sorularımı cevaplayarak çözüm bulan, samimiyeti, yardım severliği ile her zaman yanımda olan, destekleyen ve kendi imkanlarını benimle paylaşan çok kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Zülfinaz Betül ÇELİK ve Dr. Öğr. Üyesi Caner GÜNAYDIN'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarına başlama sürecimde hücre hattı temininde bize yardımcı olan kendi imkanlarını benimle paylaşan Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ ÖZHAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım sürecinde benden yardımını esirgemeyen ve yanımda olan pek kıymetli arkadaşlarım Furkan İlker ÖZBALCI ve Zeynep AKPINAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 8310 nolu proje ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez savunma sınavıma katılan saygı değer jüri üyelerim Doç. Dr. Salim Yalçın İNAN ve Dr. Öğr. Üyesi Nadire ESER'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, teşvik eden, kendimi geliştirmem için her türlü imkanı sunan aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

**Meliha Sümeyye AKAN**

**Isparta - 2022**

## ÖZET

### **BV-2 Mikroglial Hücre Hattında Fibril Formdaki Alfa-Sinüklein Uygulanmasının *LRRK2* Metilasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığının en belirgin patolojik özelliği,  $\alpha$ -sinüklein içeren Lewy cisimciklerinin ve Lewy nöritlerinin intranöral birikiminin eşlik ettiği, substantia nigra pars compacta'daki dopamin üreten nöronların kaybıdır ve buna bağlı gelişen dopamin eksikliğidir.

Parkinson hastalığı sporadik ve ailesel formlarda ortaya çıkar. Ailesel Parkinson hastalığının yaygın olarak *SNCA*, *PINK1* ve *LRRK2* genindeki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Çevresel etkilerin genom düzeyindeki farklılıklara neden olabildiğinin gösterilmesinin ardından epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonunun yaşa bağlı olarak, belli genomik bölgelerde arttığı ya da azalabildiği gözlemlenmiştir. Bu durum Parkinson hastalığının patolojisinin aydınlatılmasında DNA metilasyonu üzerine yapılan çalışmaların önemini artırmıştır. Parkinson hastalığı varlığında *SNCA* genin CpG-2 adalarında hipometilasyon gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasında mikroglial hücre hattı olan BV-2 hücre hattı kullanılmış ve saat kontrollü fibril formdaki  $\alpha$ -sinüklein uygulanarak *in vitro* ortamda Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuştur. 6, 12, 18 ve 24. saatlerin sonunda DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole DNA'lara Bisülfid modifikasyon kiti ile muamele edilmiştir. PCR ile DNA miktarı artırılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde metile olan ve metile olmayan bantlar UV Transilluminatör ile görüntülenmiştir. *LRRK2* promotör bölgesinde kontrole kıyasla hiçbir deney grubunun metilasyonunda değişim gözlemlenmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** Alfa-sinüklein, *LRRK2*, metilasyon, BV-2, mikroglia.

## ABSTRACT

### Investigation of The Effect of Alpha-Synuclein Fibril Administration on LRRK2 Methylation in BV-2 Microglial Cell Line

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. The most prominent pathological feature of Parkinson's disease is the loss of dopamine-producing neurons in the substantia nigra pars compacta, accompanied by intraneural deposition of Lewy bodies and Lewy neurites containing  $\alpha$ -synuclein, and the resulting dopamine deficiency.

Parkinson's disease occurs in sporadic and familial forms. It is known that familial Parkinson's disease is commonly caused by mutations in the *SNCA*, *PINK1* and *LRRK2* genes. After showing that environmental effects can cause differences at the genome level, it has been observed that DNA methylation, one of the epigenetic mechanisms, may increase or decrease in certain genomic regions depending on age. In the presence of Parkinson's disease, hypomethylation has been observed in the CpG-2 islands of the *SNCA* gene.

In this thesis study the microglial cell line BV-2 was used and an in vitro Parkinson's disease model was created by applying  $\alpha$ -synuclein in the form of clock-controlled fibrils. DNA isolation was performed at the end of 6, 12, 18 and 24 hours. In agarose gel electrophoresis, methylated and unmethylated bands were visualized with a UV Transilluminator. No change in methylation was observed in any experimental group compared to the control in the *LRRK2* promoter region.

**Keys Words:** Alpha-synuclein, *LRRK2*, methylation, BV-2, microglia.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Tanım ve Tarihçe.....	3
2.2. Parkinson Hastalığı Klinik Bulguları .....	3
2.3. Parkinson Hastalığı Patofizyolojisi .....	4
2.4. Parkinson Hastalığı ve $\alpha$ -sinüklein İlişkisi.....	6
2.5. Parkinson Hastalığı ve İnflamasyon Arasındaki İlişki .....	8
2.6. Parkinson Hastalığı ve Genetik Etkenler.....	9
2.7. Parkinson Hastalığı ve <i>LRRK2</i> .....	10
2.8. Parkinson Hastalığı ve Metilasyon İlişkisi .....	13
2.9. BV-2 Mikroglial Hücre Hattı .....	15
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
3.1. Gereçler .....	17
3.1.1. Kullanılan Malzemeler .....	17
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	17
3.2. Yöntem .....	18
3.2.1. Hücre Kültürü .....	18
3.2.2. $\alpha$ -sinüklein Oluşumu ve Deney Protokölüne Göre Uygulanması .....	19
3.2.3. DNA İzolasyonu .....	20
3.2.4. Bisülfıt Modifikasyonu .....	20
3.2.5. %2 Jel Agaroz Hazırlama .....	22
3.2.6. PCR.....	22

3.2.7. PCR Yapılmış Numunelerin Agaroz Jele Uygulanması.....	24
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>25</b>
4.1. $\alpha$ -sinüklein Uygulanmış BV-2 Hücre Hatlarından DNA İzolasyon Sonuçları	25
4.2. $\alpha$ -sinüklein Uygulanmış BV-2 Hücre Hatlarından Elde Edilen İzole DNA Örneklerinin Metilasyon Sonuçları .....	27
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>28</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>32</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>44</b>



## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Parkinson Hastalığı ile İlişkili Genler ve Proteinler .....	11
<b>Tablo 3.1.</b> <i>LRRK2</i> Primer Dizilimleri .....	23
<b>Tablo 3.2.</b> Ticari Kitin Önerdiği Master Mix Hazırlama Protokolü.....	24
<b>Tablo 4.1.</b> 6 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucunu nano-drop ölçüm sonuçları .....	25
<b>Tablo 4.2.</b> 12 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucunu nano-drop ölçüm sonuçları .....	25
<b>Tablo 4.4.</b> 24 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucunu nano-drop ölçüm sonuçları .....	26

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Bazal Ganglionlar .....	4
Şekil 2.2. Parkinson Hastalığının Morfolojisi .....	5
Şekil 2.3. Dopaminerjik Sinir Ucunda Dopamin Sentezi ve Metabolizması.....	5
Şekil 2.4. $\alpha$ -sinükleinin Agregasyon Basamakları.....	7
Şekil 2.5. Fizyolojik İşlevleri ve Patolojik Aktiviteleri İle İlişkili $\alpha$ -sinüklein Konformasyonları.....	7
Şekil 2.6. Parkinson Hastalığının Genetik Temelinde Yer Alan Genlerin Risk Değerlendirmeleri.....	10
Şekil 2.7. LRRK2 Proteinin Domainleri, Genomik ve Transkript Seviyesi.....	10
Şekil 2.8. LRRK2 de Tanımlanan Mutasyonlar .....	11
Şekil 2.9. LRRK2 Domainleri ve Etki Eden Mutasyonlar.....	12
Şekil 2.10. LRRK2 Proteinin Kinaz Domaininin Kinaz Aktivitesi.....	12
Şekil 2.11. DNA Metilasyonu (96).....	14
Şekil 3.1. BV-2 Mikroglial Hücrelerinin Mikroskop Görüntüsü.....	19
Şekil 3.2. DNA'dan Hedef Diziyi Amplifiye Etmek İçin PCR'deki Ana Adımların Gösterimi .....	22
Şekil 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarının Agaroz Jel Elektroforezi ile Elde Edilen Metile Olan ve Metile Olmayan Bantların Görüntüleri.....	27

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>3MT</b>	: 3-metoksitriamine
<b>AADD</b>	: Aromatik aminoasit dekarboksilaz
<b>AD</b>	: Aldehit dehidrogenaz
<b>C</b>	: Sitozinin
<b>COMT</b>	: Dopaminin katekol-O-metiltransferaz
<b>DNMT</b>	: DNA metil transferazlar
<b>DOPAC</b>	: 3,4-dihidroksifenilasetik asite
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>G</b>	: Guain
<b>HVA</b>	: 3-metoksi-4-hidroksi-fenilasetik asite
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>L-DOPA</b>	: L-dihidroksifenilalanin
<b>LRRK2</b>	: Lösin bakımından zengin tekrar içeren kinaz 2
<b>MAO</b>	: Monoamin oksidaz
<b>MS PCR</b>	: Metilasyon-spesifik PCR
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponu
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PH</b>	: Parkinson hastalığı
<b>Roc</b>	: Kompleks proteinler için Ras
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SN</b>	: Substantia nigra
<b>SNe</b>	: Substantia nigra pars compacta
<b>TBE</b>	: Tris Borikasit EDTA
<b>TH</b>	: Tirozin hidroksilaz
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktörü- $\alpha$
<b>VMAT2</b>	: Veziküler membran taşıyıcısı 2

# 1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı sporadik ve ailesel formlarda ortaya çıkan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (1). Ailesel tip, Parkinson hastalarının sadece %5-10'unu oluştururken, Parkinson hastalarının büyük çoğunluğu, çok faktörlü bir kökene sahip olan sporadik formda ortaya çıkar (2). Parkinson hastalığında bradikinezi, rijidite, istirahat tremoru ve postural instabilite gibi motor semptomlar ve uyku bozuklukları, demans, duyuşsal anormallikler ve otonomik işlev bozuklukları gibi motor olmayan semptomlar gözlemlenir (3). Patolojik olarak Parkinson hastalığı Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri şeklindeki nöral inklüzyonların eşlik ettiği substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonunun bir sonucudur ve bu da striatumda dopamin seviyesinin düşmesine neden olur (4). Dopamin eksikliğinden kaynaklı hareket gücü ve kabiliyetinde azalma ile birlikte istemsiz hareketler oluşur (5).

Parkinson hastalarının beyinlerinin ölüm sonrası analizi ile Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri, merkezi ve periferik nöronlarda gözlemlenmiş ancak substantia nigra pars compactadaki pigmentli nöronlarda daha yoğun bir şekilde lokalize olduğu görülmüştür (6).  $\alpha$ -sinüklein üretimi ve yıkımı arasındaki denge bozulduğunda, çözünür monomerik  $\alpha$ -sinüklein toplanır ve oligomerlere, ardından amiloid fibrillerine ve son olarak Lewy cisimciğine dönüşür (7).  $\alpha$ -sinüklein, esas olarak presinaptik hücrelerde bulunan, *SNCA* geni tarafından kodlanan 140 aminoasitli bir proteindir (8).

Parkinson hastalığı vakalarının çoğu, ailede hastalık öyküsü olmaksızın sporadiktir. Yeni yapılan çalışmalar ile ulaşılmış sonuçlarda ise hastaların yaklaşık %10'u ve fazlası net bir aile öyküsü gösterir ve *LRRK2*'de oluşan mutasyonlar ailesel Parkinson hastalığının en sık nedenidir (9,10). Ailesel Parkinson hastalığı genetik etiolojisine katkıda bulunan genler, kalıtsal parkinson hastalarında ve ailelerinde konumsal klonlama stratejileri ile tanımlanmıştır (11). *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7* ve *LRRK2* genleri ile Parkinson hastalığı arasında nedensel ilişki için yapılan çalışmalardan tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (12).

Parkinson hastalığının yaş ile birlikte görülme olasılığının artması ve başlangıcından itibaren ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olması nedeniyle yeni

yapılan çalışmalarda epigenetik mekanizmaların incelenmesi gerekli görülmüştür. Bilinen epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve RNA bazlı mekanizmalardır (13). Yapılan bazı çalışmalarda Parkinson hastalığı varlığında *SNCA* geninde hipometilasyon tespit edilmiştir (14,15). *LRRK2* metilasyonunda oluşabilecek değişimlere ise insan lökositlerinde bakılmıştır (16).

Bu tez çalışmasında mikroglial hücre hattı olan BV-2 hücre hattında Parkinson hastalığının temel patolojik bulgularından olan fibril formdaki  $\alpha$ -sinüklein varlığında *LRRK2* metilasyon düzeyinde oluşabilecek değişimlerin *in vitro* ortamda aydınlatılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tanım ve Tarihçe

Parkinson Hastalığı (PH) substantia nigradaki (SN) dopaminerjik nöronların kaybindan kaynaklanan, hipokinetik hareket bozukluğunun öne çıktığı nörodejeneratif bir hastalıktır (17). PH ilk kez 1817'de James Parkinson tarafından paralysis agitans ya da "titreyen inme" olarak tanımlanmıştır (18). Çok daha eski dönemlerde yaklaşık MÖ 1000'den kalma geleneksel Hint metinlerinde ve eski Çin kaynaklarında da PH'a ait benzer tanımlamalar görülmektedir (19,20). PH'nın en eksiksiz patolojik değerlendirmesi ve beyin sapı lezyonlarının net bir şekilde tanımlanması, 1953'te Greenfield ve Bosanquet tarafından yapılmıştır (21,22).

PH, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (23). PH, 65 yaş ve üzeri nüfusun % 2-3'ünü etkilemektedir (24). PH'nın başlangıcı genellikle 65-75 yaş aralığı ve sonrasıdır. Vakaların %5'inden azında 40 yaşından önce başlangıç görülür (25).

PH erken ve geç başlangıçlı olabilir. 40 yaşından önce görülen PH'a 'Erken Başlangıçlı Parkinson' denir. 20 yaşın altında başlayan PH'a ise 'Juvenil Parkinson' denilir. Sporadik olarak adlandırılan vakalar ise ileri yaşlarda başlayan ve ailesel olmayan geç başlangıç gösteren hastalardır. Genlerde oluşan mutasyonların kalıtılması ile oluşan PH ise Ailesel Parkinson olarak isimlendirilir.

### 2.2. Parkinson Hastalığı Klinik Bulguları

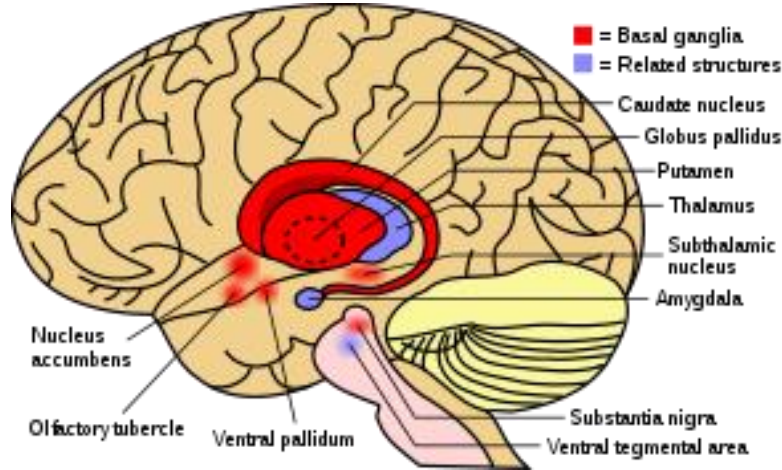
PH yaşa bağlı nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalar motor ve motor olmayan bir dizi semptomlar gösterirler. Motor semptomlar arasında titreme, hareketin yavaşlaması (bradikinezi) ve kaslarda kasılma, hareket edememe (akinezi), uzuvlarda kasılma, tutarsız yürüyüş ve postural instabilite yer almaktadır (26). Hipozmi, depresyon, anksiyete, apati halüsinasyonları, psikoz, demans/bilişsel bozukluk gibi psikiyatrik semptomlar, duyuşal semptomlar, genitoüriner semptomlar (idrara sıklığı, libido azalması, cinsel işlev bozukluğu), gastrointestinal semptomlar (kabızlık, gecikmiş/azalmış mide boşalması, disfaji, siyalore), dizartri, hipofoni,

uyku bozuklukları, kan basıncı değişiklikleri (postural, postprandial), aritmiler gibi kardiyovasküler semptomlar motor olmayan semptomlara örnektir (27).

PH'nin oluşmasına neden olan pek çok faktör bulunmaktadır. Hem çeşitli faktörlere çevresel maruziyetten hem de genetik farklılıklardan kaynaklanan çok yönlü bir hastalık olarak görülmektedir (28). Toksik kimyasallara maruz kalma ve kafa travması PH riskini artırabilirken, fiziksel aktivite gibi belirli yaşam tarzı faktörleri, riski azaltabilir (29,30). PH'nin ilerleyen yaşlarda görülme olasılığı artmaktadır (31).

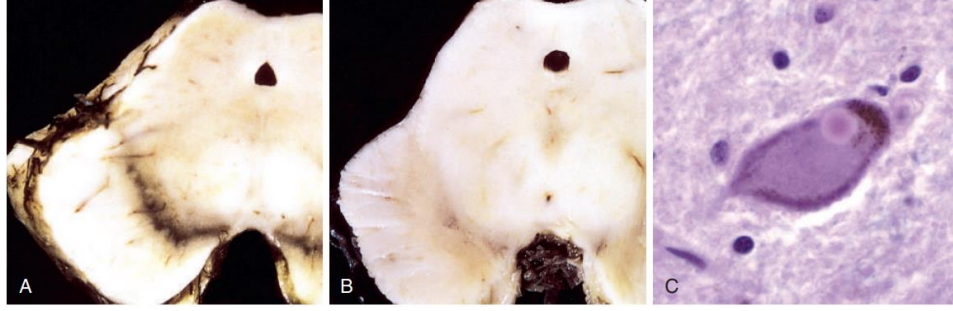
### 2.3. Parkinson Hastalığı Patofizyolojisi

PH, SN'de bulunan dopaminerjik nöronların yavaş ve ilerleyici dejenerasyonu ile karakterizedir (23). SN, Substantia alba içerisine gömülü üç gri bölgeden biri olan bazal ganglionlar arasında yer almaktadır. Bazal ganglionlar klinik ve fonksiyonel yönden beş temel çekirdekte oluşur. Bunlar Şekil 2.1'de kırmızı alanlar ile gösterilen Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Substantia nigra ve Nucleus subtalamicus'tur. Bazal ganglionlar iskelet kaslarının hareketlerinin başlatılmasını, durdurulmasını ve kontrolünü sağlarlar (32).



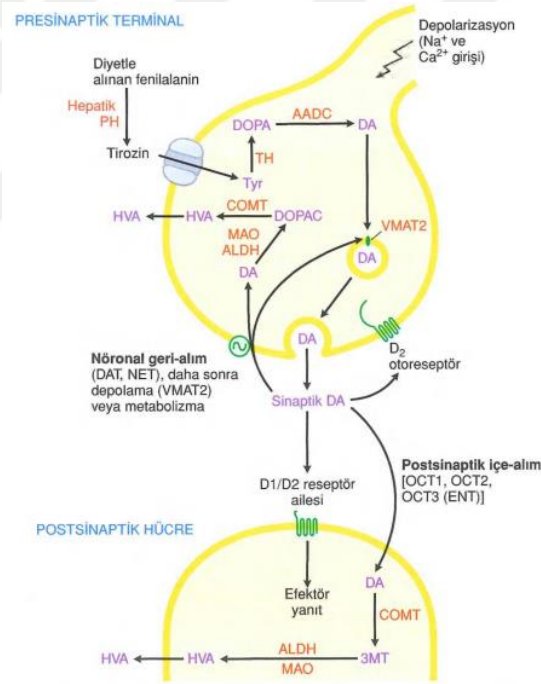
Şekil 2.1. Bazal Ganglionlar (33)

Parkinson Hastalarının otopsilerindeki tipik bulgusu, SN ve lokus seruleusta soluk bir görüntüdür (17). Şekil 2.1'de normal SN (Şekil 2A), idiopatik PH'da pigmentini kaybetmiş SN (Şekil 2B) ve SN nöronlarında histolojik inceleme ile görüntülenen Lewy cismi (Şekil 2C) yer almaktadır.



Şekil 2.2. Parkinson Hastalığının Morfolojisi (17)

PH'nın en belirgin patolojik özelliği,  $\alpha$ -sinüklein içeren Lewy cisimciklerinin ve Lewy nöritlerinin intranöral birikiminin eşlik ettiği, substantia nigra pars compacta'daki (SNc) dopamin üreten nöronların kaybıdır ve buna bağlı gelişen dopamin eksikliğidir (34). Dopamin eksikliğinden kaynaklı hareket gücü ve kabiliyetinde azalma ile birlikte istemsiz hareketler oluşur (5).



Şekil 2.3. Dopaminerjik Sinir Ucunda Dopamin Sentezi ve Metabolizması (18)

Dopaminerjik sinir uçlarında diyetle alınıp nörona taşınmış tirozinden tirozin hidroksilaz (TH) ile L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) oluşur. L-DOPA ise aromatik aminoasit dekarboksilaz (AADD) aracılığı ile dopamin üretilmesine öncülük eder. Dopamin, sinir uçlarında bir veziküler membran taşıyıcısı 2 (VMAT2) ile vezikül içerisine taşınır ve vezikülden sinaptik boşluğa salınımı, presinaptik membrana

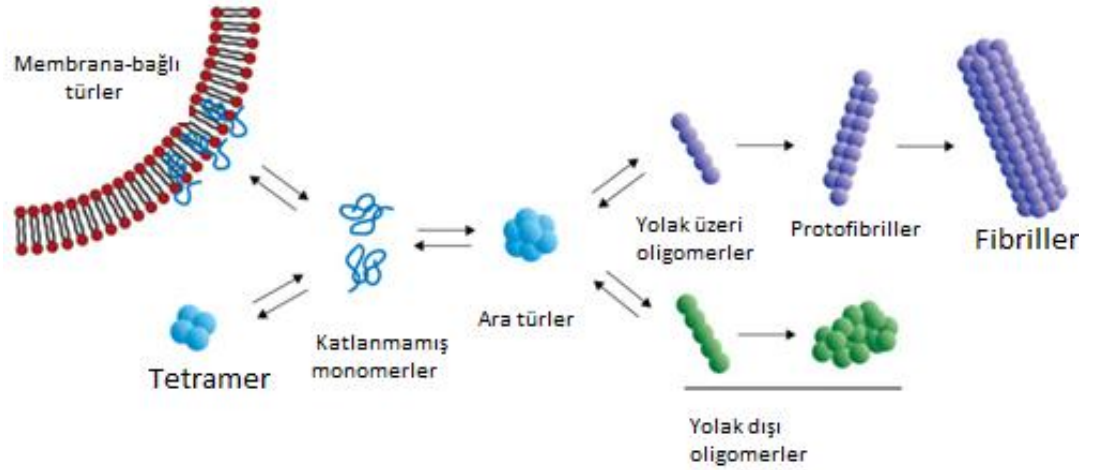
kalsiyum iyonunun ( $Ca^{2+}$ ) girişi ve presinaptik sinir uçlarında depolarizasyon ile olur. Sinaptik aralıktaki dopamin, presinaptik otoreseptörleri ve postsinaptik D1 ve D2 reseptörleri aktive eder. Dopaminin etkisi sinir terminallerinde geri alınarak (depo edilerek veya metabolizma edilerek) veya postsinaptik hücreye alınıp burada metabolize edilerek sonlanır. Postsinaptik hücrede metabolizma sırasıyla dopaminin katekol-O-metiltransferaz (COMT) ile 3-metoksitriamine (3MT) dönüşmesi, 3MT'nin monoamin oksidaz (MAO) ve aldehit dehidrogenaz (AD) ile 3-metoksi-4-hidroksi-fenilasetik asite (HVA) dönüşmesi ile sonlanır. HVA insanda dopaminin ana metabolitidir. Presinaptik hücreye geri alınan dopamin MAO ve AD ile 3,4-dihidroksifenilasetik asite (DOPAC) dönüştürülür. Sonrasında DOPAC, COMT ile HVA'ye metabolize edilir (Şekil 2.3) (35).

Parkinson hastalığının tedavisinde replasman tedavisi ilk tercih edilen yöntemdir ve bu amaçla levodopa kullanılır. Levodopa tedavisine alternatif olarak dopamin reseptör agonistleri, COMT inhibitörleri, seçici MAO-B inhibitörleri ve muskarinik reseptör antagonistleri kullanılabilir (18).

#### **2.4. Parkinson Hastalığı ve $\alpha$ -sinüklein İlişkisi**

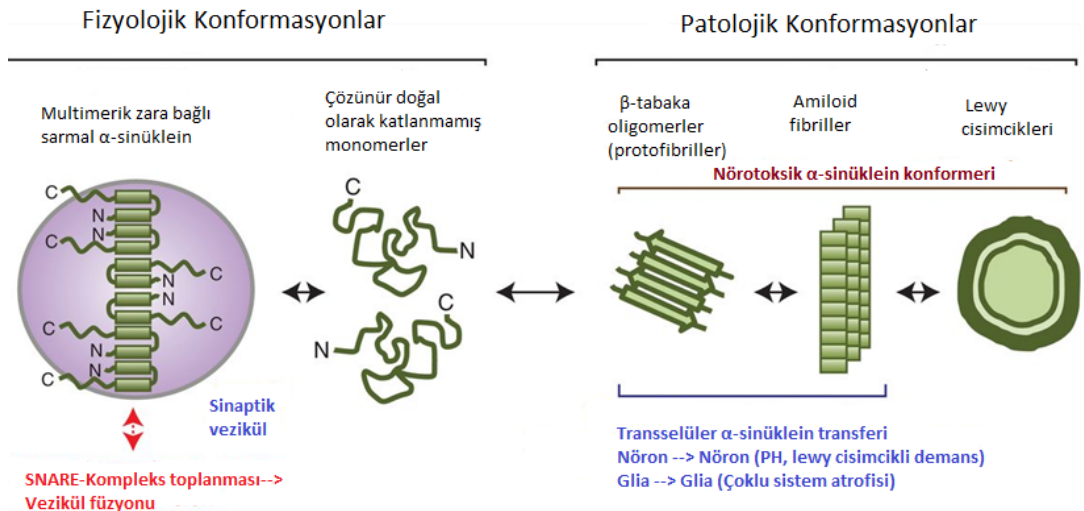
Striatal dopamin eksikliğine neden olan SN'deki nöronal kayıp ve  $\alpha$ -sinüklein kümeleri içeren hücre içi inklüzyonlar, PH'nin nöropatolojik özellikleridir (24).  $\alpha$ -sinüklein, esas olarak presinaptik hücrelerde bulunan, SNCA geni tarafından kodlanan 140 aminoasitli bir proteindir (8). Çözünür sitozolik  $\alpha$ -sinüklein, yapılandırılmamış ve doğal olarak katlanmamış bir proteindir (36).

Çözünür  $\alpha$ -sinüklein, vezikül oluşumu gibi sinaptik membranların çeşitli süreçlerinin ve özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynar (37).  $\alpha$ -sinüklein, SNARE ailesinin üyeleri ile etkileşimler yoluyla nörotransmitter salınımının kontrolüne katıldığı bildirilmektedir (38). Yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -sinüklein yokluğunda dopamin miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum dopamin biyosentezinin ve işlenmesinin düzenleyicisi olarak  $\alpha$ -sinükleinin potansiyel rolüne dikkat çekmektedir (39–41).  $\alpha$ -sinüklein nükleusta lokalizedir (42), bu durum gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 2.4.**  $\alpha$ -sinükleinin Agregasyon Basamakları (43)

Normal koşullar altında,  $\alpha$ -sinüklein, fizyolojik işlevleri yerine getirmek için lipid membrana bağlanabilir veya anormal agregasyon oluşumuna dirençli  $\alpha$ -sarmal yapıya sahip bir tetramer oluşturabilir. Anormal kümelenme sürecinde bazı monomerler, sonunda fibrillere dönüşebilen oligomerler oluşturabilmektedir. Fibrillere dönüşmeyen oligomerler de oluşabilir. Şekil 4'te anormal agregasyon oluşumuna dirençli tetramer oluşumu ve agregasyon basamakları şematize edilmiştir (43).



**Şekil 2.5.** Fizyolojik İşlevleri ve Patolojik Aktiviteleri İle İlişkili  $\alpha$ -sinüklein Konformasyonları (44)

Çözünür  $\alpha$ -sinüklein doğal olarak katlanmamış ve monomerik bir proteindir (45). Sinaptik veziküller gibi oldukça kavisli zarlara bağlandıktan sonra,  $\alpha$ -sinüklein konformasyonel bir değişikliğe uğrar, multimerizasyon ile ilişkili olan ve onun

SNARE-kompleks şaperon işlevine aracılık eden bir amfipatik sarmal halinde katlanır (44). Patolojik koşullar altında, çözünür  $\alpha$ -sinüklein, amiloid fibrillerine dönüşen ve sonunda Lewy cisimcikleri şeklinde biriken tabaka benzeri oligomerler (protofibriller) oluşturur (Şekil 2.5) (44).

Ailesel parkinsona neden olan mutasyonlardan (A53T ve A30P) dolayı yanlış katlanan  $\alpha$ -sinükleinler lizozom lümenine bağlanır ancak lizozom içerisine alınamazlar. Yüksek afinite ile bağlanıp daha zor ayrıldıkları için lizozomlara girip parçalanamamışlardır (46).  $\alpha$ -sinükleinin parçalanmasının engellendiğinden dolayı  $\alpha$ -sinüklein birikimi olur.  $\alpha$ -sinüklein üretimi ve yıkımı arasındaki denge bozulduğunda, çözünür monomerik  $\alpha$ -sinüklein toplanır ve oligomere, ardından amiloid fibrillerine ve son olarak Lewy cisimciğine dönüşür (7).

Lewy cisimciklerinin ve Lewy nöritlerinin ana bileşeni, çözünmeyen  $\alpha$ -sinüklein fibrilleridir (47). Parkinson hastalarının beyinlerinin ölüm sonrası analizi ile Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri, merkezi ve periferik nöronlarda gözlemlenmiş ancak SNc'deki pigmentli nöronlarda daha yoğun bir şekilde lokalize olduğu görülmüştür (6). Kümelenmiş  $\alpha$ -sinükleinin *in vitro* ve *in vivo* olarak mikroglia, astrosit ve insan monositlerinde inflamatuvar reaksiyonları indüklediği gözlemlenmiştir (48,49).

## 2.5. Parkinson Hastalığı ve İnflamasyon Arasındaki İlişki

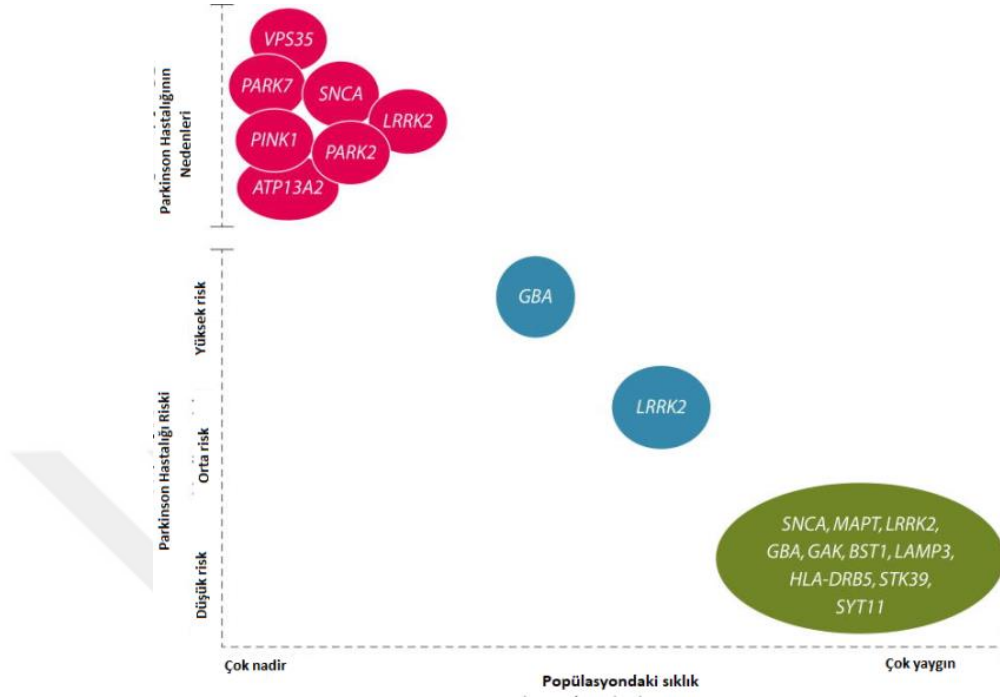
İnflamasyon virüsler, bakteriyel enfeksiyonlar, toksinler, toksik bileşikler, doku hasarı gibi çeşitli zararlı uyaranların neden olduğu önemli bir biyolojik cevaptır. İnflamasyon sırasında inflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri üretilir. İnflamatuvar sitokinler, hedef hücrelerin plazma membranında bulunan çeşitli reseptörler üzerinde etki ederek inflamatuvar süreci başlatır ve sonlandırır (50). Nöroinflamasyon genellikle, enfeksiyon, travma, iskemi ve toksinler dahil olmak üzere çeşitli patolojik etkenlerin neden olabileceği merkezi sinir sistemi içindeki bir inflamatuvar yanıtı ifade eder (51). Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olan mikroglia ve astrositler, nöroinflamatuvar sürece öncelikli olarak dahil olurlar ve proinflamatuvar mediyatörlerin salınımını gerçekleştirirler (52). Lewy cisimciklerinde bulunan kümelenmiş  $\alpha$ -sinükleinin, mikroglial aktivasyonu indükleyerek dopaminerjik nöronların ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir (48,53). Aktive olmuş mikroglial

hücreler tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), süperoksit, nitrik oksit (NO), reaktif oksijen türleri (ROS) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile inflamatuvar süreci başlatırlar (54).  $\alpha$ -sinüklein tarafından aktive edilmiş mikroglia hücrelerinin reaktif oksijen türlerini aşırı ifadesi sonucunda nörodejenerasyonu şiddetlendiren oksidatif strese yol açtığı düşünülmektedir (55,56). Bir çalışmada hücre dışı  $\alpha$ -sinüklein varlığının reaktif oksijen kaynağı olan mikroglial nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz aktivasyonunu ve mikroglial P2X7R reseptörleri yoluyla reaktif oksijen türlerinin üretimini desteklediği gözlemlenmiştir (56). Mikroglial aktivasyonun nöronal hasara önemli ölçüde katkıda bulunduğu ve PH sürecini de hızlandırdığı genel olarak kabul edilmektedir (57–59).  $\alpha$ -sinüklein varlığının mikroglial hücreleri aktive ettiği basamaklar tam olarak bilinmediği için yeni araştırmalar mikroglial aktivasyon üzerine yoğunlaşmaktadır.

## 2.6. Parkinson Hastalığı ve Genetik Etkenler

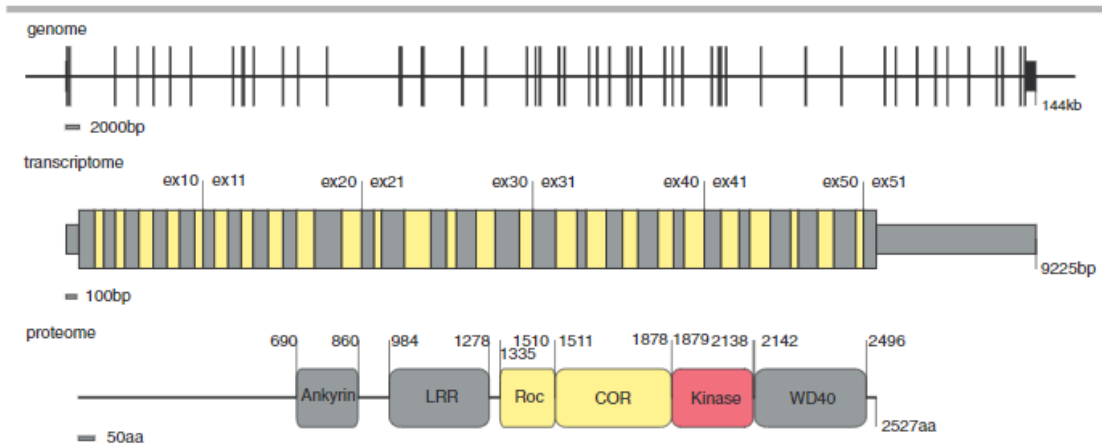
Her ne kadar PH ilk olarak sporadik bir hastalık olarak kabul edilmiş olsa da daha sonra yapılan çalışmalar hastalığın özellikle *SNCA*, *PINK1* ve en sık görülen *LRRK2* genindeki mutasyonlarla ortaya çıkabildiğini göstermiştir (60). Parkinson hastalarının %15-20'sinin ailesinde net bir şekilde Parkinson ile ilgili bulgular gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak hastalığın karmaşık bir etiyojisi olduğu kanısına varılmış, hastalığın hem çevresel faktörlerden hem de genetik faktörlerden etkilendiği düşünülmüştür (60). Ailesel PH'nin bir dizi gendeki mutasyonların sonucu olduğu bildirilmiştir. *Parkin*, *PINK1* ve *LRRK2*'deki mutasyonların tümü, erken başlangıçlı ailesel parkinson ile ilişkilidir (61). Ailesel PH'nin genetik etiyojisine katkıda bulunan genler, kalıtsal parkinson hastalarında ve ailelerinde konumsal klonlama stratejileri ile tanımlanmıştır (11). *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7* ve *LRRK2* genleri ile PH arasında nedensel ilişki için yapılan çalışmalardan tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (12). Sporadik olduğu düşünülen vakalarda görülen ve *LRRK2* G2019S mutasyonunun var olma olasılığı 50 yaşında %15 iken 75 yaşında %85'e yükselmiştir (62). Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları *LRRK2*'de gerçekleşebilecek mutasyonların sporadik PH riskini arttırdığı sonucuna varılmıştır (63–65). Bu zamana kadar bilinen gen mutasyonlarının çoğu, hastalığın erken ortaya çıkmasına veya genç yaşta başlangıcına sebep olurken, *LRRK2* mutasyonlarının, hem

linik hem de demografik özellikler açısından sporadik PH'a benzeyen parkinsona neden olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 2.6) (66).



**Şekil 2.6.** Parkinson Hastalığının Genetik Temelinde Yer Alan Genlerin Risk Değerlendirmeleri (67)

## 2.7. Parkinson Hastalığı ve *LRRK2*



**Şekil 2.7.** LRRK2 Proteininin Domainleri, Genomik ve Transkript Seviyesi (60)

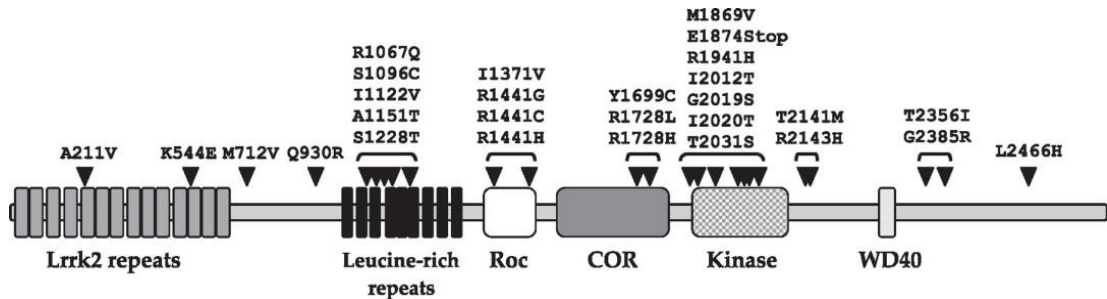
Lösin bakımından zengin tekrar içeren kinaz 2 (*LRRK2*), ROCO ailesi proteinlerinden yaklaşık 280 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. ROCO protein ailesi 200-250 aminoasitlik Roc (Kompleks proteinler için Ras) olarak adlandırılan

bir domain içeren hemen ardından COR (Roc'un C-terminali) olarak adlandırılan bir 300-400 aminoasitlik domainin geldiği proteinler grubudur (68). Birbirlerine bağımlı ve ayrılmaz Roc ve COR domainlerini genellikle bir kinaz domaini takip eder (69). LRRK2'nin oluşturduğu genomik bölge 51 ekzon ile yaklaşık 144 kilobaz içeren büyük bir bölgedir. Bu gen LRRK2 olarak adlandırılan 2527 amino asitli 286 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlar (70). LRRK2 birden fazla protein etkileşim alanları bulunan fonksiyonel GTPaz ve kinaz alanları yer alan büyük bir proteindir (71). Yapısal olarak armadillo, ankyrin, LRR, RoCCOR, kinase ve WD40 domainlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.7) (72).

Parkinson vakalarının çoğu sporadik olmakla birlikte, vakaların %5-15'i genetik değişime bağlıdır. PH'in genetik patogenezinin anlaşılmasında büyük bir gelişme, PARK1-11 olarak adlandırılan Tablo 2.1'de gösterilen 10 kromozomal bölgenin haritalanması ve ardından yedi tanesinin klonlanması olmuştur (70).

**Tablo 2.1.** Parkinson Hastalığı ile İlişkili Genler ve Proteinler

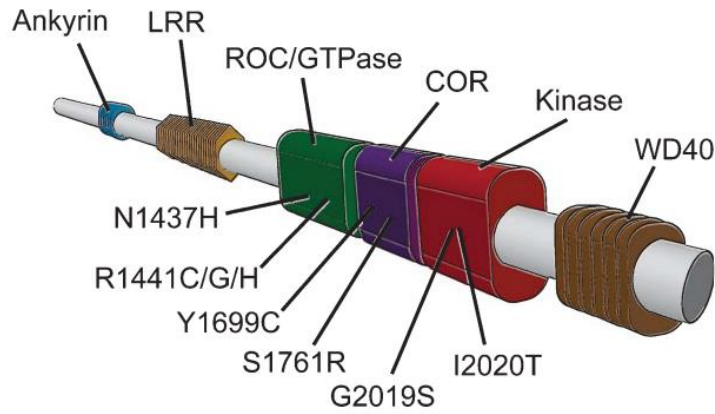
Gen Bölgesi	Protein İsmi
PARK1/4	$\alpha$ -sinüklein
PARK2	Parkin
PARK5	UCH-L1
PARK 6	PINK1
PARK 7	DJ-1
PARK8	LRRK2
PARK11	GIGYF2



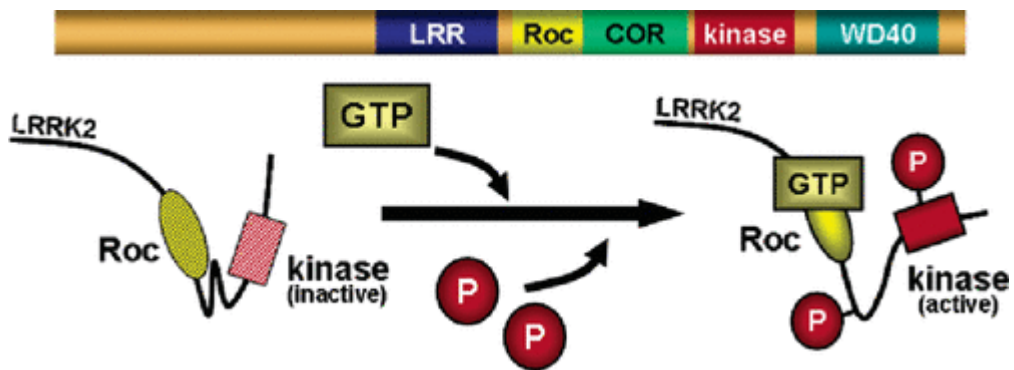
**Şekil 2.8.** LRRK2 de Tanımlanan Mutasyonlar (72), (73)

PARK8 kromozal bölgesi 2002 yılında Japon bir ailede yapılan genom çapında bağlantı analizi ile keşfedilmiştir (74). Ailesel ve görünüşte sporadik Parkinson'lu hastalarla yapılan çalışmalar sonucunda birden fazla genetik mutasyon tespit edilmiştir (74–77). Yetmiş beşten fazla *LRRK2* mutasyonu tespit edilmiştir, ancak hepsi parkinson hastalığı oluşma riskine aynı ölçüde katkıda bulunmaz. p.R1441C, p.R1441G, p.Y1699C, p.G2019S ve p.I2020T ve p.R1628P ve p.G2385R noktalarındaki mutasyonlar patolojik birer risk olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.8) (78).

*LRRK2* geninde p.G2019S noktasında görülen mutasyon, en sık görülen patojenik mutasyon olarak bilinmektedir ve Şekil 2.9'da kırmızı olarak gösterilmiş kinaz alanını doğrudan etkilemektedir (76).



Şekil 2.9. LRRK2 Domainleri ve Etki Eden Mutasyonlar (72)



Şekil 2.10. LRRK2 Proteininin Kinaz Domaininin Kinaz Aktivitesi (79)

Genetik mutasyonla aktarılan türleri arasında kinaz bölgesinde görülen mutasyonlar büyük çoğunluğu oluşturmakta ve kinaz aktivitesinin artmasının patolojik bir sebep olarak kabul edilmesine neden olmaktadır (Şekil 2.10) (36).

LRRK2'nin hücre içerisinde veziküler transport, endositoz ve mitokondri-endoplazmik retikulum iletişimde rol oynadığı ve özellikle  $\alpha$ -sinüklein ile birlikte etkileşiminin hastalığın patolojisindeki temel nedenlerinden biri olduğu kabul edilmektedir (80). LRRK2'nin özellikle mikroglia ve periferel makrofajlar gibi immün hücrelerde inflamasyona bağlı olarak düzeylerinin arttığına gösterilmesi, LRRK2'nin ayrıca immün bir eleman olarak da rol oynadığını göstermektedir. Her ne kadar LRRK2'nin aktivasyon mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da günümüzde etkileşimde olduğu substratları olan Rab proteinleriyle hücrenin veziküler trafiğini kontrol ettiğini ve bu kontrolün bozulmasının PH ve deneysel Parkinson modellerinde ortaya çıkması LRRK2 kinaz inhibitörlerinin araştırılmasının önünü açmıştır (81). Rab GTPaz'lar, neredeyse tüm membran ve veziküler trafik süreçlerinde çok yönlü düzenleyiciler olarak hizmet ederler (82,83). LRRK2 ile birçok Rab ailesi üyesi arasında fiziksel, genetik ve fonksiyonel etkileşimler bildirilmiştir (83,84). LRRK2 Rab8a, Rab10 ve Rab29 dahil olmak üzere 16 Rab proteinini fosforile eder. Fosforilasyon, Rab'ın Rab-GDP ayrışma inhibitörlerine bağlanmasını bozarak zarlarda Rab birikmesine neden olur (85,86). Rab29 bir LRRK2 kinaz substratıdır. Yapılan bir çalışmada Rab29'un aşırı ekspresyonunun, LRRK2 kinaz aktivitesini uyararak fosforilasyonu arttırdığı sonucuna varılmıştır (87).

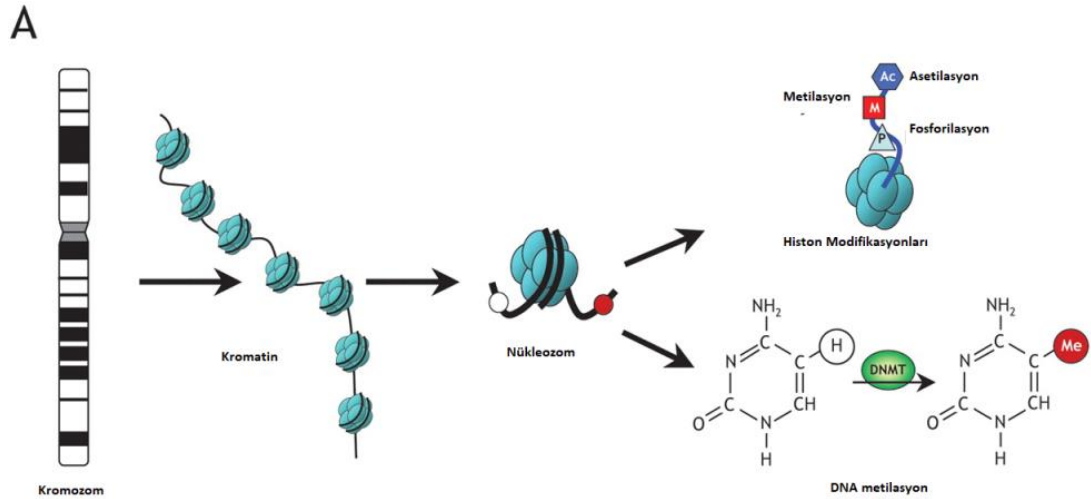
## **2.8. Parkinson Hastalığı ve Metilasyon İlişkisi**

Epigenetik modülasyon prenatal dönemde başlayan, hayat boyu devam eden, yaşam tarzı, çevresel etkenler ve genetik yapıyla birlikte PH için risk faktörleri oluşturabileceği düşünülen önemli bir etkidir. Çevresel etkilerin genom düzeyindeki farklılıklara neden olabildiğinin gösterilmesinin ardından epigenetik mekanizmaların PH'ın patolojisindeki rolü önem kazanmıştır. Özellikle PH'ın her ne kadar klinik semptomları dopaminerjik nöronların yüzde 70'inin kaybı sonrası belirginleşmeye başlasa da patolojinin yaklaşık 20 yıl önce başladığı hipotezi epigenetik bir süreç olarak değerlendirilmesi düşüncesini desteklemektedir. Fenotipin gelişimini ve oluşumunu büyük ölçüde etkileyen birbiriyle ilişkili ve karmaşık üç farklı epigenetik düzenleme mekanizması bulunmaktadır. Bu epigenetik

mekanizmlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve RNA bazlı mekanizmalardır (13).

DNA metilasyonu yüksek oranda korunmuş bir süreçtir ve bu süreç DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından katalize edilir (88). Memelilerde bilinen DNMT1, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B olarak ifade edilen DNA metiltransferazlar bulunmaktadır (89). Memeli hücrelerinde en fazla bulunan metil transferaz DNMT1'dir. Somatik hücrelerde metilasyonun sürdürülmesinde DNMT1'in kilit bir rolü olduğu bildirilmiş ve bu enzimin kaybının nükleer düzensizliğe, artan histon asetilasyonuna ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (90–93).

Metilasyon, Guinden (G) önce gelen sitozinin (C) beşinci karbonuna bir metil grubunun kovalent modifikasyon işlemidir (Şekil 2.11). DNA metilasyonu CpG adaları ve CpG adalarının (~ 2 kb) yakınında bulunan bölgelere özgüdür (13). Sitozinlerin, guaninlerden önce gelmesi ile oluşan CpG adacıklarının, genellikle genlerin promotor bölgelerinde yerleşim göstermekte olduğu gözlemlenmiştir (94). DNA metilasyonu çeşitli genlerin ekspresyonlarında gerçekleşecek değişiklikleri düzenleyebilmektedir (95).



Şekil 2.11. DNA Metilasyonu (96)

DNA metilasyon düzeyi artan yaş ile birlikte değişkenlik göstermektedir. Yaşa bağlı olarak, belli genomik bölgelerdeki metilasyonun arttığı ya da azalabildiği gözlemlenmiştir. Parkinson gibi yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların

ilerlemesinde, DNA metilasyonunun önemli bir role sahip olduğu düşünülmüştür (88,97).

*SNCA* noktası mutasyonlarının yanı sıra gen çoğalmaları ve aşırı ekspresyonun, Lewy cisimciklerinin oluşumunda nedensel bir rol oynadığı düşünülmektedir (98,99). *SNCA* gen miktarının Parkinson hastalığının gelişimi için kritik bir öneme sahip olduğu, *SNCA*'nın nöronal ekspresyonuna sahip fare modellerinin Parkinson hastalığı benzeri dopaminerjik nöron kaybı, protein agregatlarının oluşumu ve motor bozuklukların ortaya çıkarması ile desteklenmiştir (99,100). Genetik mutasyonlara ek olarak, *SNCA* lokus amplifikasyonlarının (duplikasyonlar, triplikasyonlar) ailesel Parkinson hastalığına neden olduğu bulunmuştur (101,102). Gen miktarı sadece gen amplifikasyonu ile değil, aynı zamanda gen regülasyonu ile de değiştirilebildiğinden, DNA metilasyonu, Parkinson hastalığında *SNCA*'nın deregülasyonunda yer alabilecek potansiyel bir mekanizma olarak kabul edilmiştir (103). Hem ölüm sonrası korteks hem de periferik kan örneklerinde *SNCA*'nın promotör bölgesinde hipometilasyon tespit edilmiştir (14,15). Yaşa bağlı olarak, belli genomik bölgelerdeki metilasyonun değişkenlik göstermesi PH için risk faktörü olarak kabul edilen diğer gen bölgelerinde metilasyon düzeylerinin araştırılmasının önünü açmıştır.

## **2.9. BV-2 Mikroglial Hücre Hattı**

Mikroglia hücreleri merkezi sinir sistemindeki yerleşik makrofajlardır. Mikroglia hücrelerinin gelişimi, erken mikroglia, premikroglia ve yetişkin mikroglia olmak üzere üç gelişim aşamasında tamamlanmaktadır (104). BV-2, C57/BL6 murin'den türetilen bir tür mikroglial hücredir. Diğer mikroglialar gibi, BV-2 de oksidatif stres veya inflamatuvar faktörler tarafından proinflamatuvar sitokinleri salgılamak için aktive edilebilir (105).

Mikroglialar, içinde bulunduğu ortama göre farklı transkripsiyonel düzenleyiciler sayesinde farklı fonksiyonel fenotipler gösteren hücrelerdir. Proinflamatuvar mikroglialar proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu sağlarlar. Mikrogliaların proinflamatuvar özellik kazanması, IRF7, RELA, STAT1/3 ve FosB gibi farklı transkripsiyonel aileler tarafından düzenlenir (104).

Periferde meydana gelen inflamatuvar olaylar, mikroglialar ile iletişim kurabilir, hücrelerin aktivasyon durumlarını değiştirebilir, nöroinflamasyona yol açabilir veya katkıda bulunabilir (106). Nöroinflamasyon, beyinde substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların duyarlı olduğu sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olur (107). Mikroglia yoğunluğu ve mikroglia aktivasyonunun derecesi beyin bölgeleri arasında farklılık gösterir. Bu tür farklılıklar, nörodejeneratif hastalıkların beyin bölgesine özgü özelliklerinin altında yatabilir. Mikroglialar en yüksek yoğunluğu kortekste gösterir ardından limbik alan ve bazal çekirdekler gelir bunu diğer beyin bölgeleri takip etmektedir. Mikrogliaların substantia nigra'da yoğun olarak bulunmasından dolayı, nöroinflamatuvar etkiler substantia nigra'da daha belirgin gözlemlenebilir (57). Beyinde mikroglia aktivasyonunun indüklenmesi ile oluşan nöroinflamatuvar ortam, substantia nigra'daki dopaminerjik nöronları etkileyerek nörodejenerasyona katkıda bulunur (108).

*LRRK2*'nin nöroinflamasyondaki işlevini açıklamaya yönelik çabaların çoğu beyindeki bağışıklık sistemi hücreleri olan mikroglialara odaklanmıştır (108). Mikroglia *LRRK2* ekspresyonunun veya aktivitesinin azaltılmasının, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  veya IL-10 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azalttığı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (109–111). *LRRK2*'de gerçekleşen ve en yaygın görülen G2019S veya R1441G mutasyonları, *LRRK2* aktivitesini artırarak mikrogliaları daha proinflamatuvar bir fenotipe kaydırıldığı bildirilmiştir (112–115). Birlikte ele alındığında, patojenik *LRRK2* mutasyonları, kronik inflamatuvar hastalıklar veya akut enfeksiyonlar gibi inflamatuvar durumlar sırasında, bağışıklık cevabını şiddetlendiriyor gibi görünmektedir, bu da PH gelişme olasılığını artırabilmektedir (108). Bahsedilen mekanizmalar nedeni ile BV-2 mikroglia primer hücre hattı nörodejeneratif hastalıkların araştırılmasında yaygın bir alternatif model olarak kullanılmaktadır (105).

## 3. GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Gereçler

#### 3.1.1. Kullanılan Malzemeler

- ✓ 12 Kuyucuklu Hücre Kültürü Plate
- ✓ Agaroz
- ✓ DNA Bisülfid Modifikasyon Kit (Thermo Scientific™)
- ✓ DMEM High Glucose with L-Glutamine (Diagnovum)
- ✓ DNA İzolasyon Kiti (NucleoSpin Tissue)
- ✓ DNA Jel Yükleme Boyası (Thermo Scientific™)
- ✓ DNA Ladder (Thermo GeneRuler™)
- ✓ DNA Polimeraz Kit (A.B.T.™ Taq)
- ✓ Fetal Bovine Serum (PAN™ Biotech)
- ✓ Hücre Kültür Flaskı (Nest)
- ✓ Penisilin-Streptomisin (Diagnovum)
- ✓ Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Diagnovum)
- ✓ TBE (Tris Borikasit EDTA)
- ✓ Trypsin-EDTA (Diagnovum)
- ✓  $\alpha$ -sinüklein (rPeptide S-1001-2)

#### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- ✓ Agaroz Jel Elektroforezi (Bio Rad)
- ✓ CO<sub>2</sub> Inkübatörü (N-Biotec)
- ✓ Kuru Isı Bloğu (Inovia)
- ✓ Biyogüvenlik Kabini (Sınıf II)
- ✓ Ters Mikroskop (Zeiss Primovent)

- ✓ Thermal Cyclers (Bio Rad)
- ✓ Ultra Santrifüj (Beckman Coulter Allegra 64R )
- ✓ Masaüstü Santrifüj (Eppendorf )
- ✓ Sıvı azot tankı
- ✓ Su banyosu (N-Biotek)
- ✓ Vakum Aspirasyon Sistemi (Scilogex)
- ✓ Vorteks

## **3.2. Yöntem**

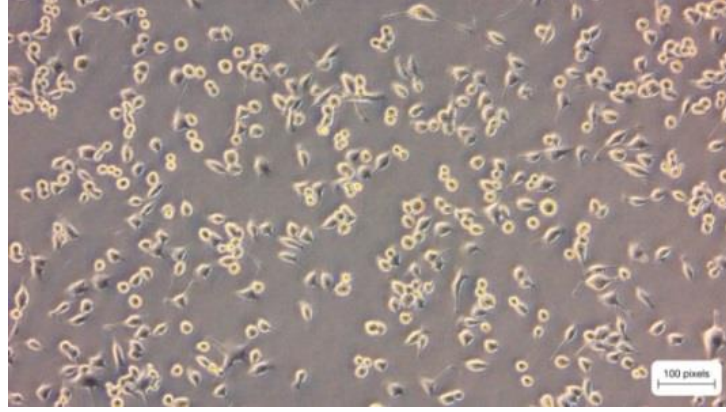
### **3.2.1. Hücre Kültürü**

BV-2 mikroglial hücre hattı Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ ÖZHAN tarafından başıslanmıştır. -80°C'de kriyo vial içerisinde teslim alınan BV-2 mikroglial hücre hattı çalışmanın başlangıcına kadar azot tankında muhafaza edildi. Hücre kültür çalışmasının başlangıcında 500 ml DMEM içine %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek vasat hazırlandı.

Azot tankından alınan BV-2 hücre hattı 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür flaskında kültüre edildi. 37°C deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. %70-80 yoğunluk oluşana kadar vasat değişimi yapılarak CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.

Yeterli doluluğa ulaşılnca BV-2 hücre hattını pasajlama işlemine geçildi. Flask içerisindeki medium alınarak Fosfat tamponu (PBS) ile yıkama işlemi yapıldı. 37°C'de Trypsin-EDTA eklenerek 37°C de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin flask tabanından kalktığı mikroskopta kontrol edildikten sonra hücrelerin üzerine hazırlanan vasat eklendi. Hücreler flasktan toplanıp santrifüj tüpüne alındı. 1500 rpm/5 dk santrifüj edildi. Hücreler yeni 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür flaskında kültüre edildi. %70-80 yoğunluk oluşana kadar vasat değişimi yapılarak CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.

25 cm<sup>2</sup> hücre kültür flaskından 12 kuyucuklu hücre kültür plate hücreler kültüre edildi. Her bir kuyu için 0,5 x 10<sup>6</sup> hücre sayınına ulaşana kadar CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.



**Şekil 3.12.** BV-2 Mikroglial Hücrelerinin Mikroskop Görüntüsü (10X)

### 3.2.2. $\alpha$ -sinüklein Oluşumu ve Deney Protokülüne Göre Uygulanması

$\alpha$ -sinüklein'in toksik formu olan fibriller formu literatürde bulunan metodlar yardımıyla steril PBS'te sulandırıldıktan sonra monomer şeklinin 7 gün boyunca 37°C'de çalkalayıcıda 1000 rpm'de inkübe edilmesiyle elde edildi. Fibril formdaki  $\alpha$ -sinüklein oluşumunun doğrulaması Thioflavin T testi ile gerçekleştirildi. Fibriller formdaki  $\alpha$ -sinüklein, deneylerin gerçekleştirilmesine kadar -80°C'de muhafaza edildi (49).

Gruplar şu şekilde oluşturuldu. 1-Deney Grupları:  $\alpha$ -sinüklein uygulamasından sonra 6 saat, 12 saat, 18 saat ve 24 saat inkübasyon. 2-Kontrol Grupları:  $\alpha$ -sinüklein uygulaması yapılmadan 6 saat, 12 saat, 18 saat ve 24 saat inkübasyon.

Her grup ayrı bir 12 kuyucuklu hücre kültür plate'ine yerleştirildi. Kuyulara ekilen hücreler  $0,5 \times 10^6$  hücre sayısına ulaştıncaya kadar eski vasat atılarak yeni vasat eklendi. Deney gruplarındaki hücelere her kuyuya 50 nM fibriller formdaki  $\alpha$ -sinüklein eklendi ve yukarıda bahsedilen farklı inkübasyon sürelerine bırakıldı.

İlk deney grubunu inkübasyon süresi olan 6. saatin sonunda ilk deney grubunun vasatları toplandı ve -20 °C de saklandı. Her bir kuyuya 500  $\mu$ l PBS eklendi yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya Tripsin-ETDA eklendi ve 5 dk CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletildi. İnkübatörden çıkartılarak kabinde üzerine taze vasat eklendi. Hücreler toplanarak santrifüj tüpüne alındı ve 1500 rpm/5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine PBS eklenip tekrar 1500 rpm/5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak elde edilen pelletten DNA izolasyonu yapıldı.

Diğer deney gruplarında da aynı işlemler uygulanarak 12. saatin, 18. saatin ve 24. saatin sonunda DNA izolasyonu için pelletler oluşturuldu.

### 3.2.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyon kitin protokolüne göre;

- Proteinaz K, Proteinaz Buffer ile çözdürüldü.
- Wash Buffer B5 içerisine etanol eklendi.
  - ✓ Hücre pelleti üzerine 200 µl Lysis Buffer T1 eklendi. 25 µl Proteinaz K eklendi. 200 µl Lysis Buffer B3 solüsyonu eklendi. Karışım vortekslenerek her bir mikro santrifüj tüpü 70°C de 12 dk kuru blok ısıtıcısında bekletildi.
  - ✓ 12 dakikanın sonunda 210 µl etanol eklenerek vortekslendi.
  - ✓ Kolonlar toplama tüplerinin içlerine yerleştirildi ve hazırlanan solüsyon kolona uygulandı. Kolon 11000 x /1 dakika santrifüj edildi.
  - ✓ Kolonlar temiz toplama tüplerine aktarıldı. Kolona 500 µl Buffer B5 uygulandı ve 11000 x g/1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
  - ✓ Kolona 600 µl Buffer B5 eklenilerek 11000 x /1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılarak tekrar 11000 x g/1 dakika santrifüj edildi.
  - ✓ Kolonlar alınarak temiz mikro santrifüj tüplerine yerleştirildi. 50 µl Buffer BE eklendi ve 70°C de 3 dakika kuru blok ısıtıcısında bekletildi. Devamında 11000 x g/1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar atılarak mikro santrifüj tüpleri içerisinde toplanan DNA'lar -80°C de saklandı.

### 3.2.4. Bisülfite Modifikasyonu

DNA Bisülfite Modifikasyon Kit ile çalışmak için kitin çalışma protokolüne göre DNA konsantrasyonu 500 ng/20 µl olarak sabitlendi.

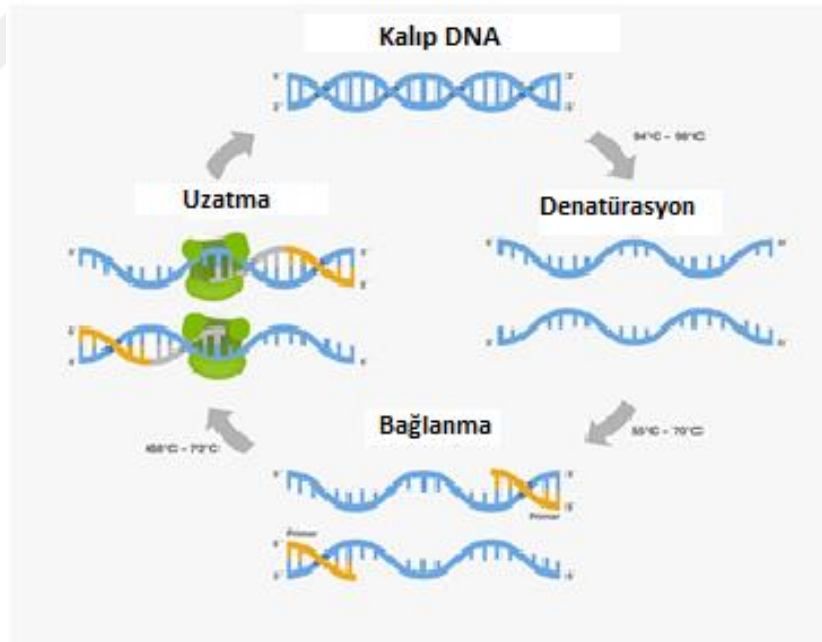
- ✓ Modifikasyon reaktifi, kit içerisinde yer alan liyofilize haldeki karışım içerisinde 900 µl steril su, 200 µl modifikasyon solüsyon 1 ve 60 µl modifikasyon solüsyon 2 eklenerek hazırlandı.
- ✓ Steril mikro santrifüj tüplerine 500 ng/20 µl DNA eklendi.
- ✓ Her bir DNA örneği içerisinde hazırlanmış modifikasyon reaktifinden 120 µl eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı.
- ✓ 10 dakika 98°C de kuru ısı bloğunda bekletildikten sonra 60°C de 150 dakika bekletildi.
- ✓ Toplama tüpü içerisindeki kolonlara 400 µl binding buffer eklendi ve içerisinde bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA'lar eklenip pipetaj yapıldı.
- ✓ 12.000 rpm de 30 saniye santrifüj yapıp toplama tüpünde kalan sıvı atılarak kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- ✓ Kolona 200 µl Wash Buffer eklenip 12000 rpm de 30 saniye santrifüj yapıp toplama tüpünde kalan sıvı atılarak kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- ✓ Kolona 200 µl Desülfonasyon Buffer eklenip oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. 12000 rpm de 30 saniye santrifüj yapıp toplama tüpünde kalan sıvı atılarak kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- ✓ Kolona 200 µl Wash Buffer eklenip 12000 rpm de 30 saniye santrifüj yapıp toplama tüpünde kalan sıvı atılarak kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- ✓ Kolona tekrar 200 µl Wash Buffer eklenip 12000 rpm de 1 dakika santrifüj yapıp toplama tüpünde kalan sıvı atılarak kolon steril bir mikro santrifüj tüpü içine yerleştirildi.
- ✓ Kolona 10 µl Elüsyon Buffer eklenip 12000 rpm de 1 dakika santrifüj yapıp kolon atılır. Mikro santrifüj tüpü içerisinde bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örneği -20°C de muhafaza edildi.

### 3.2.5. %2 Jel Agaroz Hazırlama

- ✓ 2 gram agaroz ve 100 ml TBE (Tris Borikasit EDTA) bir flask içerisine alındı.
- ✓ Flask mikrodalgada kaynatıldı.
- ✓ Kaynama sonrasında soğuduktan sonra etidyum bromür eklenip jel dökme aparatına döküldü. Donması için beklendi.

### 3.2.6. PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA dizilerini çoğaltmak için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Yöntem, amplifiye edilecek genom bölümünü seçmek için primer olarak adlandırılan kısa DNA dizilerinin kullanılmasını içerir. Bir DNA replikasyon enziminin hedef DNA dizisini kopyalamasına yardımcı olmak için numunenin sıcaklığı tekrar tekrar yükseltilir ve düşürülür. Teknik, sadece birkaç saat içinde hedef dizinin milyarlarca kopyasını üretebilir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** DNA'dan Hedef Diziyi Amplifiye Etmek İçin PCR'deki Ana Adımların Gösterimi

DNA metilasyon düzeyini belirlemek için tercih edilen yöntemlerden bir tanesi Bisülfid Modifikasyonu sonrası dizileme yöntemidir. CpG adalarında yer alan Guaninden önce gelen metillenmiş Sitozinler, Bisülfid Modifikasyonu sonrasında

Urasil'e çevrilir. DNA'daki metillenmiş olan sitozinler reaksiyon süresi boyunca değişime uğramadan kalır. Bisülfıt Modifikasyonu yapılan DNA'lar, MS PCR (Metilasyon-spesifik PCR) da kullanmak için de uyumludur.

Primerler CpG adacığı içerdiği için metile olan ve metile olmayan olarak ikişer çift Reverse ve Forward primer tasarlandı (Tablo 2). Bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA'larda iki grup oluşturuldu. Bir gruba metile olan primer dizileri diğer gruba metile olmayan primer dizileri eklenerek PCR işleme tabi tutuldu. Eğer DNA metile oluyor ise PCR işleme sırasında metile olan primerlerin varlığında DNA miktarının artması, eğer DNA metile olmuyor ise metile olmayan primerlerin varlığında DNA miktarının artması beklendi.

**Tablo 3.1.** *LRRK2* Primer Dizilimleri

<i>LRRK2</i> 'nin Promotör Bölgesine Spesifik Metile Olan Primer Dizilimi
Forward: 5'-TTT TAA AGT TTA TGT AGT TGG TCG A-3' (25 bp)
Reverse: 5'-AAT CCC CTT TCA AAA AAA CG-3' (23 bp)
<i>LRRK2</i> 'nin Promotör Bölgesine Spesifik Metile Olmayan Primer Dizilimi
Forward: 5'-TTT TAA AGT TTA TGT AGT TGG TTG A-3' (25 bp)
Reverse: 5'-AAT TAA CCC CTT TCA AAA AAA CAA T-3' (25 bp)

- ✓ -20°C'de saklanan bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örneklerinden PCR tüplerinin her birine 3 µl eklendi.
- ✓ Her bir µl de 1 U- 1.25 U enzim olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.
- ✓ DNA Polymerase enzim kiti kullanılarak PCR karışımı hazırlandı (Tablo 3).
- ✓ Her bir numune için metile olan ve metile olmayan olmak üzere toplamda 24 adet örnek PCR işleme tabi tutuldu.

**Tablo 2.2.** Ticari Kitin Önerdiği Master Mix Hazırlama Protokolü

50 µl PCR Reaksiyonu İçin	Hacim	Final Konsantrasyon
DNA Polimeraz (2.5 U/µl)	0.4-2 µl	1-5 U
10X PCR Tamponu	5 µl	1 X
dNTP Karışımı	4 µl	200 µM
Kalıp	< 500 ng	< 500 ng
Forward Primer	5-50 pmol	0.1-1 µM
Reverse Primer	5-50 pmol	0.1-1 µM
Distle Su	50 µl tamamlana kadar	-

- ✓ Metile olmayan mix metile olmayan çalışılacak örneklere metile olan mix metile olan çalışılacak DNA örneklerinin üzerine eklendi.
- ✓ PCR'da ilk denatürasyon bir defa 95 °C de 3 dakika gerçekleştirilip sonrasında 95°C 40 saniye denatürasyon, tasarlanan primerlere uygun sıcaklıkta 40 saniye primerlerin bağlanması ve 72 °C de 1 dakika 10 saniye uzatma işleminin yer aldığı 40 döngü gerçekleştirildi.

### 3.2.7. PCR Yapılmış Numunelerin Agaroz Jele Uygulanması

- ✓ Hazırlanmış %2 jel agaroz, agaroz jel elektroprezi içerisine yerleştirildi.
- ✓ İlk kuyucuk içerisine DNA Ladder marker uygulandı.
- ✓ Yükleme boyası ile karıştırılmış PCR örnekleri jele uygulandı.
- ✓ Agaroz jel elektroforezi 125 voltaj da 15 dakika çalıştırıldı.
- ✓ UV Transilluminatör ile DNA bantları görüntülendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. $\alpha$ -sinüklein Uygulanmış BV-2 Hücre Hatlarından DNA İzolasyon Sonuçları

**Tablo 3.1.** 6 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucu nano-drop ölçüm sonuçları

Gruplar	Sonuçlar
Kontrol Grubu	320.255 $\mu\text{g/ml}$
6 Saat $\alpha$ -sinüklein	198.743 $\mu\text{g/ml}$
6 Saat $\alpha$ -sinüklein	270.469 $\mu\text{g/ml}$

6. saatin sonunda hücreler toplanarak DNA izolasyon kiti ile izolasyon gerçekleştirildi ve ilk deney grubundan elde edilen DNA miktarlarının Nano-Drop ölçüm sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. DNA izolasyonu sonrasında DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışılması için DNA konsantrasyonunun 50  $\mu\text{g/ml}$  ve üzerinde olması gereklidir ve Tablo 4’de gösterildiği üzere DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışmak için uygun DNA konsantrasyon sonuçları elde edilmiştir.

**Tablo 4.2.** 12 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucu nano-drop ölçüm sonuçları

Gruplar	Sonuçlar
Kontrol Grubu	440.074 $\mu\text{g/ml}$
12 Saat $\alpha$ -sinüklein	429.505 $\mu\text{g/ml}$
12 Saat $\alpha$ -sinüklein	437.545 $\mu\text{g/ml}$

12. saatin sonunda hücreler toplanarak DNA izolasyon kiti ile izolasyon gerçekleştirildi ve ikinci deney grubundan elde edilen DNA miktarlarının Nano-Drop ölçüm sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. DNA izolasyonu sonrasında DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışılması için DNA konsantrasyonunun 50  $\mu\text{g/ml}$  ve üzerinde olması gereklidir ve Tablo 4.2’de gösterildiği üzere DNA bisülfıt

modifikasyon kiti ile çalışmak için uygun DNA konsantrasyon sonuçları elde edilmiştir.

**Tablo 4.3.** 18 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucu nano-drop ölçüm sonuçları

Gruplar	Sonuçlar
Kontrol Grubu	352.598 µg/ml
18 Saat $\alpha$ -sinüklein	245.357 µg/ml
18 Saat $\alpha$ -sinüklein	533.191 µg/ml

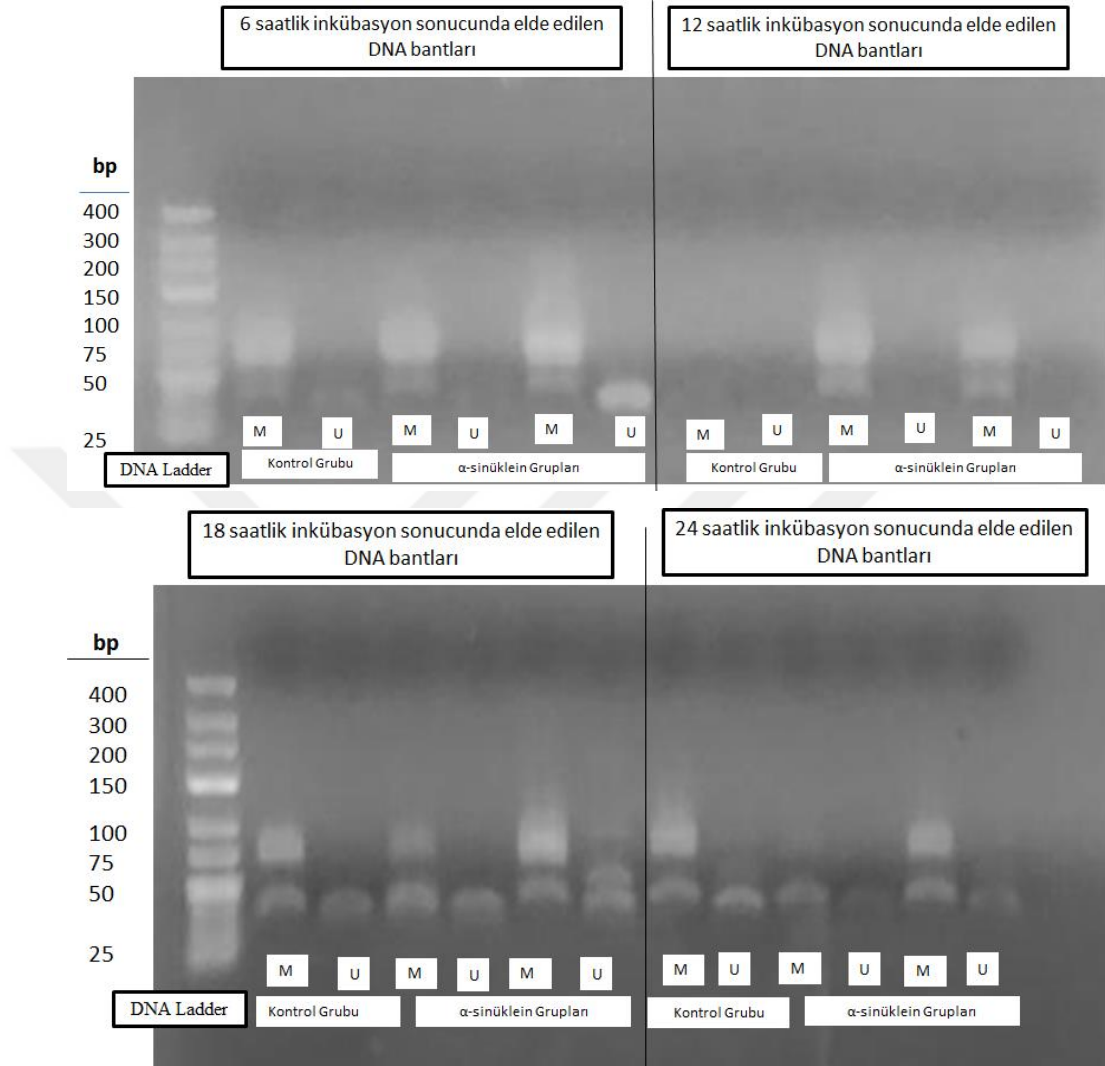
18. saatin sonunda hücreler toplanarak DNA izolasyon kiti ile izolasyon gerçekleştirildi ve üçüncü deney grubundan elde edilen DNA miktarlarının Nano-Drop ölçüm sonuçları Tablo 4.3'de gösterilmiştir. DNA izolasyonu sonrasında DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışılması için DNA konsantrasyonunun 50 µg/ml ve üzerinde olması gereklidir ve Tablo 4.3'de gösterildiği üzere DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışmak için uygun DNA konsantrasyon sonuçları elde edilmiştir.

**Tablo 4.4.** 24 saat inkübasyon sonuncu yapılan DNA izolasyon sonucu nano-drop ölçüm sonuçları

Gruplar	Sonuçlar
Kontrol Grubu	73.740 µg/ml
24 Saat $\alpha$ -sinüklein	55.686 µg/ml
24 Saat $\alpha$ -sinüklein	109.613 µg/ml

24. saatin sonunda hücreler toplanarak DNA izolasyon kiti ile izolasyon gerçekleştirildi ve dördüncü deney grubundan elde edilen DNA miktarlarının Nano-Drop ölçüm sonuçları Tablo 4.4'de gösterilmiştir. DNA izolasyonu sonrasında DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışılması için DNA konsantrasyonunun 50 µg/ml ve üzerinde olması gereklidir ve Tablo 4.4'de gösterildiği üzere DNA bisülfıt modifikasyon kiti ile çalışmak için uygun DNA konsantrasyon sonuçları elde edilmiştir.

## 4.2. $\alpha$ -sinüklein Uygulanmış BV-2 Hücre Hatlarından Elde Edilen İzole DNA Örneklerinin Metilasyon Sonuçları



**Şekil 4.1.** Kontrol ve Deney Gruplarının Agaroz Jel Elektroforezi ile Elde Edilen Metile Olan ve Metile Olmayan Bantların Görüntüleri

Kontrol gruplarında ve deney gruplarında metile olan bantlar gözlemlenmiş ancak metile olmayan bantlar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.1).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

PH, hem motor hem de motor olmayan semptomların gözlemlendiği, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (23,26). PH'ın karakteristik patolojik özellikleri, dopaminerjik nöronların kaybı ve SN'de  $\alpha$ -sinüklein içeren Lewy cisimciklerinin oluşumudur (24). Parkinson hastalığının oluşmasına neden olan pek çok faktör bulunmaktadır. Hem çeşitli faktörlere çevresel maruziyetten hem de genetik farklılıklardan kaynaklanan çok yönlü bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Her ne kadar PH ilk olarak sporadik bir hastalık olarak kabul edilmiş olsa da daha sonra yapılan çalışmalar hastalığın özellikle *SNCA*, *PINK1* ve en sık görülen *LRRK2* genindeki mutasyonlar sonucunda gelişebileceği kabul görmüştür (60).

Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve RNA bazlı mekanizmalardır (13). Çevresel etkilerin genom düzeyindeki farklılıklara neden olabildiğinin gösterilmesinin ardından epigenetik mekanizmaların PH'ın patolojisindeki rolü önem kazanmıştır. PH ile DNA metilasyonu arasındaki bağıntının aydınlatılmaya başlamasından sonra *SNCA*'nın CpG adalarındaki hipometilasyonun  $\alpha$ -sinüklein ifadesini artırdığı ve Parkinson hastalığının patogenezinde katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (103).

Sporadik olduğu düşünülen vakalarda yaşın ilerlemesiyle *LRRK2* mutasyonunun var olma olasılığı yükselmiştir (62). Bu bağlamda *LRRK2* geninde oluşabilecek mutasyonların ve *LRRK2*'ye epigenetik mekanizmaların etkilerinin anlaşılması PH'ın patogenezinin anlaşılması için oldukça önemlidir.

Yapılan bu tez çalışmasında PH'ın ana patolojik bulguları arasında kabul edilen toksik  $\alpha$ -sinüklein varlığında *LRRK2* genin promotör bölgesinde oluşabilecek metilasyon miktarındaki değişimlerin gözlemlenmesi ve aydınlatılması amaçlanmıştır. Yu-yan Tan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda elde edilen veriler ile daha önce elde edilen bilgilerle birlikte *SNCA*'nın CpG adalarındaki hipometilasyonun  $\alpha$ -sinüklein ifadesini artırdığı ve PH'ın patogenezinde katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (16). Yeni çalışmalarda *LRRK2*'de oluşabilecek epigenetik değişikliklerin araştırılması önem kazanmıştır. Bu tez çalışmasında ise dışarıdan eklenen fibril formdaki  $\alpha$ -sinüklein varlığında *LRRK2* genin promotör

bölgesinde gerçekleşen metilasyonda oluşabilecek değişimin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın sonucunda kontrol gruplarında ve  $\alpha$ -sinüklein ile farklı saatlerde inkübasyona bırakılan gruplarda metile olan bantlar gözlemlenirken metile olmayan bantlar gözlemlenmemiştir.

Bizim çalışmamıza benzer olarak Parkinson hastalarından alınan kanlarda lökosit izolasyonu yapılarak *SNCA* ve *LRRK2* genlerinde  $\alpha$ -sinüklein varlığında metilasyon düzeyindeki değişimler araştırılmıştır. *SNCA* geninin CpG-1 adalarında ve *LRRK2* promotör bölgelerinde metilasyon miktarında değişim gözlemlenmemiş olup *SNCA* genin CpG-2 adalarında metilasyon miktarında büyük oranda azalma gözlemlenmiştir (16). Bu tez çalışmasında BV-2 hücre hattında *in vitro* ortamda *LRRK2* promotör bölgelerinde metilasyonun değişmediği sonucu doğrulanmıştır.

DNA metilasyonunun,  $\alpha$ -sinükleinin gen ekspresyonunda anahtar roller oynadığı gösterilmiştir (116). Azalan DNA metilasyonunun Parkinson hastalarının beyinlerinde  $\alpha$ -sinüklein düzeylerinin artmasına yol açtığı rapor edilmiştir (117,118).

*SNCA*, ailesel Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiş ilk gendir ve şu anda hastalıkla ilişkili altı mutasyondan etkilendiği bilinmektedir. Bunlar A53T, A30P, E46K, G51D, H50Q ve A53E. *SNCA*'da gerçekleşen bu mutasyonlar,  $\alpha$ -sinüklein agregasyonuna ve oksidatif strese katkıda bulunur (119–121).  $\alpha$ -sinüklein birikimi nörodejenarasyona sebep olarak PH'nin temel patolojik bulgularını oluşturur.

NCBI veri tabanına dayalı olarak, insan *SNCA* geninin iki CpG adası vardır. CpG-1, *SNCA*'nın ekson1'inde (translasyon başlatma bölgesinin -1675 ila -1464 bp arasında) bulunur ve 16 CpG dizisine sahiptir. CpG-2, 14 CpG sekansı içeren *SNCA*'nın intron1'inde (translasyon başlatma bölgesinin -701 ila -507 bp arasında) bulunur. İnsan *LRRK2* geni, *LRRK2*'nin translasyon başlatma bölgesinin yukarı akışında -602 ve -334 bp arasında promotör bölgesinde sadece bir CpG adasına sahiptir, bu ada 34 CpG bölgesi içerir. Yapılan çalışmada *SNCA* CpG-1 hem de *LRRK2*'nin hem normal kontrollerden hem de Parkinson hastalarından alınan kan lökosit DNA'sında seyrek olarak metillendiği gösterildi. Bununla birlikte, Parkinson hastalarında *SNCA* CpG-2'nin medyan metilasyon derecesi, normal kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (16). Daha önce elde edilen

sonuçlarda da *SNCA*'nın CpG adalarındaki hipometlasyonun  $\alpha$ -sinüklein ifadesini artırdığı ve PH'nin patogeneze katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (103).

*LRRK2* proteinini kodlayan gen, PH için en önemli genetik risk faktörlerinden biri olarak kabul edilir. *LRRK2* genindeki mutasyonlar, otozomal dominant PH ile bağlantılıdır ve *LRRK2* lokusundaki genetik varyasyonlar, sporadik PH için artan risk ile ilişkilidir (122).

Lewy cisimcikleri içerisinde çeşitli ölüm sonrası çalışmalarda immünohistokimyasal analizlerle birbirinden farklı yaklaşık yüz protein varlığı doğrulanmıştır. Özellikle, *LRRK2* ayrıca *Parkin* ve *PINK-1* gibi diğer PH ile bağlantılı gen ürünleri Lewy cisimciklerinde tespit edilmiştir (123).  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerinin seviyeleri, asemptomatik *LRRK2* mutant taşıyıcılarının beyin omurilik sıvısında sağlıklı yaş uyumlu kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksekti, bu durum *LRRK2* mutasyonun toksik  $\alpha$ -sinüklein oligomerlerinin oluşumuna katkıda bulunarak hastalık öncesi sürece katkıda bulunduğunu düşündürmüştür (124). Bu görüşü destekleyen başka bir çalışma, yaş uyumlu *LRRK2* farelerine kıyasla, 15 ve 18 aylıkken *LRRK2* geninde R1441G mutasyonunun var olduğu farelerinin striatum ve korteksinde yaşa bağlı daha fazla oligomerik  $\alpha$ -sinüklein birikimi olduğunu göstermiştir (125). Önceden oluşturulmuş fibriller, endojen  $\alpha$ -sinükleinin patojenik fibril formlarına dönüşümünü tetikleyebilen yapay olarak oluşturulmuş kısa fibril parçalarıdır ve önceden oluşturulmuş fibriller, çözünmeyen fibrillerin veya Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyonların üretilmesi için öncü işlevi görebilir.  $\alpha$ -sinüklein önceden oluşturulmuş fibrillerin uygulandığı, *LRRK2* geninin G2019S mutasyonu taşıyan fareler de  $\alpha$ -sinüklein agregasyonu hızlanmış, SNc da dopaminerjik nöronlarında dejenerasyon ve nöroinflamasyon gözlemlenmiştir (126).

Bu yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular doğrultusunda *LRRK2* geninde oluşan mutasyonların PH'da  $\alpha$ -sinüklein kaynaklı patogenezi düzenleyebileceğini ve  $\alpha$ -sinüklein agregasyonu ile *LRRK2* geninde oluşan mutasyonların arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında *in vitro* ortamda BV-2 mikroglia hücre hattı üzerine saat uyumlu taze medium ve önceden oluşturulmuş  $\alpha$ -sinüklein fibrilleri içeren medium uygulanmıştır. Farklı saatlerde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol

grupları ile çalışma grupları arasında metilasyonda değişim gözlemlenmemiştir. Hastalık varlığında *SNCA*'nın CpG-1 adasında metilasyon miktarı değişmezken CpG-2 adasında hipometilasyon gözlemlenmiştir (16). *LRRK2* farklı bölgelerinde oluşabilecek metilasyon miktarındaki değişimlerin araştırılması ve *LRRK2* ile  $\alpha$ -sinüklein arasındaki ilişkinin anlaşılması için bir yol olabilir.

*LRRK2* ile  $\alpha$ -sinüklein arasındaki ilişkinin anlaşılması için daha farklı çalışmaların yapılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasına benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada BV-2 hücre hattında  $\alpha$ -sinüklein varlığında 6 saatlik inkübasyon sonucunda kontrol gruplarına kıyasla eksozom salgılama seviyesinin arttığı ortaya konulmuş ve bu eksozomlarla MHC sınıf II molekülleri ile TNF- $\alpha$ 'nın ifade edildiği bildirilmiştir (127). Eksozomlar, çok sayıda hücre tipi tarafından salınan ve vücut sıvılarında bol miktarda bulunan endositik kökenli zara bağlı veziküllerdir. Protein salgılanması, immün yanıt regülasyonları, RNA/protein transferi, hücre-hücre etkileşimi iyi bilinen fonksiyonlarındandır (127). Başka bir çalışmada ise eksozomların hücreler arasında  $\alpha$ -sinüklein proteinini transfer edebildiği ve PH'da görülen lizozomal bozuklukların eksozomal  $\alpha$ -sinüklein salınımını arttırdığı sonucuna varılmıştır (128). Yapılan başka bir çalışmada eksozomal  $\alpha$ -sinükleinin merkezi sinir sisteminden kaynaklandığı ve PH'nın şiddeti artıkça seviyesinin arttığı gösterilmiştir (129).

Parkinsonlu hastalar ile yaşı ve cinsiyet uyumlu kontrollerin lökositlerinde *SNCA* metilasyon düzeyleri ve plazma eksozomal  $\alpha$ -sinüklein miktarları incelenmiştir. PH gruplarında kontrole kıyasla hipometilasyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, plazma eksozomal  $\alpha$ -sinüklein seviyeleri PH gruplarında kontrollerdekilere kıyasla yükselmiştir. *SNCA* metilasyonu ile plazma eksozomal  $\alpha$ -sinüklein seviyeleri ilişkilendirilmiştir (130).

Bu tez çalışmasında kontrol grupları ve  $\alpha$ -sinüklein uygulanan grupların 6.saat, 12. saat, 18. saat ve 24. saatin sonunda toplanılan medyumları atılmayıp -20 °C'de muhafaza edildi. İlerleyen çalışmalarda bu medyumlar içerisindeki kontrol gruplarına kıyasla sitokin miktarlarındaki değişimlerin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.  $\alpha$ -sinükleinin insan mikroglyal hücre hattı olan HMC3'de farklı parametrelerle çalışılması ve elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Ganguly U, Singh S, Pal S, Prasad S, Agrawal BK, Saini R V., et al. Alpha-Synuclein as a Biomarker of Parkinson's Disease: Good, but Not Good Enough. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2021 Jul 8 [cited 2022 May 30];13. Available from: [/pmc/articles/PMC8298029/](#)
2. Kalia L V., Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2015 Aug 29 [cited 2022 May 30];386(9996):896–912. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25904081/>
3. Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 May 30];21(7). Available from: [/pmc/articles/PMC7177377/](#)
4. Pajares M, I Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells* [Internet]. 2020 Jul 14 [cited 2022 May 30];9(7). Available from: [/pmc/articles/PMC7408280/](#)
5. Meder D, Herz DM, Rowe JB, Lehericy S, Siebner HR. The role of dopamine in the brain - lessons learned from Parkinson's disease. *Neuroimage*. 2019 Apr 15;190:79–93.
6. Dickson DW. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2022 Apr 5];2(8):a009258. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/8/a009258.full>
7. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Definition of a molecular pathway mediating  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity. *J Neurosci* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Apr 5];35(13):5221–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25834048/>
8. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2001 Jul [cited 2022 Apr 5];2(7):492–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11433374/>
9. Watanabe R, Buschauer R, Böhning J, Audagnotto M, Lasker K, Lu TW, et al. The in situ structure of Parkinson's disease-linked LRRK2. *Cell* [Internet]. 2020 Sep 9 [cited 2022 May 30];182(6):1508. Available from: [/pmc/articles/PMC7869717/](#)
10. Roosen DA, Cookson MR. LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2016 Dec 7 [cited 2022 May 30];11(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27927216/>
11. Lu C-S, Simons EJ, Wu-Chou Y-H, Fonzo A Di, Chang H-C, Chen R-S, et al. The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. 2005 Dec 26 [cited 2021 Feb 9];11(8):521–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353802005001884>

12. Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, et al. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet*. 2005 Jan 29;365(9457):412–5.
13. Ammal Kaidery N, Tarannum S, Thomas B. Epigenetic Landscape of Parkinson's Disease: Emerging Role in Disease Mechanisms and Therapeutic Modalities [Internet]. Vol. 10, *Neurotherapeutics*. Springer New York LLC; 2013 [cited 2021 Feb 9]. p. 698–708. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13311-013-0211-8>
14. Miranda-Morales E, Meier K, Sandoval-Carrillo A, Salas-Pacheco J, Vázquez-Cárdenas P, Arias-Carrión O. Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2017 Jul 18 [cited 2022 Apr 17];10. Available from: [/pmc/articles/PMC5513956/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25545759/)
15. Pihlstrøm L, Berge V, Rengmark A, Toft M. Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the  $\alpha$ -synuclein gene. *Mov Disord* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Apr 17];30(4):577–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25545759/>
16. Tan Y yan, Wu L, Zhao Z bo, Wang Y, Xiao Q, Liu J, et al. Methylation of  $\alpha$ -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Mar 1;20(3):308–13.
17. Vinay Kumar, Abul K. Abbas JCA. Neurodegenerative Diseases. In: *ROBBINS BASIC PATHOLOGY*. Tenth. Elsevier; 2018. p. 877–9.
18. Laurence L. Brunton, John S. Lazo KLP. Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli. 2009.
19. Manyam B V. Paralysis agitans and levodopa in “Ayurveda”: ancient Indian medical treatise. *Mov Disord* [Internet]. 1990 [cited 2022 Jan 30];5(1):47–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2404203/>
20. Zhang ZX, Dong ZH, Román GC. Early descriptions of Parkinson disease in ancient China. *Arch Neurol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jan 30];63(5):782–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16682554/>
21. Goetz CG. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
22. Greenfield JG, Bosanquet FD. THE BRAIN-STEM LESIONS IN PARKINSONISM. *J Neurol Neurosurg Psychiat* [Internet]. 1953;213. Available from: <http://jnnp.bmj.com/>
23. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? Vol. 8, *The Lancet Neurology*. Elsevier; 2009. p. 382–97.
24. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–21. Available from: [www.nature.com/nrdp](http://www.nature.com/nrdp)
25. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2017 Aug 1;124(8):901–5.

26. Yönetmeni Y, Karabudak R, Yılı B, Koordinatörü A. Parkinson Hastalığı. [cited 2022 Mar 12]; Available from: [www.noroloji.org.tr](http://www.noroloji.org.tr)
27. Balestrino R, Schapira AH V. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2019;2020:27–42.
28. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2022 Mar 13];26 Suppl 1(SUPPL. 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21626386/>
29. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics and Pathophysiology.
30. Yang F, Lagerros YT, Bellocco R, Adami H-O, Fang F, Pedersen NL, et al. Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/138/2/269/291630>
31. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. E-Mail Systematic Review The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* [Internet]. 2016;46:292–300. Available from: [www.karger.com/doi/10.1159/000445751](http://www.karger.com/doi/10.1159/000445751)
32. Uluslararası Alanya İşletme Fakültesi Dergisi » Submission » Beynin Nöroanatomik ve Nörokimsiyal Yapısının Kişilik ve Davranış Üzerindeki Etkisi [Internet]. [cited 2022 Apr 5]. Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/uaifd/issue/21602/232018>
33. Bazal ganglion [Internet]. [cited 2022 Apr 4]. Available from: [https://stringfixer.com/tr/Basal\\_ganglia](https://stringfixer.com/tr/Basal_ganglia)
34. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar 1;24(2):197–211.
35. Cooper, J. R., Bloom, F. E., & Roth RH. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 7 th ed. New York: Oxford University Press; 1996.
36. Burré J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunger AT, Südhof TC. Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein. *Nature* [Internet]. 2013 [cited 2022 Apr 5];498(7453). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23765500/>
37. Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, Grigoletto J, Missale C, Spano P. From  $\alpha$ -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Res* [Internet]. 2012 Oct 2 [cited 2022 Apr 5];1476:183–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560500/>
38. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Systematic mutagenesis of  $\alpha$ -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J Neurosci* [Internet]. 2012 Oct 24 [cited 2022 Apr 5];32(43):15227–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23100443/>

39. Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, et al. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Oct 12 [cited 2022 Apr 5];101(41):14966–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465911/>
40. Anwar S, Peters O, Millership S, Ninkina N, Doig N, Connor-Robson N, et al. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J Neurosci* [Internet]. 2011 May 18 [cited 2022 Apr 10];31(20):7264–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21593311/>
41. Ryskalin L, Busceti CL, Limanaqi F, Biagioni F, Gambardella S, Fornai F. A Focus on the Beneficial Effects of Alpha Synuclein and a Re-Appraisal of Synucleinopathies. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2018 Nov 20 [cited 2022 Apr 10];19(6):598. Available from: </pmc/articles/PMC5925871/>
42. Specht CG, Tigaret CM, Rast GF, Thalhammer A, Rudhard Y, Schoepfer R. Subcellular localisation of recombinant alpha- and gamma-synuclein. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 5];28(2):326–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15691713/>
43. Du X-Y, Xie X-X, Liu R-T. Molecular Sciences The Role of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. Available from: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)
44. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of  $\alpha$ -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Apr 5];8(3). Available from: </pmc/articles/PMC5519445/>
45. Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, et al.  $\alpha$ -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 May 4 [cited 2022 Apr 5];287(19):15345. Available from: </pmc/articles/PMC3346117/>
46. Cuervo AM, Stafanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant  $\alpha$ -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* (80- ) [Internet]. 2004 Aug 27 [cited 2022 Apr 5];305(5688):1292–5. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1101738>
47. Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2018 Jan 1;109:249–57.
48. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2022 Apr 5];19(6):533–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.04-2751com>

49. Kim Moon-Chang Baek H-S, Choi I-Y, Kim W-K, Eun-Jung Lee E, Woo M-S, Moon P-G. Protease-Activated Receptor-1 and the Subsequent Activation of Metalloproteinases the Expressions of Matrix-Synuclein Activates Microglia by Inducing  $\alpha$ . *May J Immunol* [Internet]. 2022 [cited 2022 Feb 18];185:615–23. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/185/1/615>
50. L. Kiss A. Inflammation in Focus: The Beginning and the End. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2021 Jan 4 [cited 2022 Apr 16];27. Available from: </pmc/articles/PMC8763665/>
51. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 2020 173 [Internet]. 2020 Dec 14 [cited 2022 Apr 15];17(3):157–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-020-00435-y>
52. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 2014 147 [Internet]. 2014 Jun 25 [cited 2022 Apr 15];14(7):463–77. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3705>
53. Hoenen C, Gustin A, Birck C, Kirchmeyer M, Beaume N, Felten P, et al. Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLoS One* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Apr 15];11(9). Available from: </pmc/articles/PMC5021287/>
54. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 2015 532 [Internet]. 2015 Jan 20 [cited 2022 Apr 15];53(2):1181–94. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-014-9070-5>
55. Rojanathammanee L, Murphy EJ, Combs CK. Expression of mutant alpha-synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2011 May 9 [cited 2022 Apr 16];8(1):1–12. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-8-44>
56. Jiang T, Hoekstra J, Heng X, Kang W, Ding J, Liu J, et al. P2X7 receptor is critical in a-synuclein-mediated microglial NADPH oxidase activation. [cited 2022 Apr 16]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015>
57. Yang TT, Lin C, Hsu CT, Wang TF, Ke FY, Kuo YM. Differential distribution and activation of microglia in the brain of male C57BL/6J mice. *Brain Struct Funct* [Internet]. 2013 Jul [cited 2022 Apr 12];218(4):1051–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22886465/>
58. Luo XG, Chen S Di. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener* 2012 11 [Internet]. 2012 Apr 24 [cited 2022 Apr 16];1(1):1–13. Available from: <https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-9158-1-9>

59. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial Import and Accumulation of-Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease Brain \* □ S. 2008 [cited 2022 Mar 12]; Available from: <http://www.jbc.org>
60. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* [Internet]. 2010 May 18 [cited 2021 Feb 9];31(7):763–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.21277>
61. Fonzo A Di, Tassorelli C, De Mari M, Chien HF, Ferreira J, Rohé CF, et al. Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson’s disease. Available from: [www.nature.com/ejhg](http://www.nature.com/ejhg)
62. Kluss JH, Mamais A, Cookson MR. LRRK2 links genetic and sporadic Parkinson’s disease [Internet]. Vol. 47, *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Ltd; 2019 [cited 2021 Feb 9]. p. 651–61. Available from: [/biochemsoctrans/article/47/2/651/219650/LRRK2-links-genetic-and-sporadic-Parkinson-s](http://biochemsoctrans/article/47/2/651/219650/LRRK2-links-genetic-and-sporadic-Parkinson-s)
63. Kluss JH, Mamais A, Cookson MR. LRRK2 links genetic and sporadic Parkinson’s disease. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2019 Apr 30 [cited 2022 Mar 15];47(2):651–61. Available from: [/biochemsoctrans/article/47/2/651/219650/LRRK2-links-genetic-and-sporadic-Parkinson-s](http://biochemsoctrans/article/47/2/651/219650/LRRK2-links-genetic-and-sporadic-Parkinson-s)
64. Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, et al. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson’s disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2011 [cited 2022 Apr 10];377(9766):641–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292315/>
65. Chang D, Nalls MA, Hallgrímsdóttir IB, Hunkapiller J, Brug M van der, Cai F, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson’s disease risk loci. *Nat Genet* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Apr 10];49(10):1511–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28892059/>
66. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson’s disease.
67. Van Der Brug MP, Singleton A, Gasser T, Lewis PA. Parkinson’s disease: From human genetics to clinical trials. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Sep 16 [cited 2022 Mar 13];7(305):205ps20. Available from: [/pmc/articles/PMC5995146/](http://pmc/articles/PMC5995146/)
68. Gandhi PN, Chen SG, Wilson-Delfosse AL. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): a key player in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *J Neurosci Res* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2022 Mar 14];87(6):1283–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19025767/>

69. Bosgraaf L, Van Haastert PJM. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2003 Dec 7;1643(1–3):5–10.
70. Gandhi PN, Chen SG, Wilson-Delfosse AL. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2): A Key Player in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease.
71. Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM. LRRK2 pathobiology in Parkinson’s disease. *J Neurochem* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2022 Mar 14];131(5):554–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.12949>
72. Paisán-Ruiz C, Lewis PA, Singleton AB. LRRK2: Cause, risk, and mechanism. Vol. 3, *Journal of Parkinson’s Disease.* IOS Press; 2013. p. 85–103.
73. Marín I, Van Egmond WN, Van Haastert PJM. The Roco protein family: a functional perspective.
74. Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, Van Der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson’s disease. *Neuron* [Internet]. 2004 Nov 18 [cited 2022 Mar 15];44(4):595–600. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541308/>
75. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* [Internet]. 2004 Nov 18 [cited 2022 Mar 15];44(4):601–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541309/>
76. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, et al. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2005 [cited 2022 Mar 15];76(4):672–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15726496/>
77. Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, Kawashima N, Komiyama M, Kowa H, et al. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol* [Internet]. 2005 Jun [cited 2022 Mar 15];57(6):918–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15880653/>
78. Dächsel JC, Farrer MJ. LRRK2 and Parkinson Disease. *Arch Neurol* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2022 Mar 15];67(5):542–7. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/800073>
79. Ito G, Okai T, Fujino G, Takeda K, Ichijo H, Katada T, et al. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson’s disease. *Biochemistry* [Internet]. 2007 Feb 6 [cited 2022 Mar 13];46(5):1380–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi061960m>
80. Islam MS, Moore DJ. Mechanisms of LRRK2-dependent neurodegeneration: Role of enzymatic activity and protein aggregation [Internet]. Vol. 45, *Biochemical Society Transactions.* Portland Press Ltd; 2017 [cited 2021 Feb 9]. p. 163–72. Available from: </biochemsoctrans/article/45/1/163/66312/Mechanisms-of-LRRK2-dependent-neurodegeneration>

81. Seol W, Nam D, Son I. Rab GTPases as physiological substrates of LRRK2 kinase [Internet]. Vol. 28, *Experimental Neurobiology*. Korean Society for Neurodegenerative Disease; 2019 [cited 2021 Feb 9]. p. 134–45. Available from: [/pmc/articles/PMC6526114/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3261114/)
82. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2022 Apr 11];10(8):513–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19603039/>
83. Jeong GR, Jang EH, Bae JR, Jun S, Kang HC, Park CH, et al. Dysregulated phosphorylation of Rab GTPases by LRRK2 induces neurodegeneration. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2022 Apr 11];13(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5811984/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3011984/)
84. Steger M, Tonelli F, Ito G, Davies P, Trost M, Vetter M, et al. Phosphoproteomics reveals that Parkinson’s disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife* [Internet]. 2016 Jan 29 [cited 2022 Apr 11];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26824392/>
85. Steger M, Diez F, Dhekne HS, Lis P, Nirujogi RS, Karayel O, et al. Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *Elife* [Internet]. 2017 Nov 10 [cited 2022 Apr 11];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29125462/>
86. Usmani A, Shavarebi F, Hiniker A. The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson’s Disease. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2021 Apr 22 [cited 2022 Apr 11];41(5). Available from: [/pmc/articles/PMC8088268/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34088268/)
87. Purlyte E, Dhekne HS, Sarhan AR, Gomez R, Lis P, Wightman M, et al. Rab29 activation of the Parkinson’s disease-associated LRRK2 kinase. *EMBO J* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2022 Apr 11];37(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC5753036/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/303036/)
88. Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer’s disease: Decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging*. 2010 Dec 1;31(12):2025–37.
89. Chan MF, Van Amerongen RE, Nijjar † Tarlochan, Cuppen ‡ Edwin, Jones PA, Laird PW. Reduced Rates of Gene Loss, Gene Silencing, and Gene Mutation in Dnmt1 -Deficient Embryonic Stem Cells . *Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 Nov 15 [cited 2022 Mar 16];21(22):7587–600. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
90. Fan G, Beard C, Chen RZ, Rgyi Csankovszki G, Sun Y, Siniaia M, et al. DNA Hypomethylation Perturbs the Function and Survival of CNS Neurons in Postnatal Animals. 2001;
91. Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, Chevassut T, Forrester L, Ansell J, et al. Severe Global DNA Hypomethylation Blocks Differentiation and Induces Histone Hyperacetylation in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2022 Mar 16];24(20):8862–71. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>

92. Milutinovic S, Brown SE, Zhuang Q, Szyf M. DNA Methyltransferase 1 Knock Down Induces Gene Expression by a Mechanism Independent of DNA Methylation and Histone Deacetylation. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):27915–27.
93. Espada J, Ballestar E, Santoro R, Fraga MF, Villar-Garea A, Németh A, et al. Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2007 Apr 1 [cited 2022 Mar 16];35(7):2191–8. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/35/7/2191/1093051>
94. McGowan PO, Szyf M. The epigenetics of social adversity in early life: Implications for mental health outcomes. *Neurobiol Dis*. 2010 Jul 1;39(1):66–72.
95. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008 96 [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Mar 16];9(6):465–76. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrg2341>
96. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. *Cmaj*. 2006;174(3):341–8.
97. Kaut O, Sharma A, Schmitt I, Hurlmann R, Wüllner U. DNA methylation of DLG4 and GJA-1 of human hippocampus and prefrontal cortex in major depression is unchanged in comparison to healthy individuals. *J Clin Neurosci*. 2017 Sep 1;43:261–3.
98. Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, et al. Both familial Parkinson’s disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem [Internet]*. 1999 Apr 2 [cited 2022 Apr 17];274(14):9843–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10092675/>
99. Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science [Internet]*. 2000 Feb 18 [cited 2022 Apr 17];287(5456):1265–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10678833/>
100. Janezic S, Threlfell S, Dodson PD, Dowie MJ, Taylor TN, Potgieter D, et al. Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2013 Oct 15 [cited 2022 Apr 17];110(42). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24082145/>
101. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson’s disease. *Science [Internet]*. 2003 Oct 31 [cited 2022 Apr 17];302(5646):841. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14593171/>
102. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson’s disease. *Lancet (London, England) [Internet]*. 2004 Sep 25 [cited 2022 Apr 17];364(9440):1167–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15451224/>

103. Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, Kurisaki H, Date H, Tsuji S, et al. CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 17];5(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21124796/>
104. Holtman IR, Skola D, Glass CK. Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease [Internet]. Vol. 127, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2017 [cited 2021 Feb 9]. p. 3220–9. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI90604>.
105. BV-2 Microglial Cells | AcceGen [Internet]. [cited 2021 Aug 19]. Available from: <https://www.accegen.com/product/bv-2-abc-tc212s/>
106. McManus RM, Heneka MT. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2017 Mar 4 [cited 2022 Apr 12];9(1). Available from: </pmc/articles/PMC5336609/>
107. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Apr 12];37(3):510. Available from: </pmc/articles/PMC2823829/>
108. Cabezudo D, Baekelandt V, Lobbestael E. Multiple-Hit Hypothesis in Parkinson's Disease: LRRK2 and Inflammation. *Front Neurosci* [Internet]. 2020 Apr 28 [cited 2022 Apr 12];14. Available from: </pmc/articles/PMC7199384/>
109. Kim B, Yang MS, Choi D, Kim JH, Kim HS, Seol W, et al. Impaired Inflammatory Responses in Murine Lrrk2-Knockdown Brain Microglia. *PLoS One* [Internet]. 2012 Apr 9 [cited 2022 Apr 12];7(4):34693. Available from: </pmc/articles/PMC3322140/>
110. Moehle MS, Webber PJ, Tse T, Sukar N, Standaert DG, Desilva TM, et al. LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses. *J Neurosci* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2022 Apr 12];32(5):1602. Available from: </pmc/articles/PMC3532034/>
111. Russo I, Berti G, Plotegher N, Bernardo G, Filograna R, Bubacco L, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 positively regulates inflammation and down-regulates NF- $\kappa$ B p50 signaling in cultured microglia cells. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2015 Dec 9 [cited 2022 Apr 12];12(1). Available from: </pmc/articles/PMC4673731/>
112. Gillardon F, Schmid R, Draheim H. Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity. *Neuroscience* [Internet]. 2012 Apr 19 [cited 2022 Apr 12];208:41–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22342962/>
113. Caesar M, Felk S, Zach S, Brønstad G, Aasly JO, Gasser T, et al. Changes in matrix metalloprotease activity and progranulin levels may contribute to the pathophysiological function of mutant leucine-rich repeat kinase 2. *Glia* [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 12];62(7):1075–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24652679/>

114. Choi I, Kim B, Byun JW, Baik SH, Huh YH, Kim JH, et al. LRRK2 G2019S mutation attenuates microglial motility by inhibiting focal adhesion kinase. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Sep 14 [cited 2022 Apr 12];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26365310/>
115. Russo I, Di Benedetto G, Kaganovich A, Ding J, Mercatelli D, Morari M, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 controls protein kinase A activation state through phosphodiesterase 4. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2018 Oct 27 [cited 2022 Apr 12];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30368241/>
116. Guhathakurta S, Bok E, Evangelista BA, Kim YS. Deregulation of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: Insight from epigenetic structure and transcriptional regulation of SNCA. *Prog Neurobiol*. 2017 Jul 1;154:21–36.
117. Funahashi Y, Yoshino Y, Yamazaki K, Mori Y, Mori T, Ozaki Y, et al. DNA methylation changes at SNCA intron 1 in patients with dementia with Lewy bodies. *Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 May 10];71(1):28–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pcn.12462>
118. McGregor BA, Schommer J, Guo K, Raihan MO, Ghribi O, Hur J, et al. Alpha-Synuclein-induced DNA Methylation and Gene Expression in Microglia. *Neuroscience*. 2021 Aug 1;468:186–98.
119. Teravskis PJ, Covelo A, Miller EC, Singh B, Martell-Martínez HA, Benneyworth MA, et al. A53T Mutant Alpha-Synuclein Induces Tau-Dependent Postsynaptic Impairment Independently of Neurodegenerative Changes. *J Neurosci* [Internet]. 2018 Nov 7 [cited 2022 May 10];38(45):9754–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30249789/>
120. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2022 May 10];55(2):164–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14755719/>
121. Rutherford NJ, Giasson BI. The A53E  $\alpha$ -synuclein pathological mutation demonstrates reduced aggregation propensity in vitro and in cell culture. *Neurosci Lett* [Internet]. 2015 Jun 5 [cited 2022 May 10];597:43–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25892596/>
122. Marchand A, Drouyer M, Sarchione A, Chartier-Harlin MC, Taymans JM. LRRK2 Phosphorylation, More Than an Epiphenomenon. *Front Neurosci* [Internet]. 2020 Jun 16 [cited 2022 May 11];14:527. Available from: </pmc/articles/PMC7308437/>
123. Jeong GR, Lee BD. Pathological Functions of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Cells* [Internet]. 2020 Nov 30 [cited 2022 May 11];9(12). Available from: </pmc/articles/PMC7759975/>
124. Aasly JO, Johansen KK, Brønstad G, Warø BJ, Majbour NK, Varghese S, et al. Elevated levels of cerebrospinal fluid  $\alpha$ -synuclein oligomers in healthy asymptomatic LRRK2 mutation carriers. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2022 May 11];6(SEP). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25309429/>

125. Ho PWL, Leung CT, Liu H, Pang SY, Lam CSC, Xian J, et al. Age-dependent accumulation of oligomeric SNCA/ $\alpha$ -synuclein from impaired degradation in mutant LRRK2 knockin mouse model of Parkinson disease: role for therapeutic activation of chaperone-mediated autophagy (CMA). *Autophagy* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 May 11];16(2):347. Available from: [/pmc/articles/PMC6984454/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32444558/)
126. Bieri G, Brahic M, Bousset L, Couthouis J, Kramer NJ, Ma R, et al. LRRK2 modifies  $\alpha$ -syn pathology and spread in mouse models and human neurons. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2019 [cited 2022 May 11];137(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927072/>
127. Chang C, Lang H, Geng N, Wang J, Li N, Wang X. Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: Important mediator of neurodegeneration in PD. *Neurosci Lett*. 2013 Aug 26;548:190–5.
128. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJA, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis*. 2011 Jun;42(3):360–7.
129. Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Ghingina C, et al. Plasma exosomal  $\alpha$ -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2014 Nov 1;128(5):639–50.
130. Zhao A, Li Y, Niu M, Li G, Luo N, Zhou L, et al. SNCA Hypomethylation in Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder Is a Potential Biomarker for Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 30];10(3):1023–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32444558/>

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Meliha Sümeyye AKAN

## Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

## Yabancı Dil(ler) ve Düzeyi

1. İngilizce (Orta)

## İş Deneyimi

1. Özel Isparta Hastanesi /Mesul Müdürlük
2. NEÜ Meram Tıp Fakültesi Hastanesi/Hastane Eczacılığı
3. Selçuk Ecza Deposu Isparta Şubesi/Mesul Müdürlük
4. Kılıç Eczanesi (Devam eden)

## Bilimsel Yayınlar ve Çalışmalar

1. *Rosa Damascena* MILL.'in Üzerinde Yapılan Farmakolojik ve Fitokimyasal Çalışmaların Araştırılması ve Ekonomik Açından Değerlendirilmesi (Araştırma Projesi Tezi)
2. The beneficial effect of salubrinal on neuroinflammation and neuronal loss in intranigral LPS-induced hemi-Parkinson disease model in rats (2022)