

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLUKOZİL SERAMİD AZ-BETA GEN MUTASYONLARININ DOPAMİNERJİK
NÖRONLARDA α -SİNÜKLEİN YIKIM MEKANİZMALARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gizem ÖNAL

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOZİL SERAMİDAZ-BETA GEN MUTASYONLARININ DOPAMİNERJİK NÖRONLARDA α -
SİNÜKLEİN YIKIM MEKANİZMALARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gizem ÖNAL

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Serap Dökmeci

ANKARA

2021

Onay Sayfası
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GLUKOZİL SERAMİD AZ-BETA GEN MUTASYONLARININ DOPAMİNERJİK NÖRONLARDA
 α -SİNÜKLEİN YIKIM MEKANİZMALARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Öğrenci: Gizem ÖNAL
Danışman: Prof. Dr. Serap DÖKMECİ

Bu tez çalışması 26.08.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Çetin KOCAEFE*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Köksal ÖZGÜL*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Özlen KONU*
Bilkent Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Bülent ELİBOL*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Nevin ERENŞOY*
Balıkesir Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

20 Eylül 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

20/09/2021

Gizem ÖNAL

i

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Gizem NAL

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bana değerli katkıları ile destek olan ve her zaman yol gösteren danışmanım sayın Prof. Dr. Serap DÖKMECİ'ye, tez çalışmalarına değerli yorumları ile katkıda bulunan tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Köksal ÖZGÜL ve Doç. Dr. Özlen KONU'ya, çalışmalarımda bana her konuda destek olan Prof. Dr. Aysel YÜCE, Prof. Dr. Bülent ELİBOL, Prof. Dr. Hülya DEMİR ve çalışmalarım süresince büyük özveri göstererek en yoğun zamanlarında bile desteğini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Gül YALÇIN ÇAKMAKLI'ya, Balıkesir Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki sayın hocam Prof. Dr. Nevin ERENŞOY'a, tez çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Lüksemburg Üniversitesi Translasyonel Tıp laboratuvarındaki değerli hocam Prof. Dr. Rejko KRÜGER'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma, tez çalışmalarına yardımlarından ve katkılarından dolayı Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Merkezi Sentetik Biyoloji laboratuvarındaki sayın hocam Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak ŞEKER'e ve laboratuvarındaki çalışma arkadaşım Cemile Elif ÖZÇELİK'e, bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve eğitimim süresince bana katkıda bulunan tüm hocalarıma, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım sevgili grup arkadaşım Doç. Dr. Emel UZUNOĞLU ÖZYÜREK'e, karşılaştığım en ufak sorunda bile yanımda olan ve her zaman desteklerini hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarıma ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve her türlü fedakarlığı gösteren canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (BİDEB 2228-B Yurtdışı Doktora bursu ve BİDEB 2214-A Uluslararası Araştırma Doktora Bursu) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TSA-2019-17559).

ÖZET

Önal, G. Glukozilseramidaz-Beta Gen Mutasyonlarının Dopaminerjik Nöronlarda α -sinüklein Yıkım Mekanizmaları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2021. Glukozilseramidaz-Beta (GBA1) Gen Mutasyonları Parkinson Hastalığı (PH) için tanımlanan en önemli risk faktörüdür. Klinik açıdan, nöronopatik olmayan Gaucher Hastalığı (GH) ile ilişkili 'hafif' GBA1 mutasyonları (N370S) ve nöronopatik GH ile ilişkili 'ağır' GBA1 mutasyonlarının (L444P ve D409H gibi), PH oluşturma riski, hastalık başlangıç yaşı, hastalığın prognozu ve semptomların ciddiyeti açısından farklı fenotipik etkileri olduğu bilinmektedir. PH'nin temel patolojik özelliklerinden biri, dopaminerjik nöronlarda Lewy cisimcikleri olarak bilinen oligomerik/fibriller α -sinüklein-pozitif inklüzyonların varlığıdır. Tez çalışmasında, α -sinükleinin hücresel yıkım mekanizmaları arasındaki ilişkiyi etkileyerek α -sinüklein birikimine neden olduğu ve böylece nörodejenerasyonda rol oynayabileceği hipotezi kurulmuştur. Bu doğrultuda, TipI (N370S/N370S genotipine sahip) ve TipIII Gaucher hastaları (L444P/L444P ve D409H/D409H genotiplerine sahip), bu hastaların heterozigot zorunlu taşıyıcı aile bireyleri (N370S/-, L444P/- ve D409H/- genotiplerine sahip), GBA1 mutasyonu taşımayan idyopatik PH hastası, heterozigot GBA1 mutasyonu taşıyan (N370S/-) PH hastası ve sağlıklı bireylerden oluşan bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Bireylerden elde edilen primer fibroblast hücreleri yeniden programlanarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelere dönüştürülmüş ve sonrasında dopaminerjik nöronlara farklılaştırılmıştır. Elde edilen hücre modellerinde α -sinüklein birikimi ve salınımı ile birlikte α -sinükleinin yıkımından sorumlu Ubikitin-proteozom sistemi (UPS), şaperon aracılı otofaji (ŞAO) ve makrotofaji mekanizmalarının araştırılmıştır. Hücrelerde monomerik α -sinükleinin D409H/D409H GBA1 genotipine sahip hücreler ile PH N370S/- hücrelerinde birikim göstermiştir. Oligomerik α -sinükleinin ve hücre dışına salınan α -sinüklein ise 'ağır' GBA1 (D409H ve L444P) homozigot mutant hücrelerde ve PH N370S/- hücrelerinde arttığı saptanmıştır. ER stresinin ve total ubikitinlenme oranlarının 'ağır' (L444P ve D409H) homozigot GBA1 mutasyonu olan hücrelerde ve PH bireylerin hücrelerinde anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. Kontrol hücrelere kıyasla, tüm GBA1 mutant hücrelerde proteozom aktivitelerinde anlamlı şekilde azalma tespit edilmiştir. Hücrelerde ŞAO mekanizmasında 'hafif' (N370S) homozigot GBA1 mutasyonuna sahip hücrelerde aksaklıklar olduğu tespit edilmiştir. Makrotofaji mekanizması incelendiğinde, N370S/N370S ve D409H/D409H genotipine sahip bireylerin hücrelerinde otofagozom oluşumunun azaldığı, L444P/L444P genotipine sahip bireyin hücrelerinde otofagozom-lizozom füzyonunda bozukluklar olduğu tespit edilmiştir. iPH ile PH N370S/- hastaları kıyaslandığında, PH N370S/- hücrelerinde hem otofagozom oluşumu hem de otofagozom-lizozom füzyonunda aksaklıklar olduğu saptanmıştır. 'Ağır' GBA1 mutasyonlarının oligomerik α -sinüklein birikimi ve salınımını tetikleyerek hücrelerde daha çok ER stresi ve makrotofaji mekanizmasını etkilemesi, bunun yanı sıra 'hafif' GBA1 mutasyonlarının daha çok monomerik α -sinüklein birikimi ve monomerik α -sinüklein yıkımından sorumlu ŞAO mekanizmasını etkilemesi 'hafif' ve 'ağır' GBA1 mutasyonlarına ilişkin klinik verilerin moleküler temelini aydınlatmaya yönelik ön veri oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glukoserebrosidaz-beta (GBA1), Parkinson Hastalığı, α -sinüklein, ubikitin proteozom sistemi, şaperon aracılı otofaji, makrotofaji

ABSTRACT

Önal, G. Investigation of the Effects of Glucosylceramidase-Beta Gene Mutations on α -Synuclein Degradation Mechanisms in Dopaminergic Neurons. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2021.

Glucosylceramidase-Beta (GBA1) Gene Mutations are the most important risk factor identified for Parkinson's Disease (PD). Clinically, 'mild' GBA1 mutations (such as N370S) associated with non-neuropathic Gaucher Disease (GD) and 'severe' GBA1 mutations (such as L444P and D409H) associated with neuropathic GD are known to have different phenotypic effects of developing PD, age at disease onset, prognosis, and symptoms, in terms of severity. One of the main pathological features of PD is the presence of oligomeric/fibrillar α -synuclein-positive inclusions, known as Lewy bodies, in dopaminergic neurons. In this study, we hypothesized that GBA1 mutations cause accumulation of α -synuclein by affecting the crosstalk between cellular protein degradation mechanisms and cause neurodegeneration. Accordingly, Type I GD patient (N370S/N370S genotype) and Type III GD patients (L444P/L444P and D409H/D409H genotypes), heterozygous obligatory carriers whom are the family members of these patients (N370S/-, L444P/- and D409H/- genotypes), idiopathic PD patient without GBA1 mutation, PD patient with heterozygous GBA1 mutation (N370S/-) and healthy individuals. Primary fibroblasts obtained from individuals were reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) and then differentiated into dopaminergic neurons. It was aimed to investigate the ubiquitin-proteasome system (UPS), chaperone-mediated autophagy (CMA) and macroautophagy mechanisms which are responsible for the degradation of α -synuclein and thereby the accumulation and release of α -synuclein in these cells. Monomeric α -synuclein accumulated in D409H/D409H GBA1 mutant cells and PH N370S/- cells, while oligomeric α -synuclein and extracellular release of α -synuclein were found to be increased in 'severe' GBA1 (D409H and L444P) homozygous mutant cells and PH N370S/- cells. It was determined that ER stress and total ubiquitination rates were significantly increased in cells with 'severe' (L444P and D409H) homozygous GBA1 mutations and cells from PD patients. A significant decrease in proteasome activities was detected in all GBA1 mutant cells compared to control cells. Dysfunction in the CMA mechanism in cells with a 'mild' (N370S) homozygous GBA1 mutation was detected. When the macroautophagy mechanism in iPSC derived dopaminergic neurons was examined, it was determined that the formation of autophagosomes decreased in the cells of individuals with the N370S/N370S and D409H/D409H genotypes, and there were defects in autophagosome-lysosome fusion in the cells of the individuals with the L444P/L444P genotype. When iPD and PD N370S/- patients were compared, it was found that there were defects in both autophagosome formation and autophagosome-lysosome fusion in PD N370S/- cells. 'Severe' GBA1 mutations affect more ER stress and macroautophagy mechanism in cells by triggering oligomeric α -synuclein accumulation and release, while 'mild' GBA1 mutations affect monomeric α -synuclein accumulation and CMA mechanism responsible for monomeric α -synuclein degradation. These results may explain the molecular basis of the clinical PD data related to 'mild' and 'severe' GBA1 mutations.

Key words: Glucocerebrosidase beta, Parkinson's Disease, α -synuclein, ubiquitin proteasome system, chaperone-mediated autophagy, macroautophagy

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. GBA1 geni ve β -Glukoserebrosidaz enzimi	4
2.2. α -sinüklein	8
2.3. Parkinson Hastalığı'nda GBA1'in Olası Patolojik Mekanizmaları	12
2.4. GBA1-PH Hastalık Modelleri	18
2.5. α -sinüklein Yıkım Mekanizmaları	21
2.5.1. α -sinükleinin Ubikitin Proteazom Sistemi (UPS) ile Yıkımı	22
2.5.2. α -sinükleinin Şaperon Aracılı Otofaji (ŞAO) ile Yıkımı	24
2.5.3. α -sinükleinin Makrootofaji ile Yıkımı	26
2.6. Amaç	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereçler	31
3.1.1. Hücre Kültürü	31
3.1.2. Hücre Transfeksiyonu	32
3.1.3. β -Glukoserebrosidaz Enzim Aktivite Ölçümü	32
3.1.4. Proteazom Aktivite Ölçümü	32
3.1.5. İmmünfloresan Boyama	33
3.1.6. Protein izolasyonu ve Kantitasyonu	33

3.1.7. İmmünblotlama	34
3.1.8. WES	34
3.1.9. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (dQCM) Analizi	34
3.1.10. Antikorlar	35
3.2. Yöntemler	37
3.2.1. Çalışma Grubuna Dahil Edilen Bireylerin Demografik Bilgileri	37
3.2.2. Primer Fibroblast Kültürlerinin Kurulması	39
3.2.3. Primer Fibroblast Hücrelerin İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelere Yeniden Programlanması	40
3.2.4. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	41
3.2.5. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Dopaminerjik Nöron Hücrelerine Farklılaştırılması	42
3.2.6. İmmünfloresan boyama	44
3.2.7. Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	45
3.2.8. İmmünblotlama	45
3.2.9. WES	47
3.2.10. Proteazom Aktivite Ölçümü	47
3.2.11. β -Glukoserebrosidaz Enzim Aktivite Ölçümü	48
3.2.12. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (dQCM) Analizi	49
3.2.13. Verilerin Analizi	50
4. BULGULAR	51
4.1. Primer Fibroblast Kültürlerin Epizomal Yeniden Programlama ile iPKH'lere Dönüştürülmesi	51
4.2. iPKH'lerin Karakterizasyonu	52
4.2.1. iPKH'lerin Kök Hücre Özelliklerinin Belirlenmesi	52
4.2.2. iPKH'lerin Karyotip Analizleri	53
4.2.3. iPKH'lerin Pluripotent Özelliklerinin Belirlenmesi	55
4.3. iPKH'lerin Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırılması ve Nöronal Kültürlerin Karakterizasyonu	56
4.4. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda β -Glukoserebrosidaz (GCaz)	

enzim ifade ve aktivitesinin belirlenmesi	60
4.5. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda α -sinüklein ifadesi ve hücre dışına salınımının belirlenmesi	63
4.6. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda Ubikitin Protezom Sistemi Aracılı Protein Yıkımı	70
4.7. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda Şaperon Aracılı Otofaji ile protein yıkımı	75
4.8. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda makrotofaji ile protein yıkımı	77
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	98
6.1. Sonuçlar	98
6.2. Öneriler	100
7. KAYNAKLAR	101
8. EKLER	126
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Tez Çalışması Dijital Makbuz	
9.ÖZGEÇMİŞ	129

SİMGELER ve KISALTMALAR

-	Eksi
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
11-MUA	<i>Mercapto unodecanoic acid</i>
4Mu-β-Glc	<i>4-methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside</i>
AA	Askorbik asit
APS	Amonyum persülfat
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATP13A2	<i>ATPase Cation Transporting 13A2</i>
AU	<i>Arbitrary Unit</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Ca ⁺²	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
DA	Dopaminerjik nöron
DAPI	<i>4',6-diaminodino-2-phenylindole</i>
dbcAMP	<i>Dibutyryl cyclic-AMP</i>
DJ1	<i>Parkinsonism Associated Deglycase</i>
dk	Dakika
DM	Dorsomorfin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
DQCM	<i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation</i>
E1	Ubikitin-aktive edici enzim
E2	Ubikitin-konjuge edici enzim
E3	Ubikitin-ligaz
EDC	<i>1-Ethyl-3- (3-dimethylamiopropyl carbodiimide</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis β-aminoethyl ether -N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrasodium salt</i>
ER	Endoplazmik retikulum

ERAD	ER ile ilişkili yıkım mekanizmaları
EtOH	Etanol
FBS	Fetal sığır serumu
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FGF8b	<i>Fibroblast Growth Factor 8b</i>
GBA1	<i>GTP binding protein type A1, Glucosylceramidase Beta</i>
GCaz	β -Glukoserebrosidaz
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GH1	Gaucher Hastalığı Tip I
GH2	Gaucher Hastalığı Tip II
GH3	Gaucher Hastalığı Tip III
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HEPES	4- 2-hidroksietil -1-piperazineetansulfonik asit
hESC	<i>Human embryonic stem cell</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Hsc70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
Ig	İmmünoglobulin
IRE1α	<i>Inositol-requiring kinase 1α</i>
ITS	<i>Insulin-Transferrin-Selenium</i>
iPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
Klf4	<i>Kruppel Like Factor 4</i>
KOSR	<i>Knockout serum replacement</i>
KPY	Katlanmamış protein yanıtı
LAMP2A	Lizozomal membrane protein tip 2A
LIMP2	Lizozomal integral membran protein-2
LRRK2	<i>Leucine Rich Repeat Kinase 2</i>
M	Molar
MAP1LC3A	Mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3A
mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MSS	Merkezi sinir sistemi
N2B27	Modifiye nöronal hücre kültürü besiyeri
NAC	<i>Non-amyloid β component of plaques</i>
NaCl	Sodyum Klorür
Nanog	<i>Nanog Homeobox</i>
ng	Nanogram
NHS	<i>N-Hydroxysuccimide</i>

nM	Nanomolar
nm	Nanometre
OCT3/4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OD	Optik dansite
OLY	Otofaji-Lizozom Yolağı
Otx-2	<i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	<i>Protein disulfide-isomerase</i>
Pen/Strep	Penisilin-Streptomisin
PERK	<i>Protein kinase RNA-activated PKR-like ER kinase</i>
PFA	Paraformaldehide
PH	Parkinson Hastalığı
PI3P	<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
PINK1	<i>PTEN Induced Kinase 1</i>
Pur	<i>Purmorphamine</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
RFU	Rölatif floresan ünite
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
smNPC	<i>Small molecule Neuronal Progenitor Cells</i>
sn	Saniye
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNCA	Alpha-Synuclein
Sox17	<i>SRY-Box Transcription Factor 17</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
ŞAO	Şaperon aracılı otofaji
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
TGFβ1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TGFβ3	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>
TH	Tirozin hidroksilaz
TIM	Triozfosfat izomeraz
TUBBIII	Sınıf 3 β-tübülin
U	Ünite
Ub	Ubikitin
UPDRS	Birleşik Parkinson Hastalığı Derecelendirme Ölçeği
UPS	Ubikitin Proteozom Sistemi
UV	Ultraviyole
VMAT2	<i>Dopamine-transporting vesicular transporter 2</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Gaucher Hastalığı'nda görülen fenotipik süreklilik spektrumu	6
2.2. α -sinükleinin yapısal formlarının şematik gösterimi	10
2.3. α -sinüklein birikiminde β -Glukoserebrosidaz (GCaz) enziminin potansiyel rollerini açıklamaya yönelik öne sürülen hipotezler	16
2.4. PH patolojisinde ER stresi, otofaji ve dopaminerjik nörodejenerasyonu arasında önerilen çapraz bağlantı modeli	22
2.5. α -sinükleinin ŞAO mekanizması ile lizozomal yıkımı	25
2.6. Makrotofaji mekanizmasının temel basamakları	27
3.1. Plasmid yeniden programlama yöntemi ile fibroblast hücrelerinin iPKH kolonilerine dönüşüm aşamaları	41
3.2. iPKH'lerin nöron progenitör hücrelerine (small molecule Neuronal Progenitor Cells (smNPC)) farklılaştırılması protokolü	43
3.3. iPKH'lerin nöron progenitör hücrelerine (small molecule Neuronal Progenitor Cells (smNPC)) farklılaştırılması protokolü	44
4.1. (A) Yeniden programlama öncesinde kültüre edilen primer fibroblast hücreleri. (B) Primer fibroblast hücrelerin yeniden programlanması sonucu elde edilen iPKH kolonileri (Büyütme: (A)20X (B)10X)	52
4.2. Kök hücre transkripsiyon faktörlerinin (Oct4, Sox2 ve Nanog) iPKH'lerde ifade ve yerleşiminin görüntüsü (Ölçek çubuğu: 50 μ m)	53
4.3. Moleküler karyotipleme ile elde edilen analiz sonucu örnekleri	54
4.4. iPKH kolonilerinin 3 farklı germ tabakasına farklılaştırıldıktan sonra ifade ettikleri germ tabakalarına özgül belirteçlerin (A) ektoderm için Otx2; (B) Endoderm için SOX17 ve (C) Mezoderm için Brachyury immüno Floresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63x)	55
4.5. Nöron progenitör hücrelerde nörona özgül belirteçlerin (Nestin, Musashi, Sox1 ve Sox2) ifadesinin immüno Floresan görüntüleri (Ölçek çubuğu: 50 μ m)	57
4.6. Nöron progenitör hücrelerin dopaminerjik nöronlara farklılaştırılması sürecinde farklılaşmanın (A) 21., (B) 30. ve (C) 40. günlerinde hücrelerin morfolojik görüntüleri (Büyütme A ve B: 20X, C: 10X)	58
4.7. Nöronal farklılaşma sonrası hücre gruplarında nöron belirteci Sınıf 3 β -tübülin (TUBBIII, yeşil) ve dopaminerjik nöron belirteci tirozin hidroksilaz (TH, kırmızı) ifadelerinin immüno Floresan görüntüleri (Ölçek çubuğu: 10 μ m)	59

- 4.8.** iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda tirozin hidroksilaz ifade seviyelerini gösteren immünblot analizi görüntüsü 60
- 4.9.** GCaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *** ve **** ile gösterilmiştir (RFU: rölatif floresan ünite, n=3, ***: p<0,001, ****: p<0,0001) 61
- 4.10.** (A) 40 gün farklılaştırılmış iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda GCaz ve LIMP2 protein ifade seviyelerini gösteren immünblot analizi görüntüsü. Kontrol ve GBA1 gen mutasyonlarına sahip hücrelerde GAPDH ifadesine normalize edilmiş (B) GCaz (C) LIMP2 ifadelerinin grafiği. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *** ve **** ile gösterilmiştir (n=3, ***: p<0,001, ****: p<0,0001) 62
- 4.11.** (A) iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda uygulama yapılmamış bazal koşullarda ve 24 saat boyunca 100 nM MG132 proteazom inhibitörü uygulanmış koşullarda hücre içi α -sinüklein protein ifade seviyelerini gösteren immünblot analizi görüntüsü. (B) Kontrol ve GBA1 mutant hücrelerde GAPDH ifadesine normalize edilmiş α -sinüklein bantlarının optik yoğunluklarının grafiği. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *** ve **** ile gösterilmiştir (n=3, ***: p<0,001, ****: p<0,0001) 65
- 4.12.** (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde oligomer/fibriller yapıdaki α -sinükleinin (yeşil) ve çekirdeklerin (mavi) immünfloresan görüntüleri (Büyütme: 63X). (B) Hücrelerde oligomer/fibriller yapıdaki α -sinükleinin immünfloresan intensite kantitasyon analizi sonuçları 'Arbitrary Unit (AU)' olarak gösterilmiştir. (Veriler her bir hücre grubundan 20'şer hücre analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *, *** ve **** ile gösterilmiştir (*: p<0,05, ***: p<0,001, ****: p<0,0001) 67
- 4.13.** 90 gün boyunca farklılaştırılmış iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinin 90. günde toplanan besiyerlerinde transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri 68
- 4.14.** (A) 90 gün boyunca farklılaştırılmış iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinin 90. günde toplanan besiyerlerinde dQCM analizi sonucunda elde edilen frekans değişimi-zaman grafikleri gösterilmektedir. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlardan besiyerlerine salınan α -sinüklein molekülleri dQCM çipinin yüzeyine önceden bağlanmış olan rekombinant monomerik α -sinüklein moleküllerine bağlanmakta ve bu bağlanma sonucu frekans değişimi olarak ölçülmektedir. dQCM tekniğinin detayları Bölüm 3.2.12'de anlatılmıştır. Sarı, mavi, yeşil ve kırmızı renklerde gösterilen eğriler farklı frekans değerlerinde aynı örnek için alınan ölçümleri göstermektedir. Verilerin kantitasyonunda tüm farklı frekans

aralıklarında alınan değerlerin ($\Delta F3$, $\Delta F5$, $\Delta F7$ ve $\Delta F9$) ortalaması kullanılmıştır. (B) dQCM datasının kantitasyonu sonucunda elde edilen frekans değişimi grafiği. Sonuçlar total protein miktarlarına oranlanarak normalize edilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamli farklılık belirlenen gruplar *, ** ve *** ile gösterilmiştir (n=3, *: p<0,05, **: p<0,001, ***: p<0,0001)

69

4.15. 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde BiP ve PDI ER stresi belirteçlerinin immünblot görüntüsü (A) ve kantitasyon grafikleri (B ve C). İmmünblot bantlarının intensite değerleri β -Aktin bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamli farklılık belirlenen gruplar *, ** ve *** ile gösterilmiştir (*: p<0,05 **: p<0,001; ***: p<0,0001)

71

4.16. 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde total ubikitinlenmiş proteinlerin immünblot görüntüsü (A) ve kantitasyon grafiği (B). İmmünblot bantlarının intensite değerleri GAPDH bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamli farklılık belirlenen gruplar * ile gösterilmiştir (*: p<0,05)

73

4.17. GBA1 mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde (A) tripsin benzeri, (B) kaspaz benzeri ve (C) kimotripsin benzeri proteazom aktivitesi farklılaşmadan 40 gün sonra bazal koşullarda ölçülmüştür. RFU olarak ölçülen floresan ışıma değeri protein konsantrasyonlarına normalize edilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamli farklılık belirlenen gruplar *, ** ve *** ile gösterilmiştir (RFU: rölatif floresan ünite, n=3, *: p<0,05, **: p<0,001, ***: p<0,0001).

74

4.18. (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde Şaperon aracılı otofaji belirteçleri Hsc70 (C) ve LAMP2A (A) proteinlerinin ifade analizlerinin immünblot görüntüleri. Hsc70 (D) ve LAMP2A (B) protein ifadelerinin kantitasyon grafikleri. İmmünblot bantlarının intensite değerleri GAPDH bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamli farklılık belirlenen gruplar * ve ** ile gösterilmiştir (*: p<0,05; **: p<0,01).

76

4.19. (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde Şaperon aracılı otofaji belirteçleri Hsc70 (kırmızı) ve LAMP2a (yeşil) immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63X). (B) Hürelerde Hsc70 ve LAMP2a'nın eş yerleşim kantitasyon sonuçları Pearson's coefficient kullanılarak hesaplanmıştır. (Veriler her bir hücre grubundan 20'şer hücre analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamli farklılık belirlenen gruplar * ile gösterilmiştir (*: p<0,05)

78

- 4.20.** (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde makro otofaji belirteçleri LC3 ve p62 proteinlerinin ifade analizlerinin immünblot görüntüsü. LC3 (B) ve p62 (C) protein ifadelerinin kantitasyon grafikleri. İmmünblot bantlarının intensite değerleri GAPDH bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar * ve ** ile gösterilmiştir (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$) 79
- 4.21.** 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde p62 (kırmızı) ve DAPI (mavi) immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63X) 80
- 4.22.** (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde Makrotofaji belirteçleri LAMP1 (kırmızı) ve LC3 (yeşil) immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63X). (B) Hürelerde LC3 ve LAMP1'in eş yerleşim kantitasyon sonuçları Pearson's coefficient kullanılarak hesaplanmıştır. (Veriler her bir hücre grubundan 20'şer hücre analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar ** ve **** ile gösterilmiştir (**: $p<0,01$, ****: $p<0,0001$) 81
- 4.23.** GBA1 mutasyonlarının ER ve lizozoma ilişkin yollardaki etkileri. 82

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. İmmünfloresan boyama, immünblotlama ve WES çalışmaları kullanılan antikorlar, seyreltme oranları ve inkübasyon koşulları	35-37
3.2. Deri biyopsi örneklerinin elde edildiği bireylerin demografik verileri	38
3.3. SDS-PAGE'de kullanılan jellerin bileşimi	46
4.1. Episomal yeniden programlama yönteminde kullanılan plazmidlerin safılık ve miktar tayini sonuçları	51



1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilen nörodejeneratif bozukluktur. PH ile ilişkili genetik faktörlerin yanı sıra, çevresel faktörlerin de hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Genetik faktörler arasında, bugüne kadar PH ve diğer sinükleopatiler için tanımlanan en yaygın risk faktörünün, glukoserebrosidaz beta (GBA1) genindeki mutasyonlar olduğu rapor edilmiştir (1). GBA1 geni lizozomal bir asit hidrolaz olan ve lizozomal glukozilseramidleri ve glukozilsfingozinleri parçalayan Glukoserebrosidaz (GCaz) enzimini kodlamaktadır (2). Homozigot GBA1 gen mutasyonları durumunda, en sık görülen lizozomal depo hastalığı olan Gaucher Hastalığı (GH) tablosu ile karşılaşılmaktadır. Hem GH hastalarında hem de GBA1 mutasyonu taşıyıcılarında PH geliştirme riskinde anlamlı artış olduğu rapor edilmiştir (1). GBA1 mutasyonlarının 20 ila 30 kat PH geliştirme riski oluşturduğu ve PH hastalarının en az %7 ila 10'unun GBA1 mutasyonlarına sahip olduğu tahmin edilmektedir (1, 3, 4). GBA1 mutasyonları ile ilişkili PH hastalarında, daha erken hastalık başlangıç yaşı ve daha fazla bilişsel bozukluk eğilimi görülmektedir (1). Yapılan klinik çalışmalar, GH'nin nöronopatik olmayan formu (GH1) ile ilişkili 'hafif' GBA1 mutasyonları ile GH'nin nöronopatik formlarıyla (GH2 ve GH3) ilişkili 'ağır' GBA1 mutasyonlarının, PH semptomları açısından anlamlı farklılıklar gösterdiğini rapor etmektedir (5, 6). 'Hafif' ve 'ağır' GBA1 mutasyonlarının PH oluşturma riski, hastalık başlangıç yaşı, hastalığın prognozu ve semptomların ciddiyeti açısından farklı fenotipik etkileri olduğu gösterilmiştir. Söz konusu klinik farklılıkların altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmaktadır.

GBA1 gen mutasyonları ile α -sinüklein birikimi arasındaki moleküler ilişki ilk olarak, GCaz substratı olan glukosilseramidin lizozomal birikiminin α -sinüklein birikimine yol açabileceğini, bununla birlikte, hücrede biriken α -sinükleinin de GCaz enziminin ER'den lizozoma geçişini inhibe ederek enzim aktivitesinde azalmaya yol açabileceğini öne süren 'çift yönlü patolojik döngü' ile açıklanmıştır (7). Sonrasında, GCaz ile α -sinüklein birikimi arasındaki patolojik durumu açıklamaya yönelik olarak iki temel teoriyi destekleyen farklı hipotezler öne sürülmüştür. GCaz fonksiyon kazanımı teorisine göre, GBA1 gen mutasyonları sonucu oluşan yanlış katlanmış GCaz enziminin hücrede farklı fonksiyonlar

kazanarak lizozomal fonksiyon bozukluğu, ER stresinin artması, Ubikitin Proteazom Sistemi (UPS) yolağının ve otofaji mekanizmasının bozulması gibi durumlara yol açarak α -sinüklein birikimini tetikleyebileceği öngörülmektedir (8, 9). GCaz fonksiyon kaybı teorisine göre ise, GCaz fonksiyon eksikliği sonucu glukosilseramit birikiminin hücrel lipit homeostazını değiştirerek α -sinükleinin lipitlere direkt olarak bağlanarak çekirdeklenmesini, hücre içi trafiğini ve lokalizasyonunu etkileyerek birikimine neden olabileceği düşünülmektedir (8, 9). Yapılan çalışmalarda, GCaz ve α -sinüklein birikimi arasındaki patolojik ilişki kanıtlanmış olsa da, konuya ilişkin hipotezler hala araştırılmaktadır.

Literatürde, GCaz enzim eksikliğinin hem Otofaji Lizozom Yolağı (OLY) hem de Ubikitin Proteazom Sistemi (UPS) mekanizmalarında fonksiyon kaybına neden olduğu rapor edilmiştir (10). Dolayısıyla, GBA1 mutasyonlarının hücrel yıkım mekanizmalarını etkileyerek protein homeostazını bozduğu ve α -sinüklein birikimine neden olduğu düşünülebilir. Bu bağlamda, tez çalışmasında nöronopatik olmayan Gaucher Hastalığı ile ilişkili 'hafif' GBA1 mutasyonları (N370S gibi) ve nöronopatik olan Gaucher Hastalığı ile ilişkili 'ağır' GBA1 mutasyonlarının (L444P ve D409H gibi), α -sinükleinin hücrel yıkım mekanizmaları arasındaki ilişkiyi etkileyerek α -sinüklein birikimine neden olduğu ve böylece nöronal dejenerasyonda rol oynayabileceği hipotezi kurulmuştur. Bu doğrultuda, nörolojik tutulumu olmayan Tip I (N370S/N370S genotipine sahip) ve nörolojik tutulum gösteren Tip III GH hastaları (L444P/L444P ve D409H/D409H genotiplerine sahip), bu hastaların heterozigot zorunlu taşıyıcı aile bireyleri (N370S/-, L444P/- ve D409H/- genotiplerine sahip), idyopatik Parkinson hastası, heterozigot GBA1 mutasyonu taşıyan (N370S/-) Parkinson hastası ve sağlıklı bireylerden oluşan bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışmada;

- Çalışma grubundaki bireylerden elde edilen primer fibroblast hücrelerinin yeniden programlanarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelere çevrilmesi ve daha sonra dopaminerjik nöron kültürlerine farklılaştırılması,
- GBA1 mutasyonlarının GCaz enzim aktivitesi, ifadesi ve yerleşimine etkilerinin iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde değerlendirilmesi,
- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde monomerik ve birikime yatkın oligomerik α -sinüklein birikimin araştırılması,

- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde GBA1 mutasyonlarının α -sinükleinin hücre dışına salınımına etkilerinin araştırılması,
- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde GBA1 mutasyonlarının ER stresi ve Ubikitin proteozom aracılı yıkıma etkilerinin araştırılması,
- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde GBA1 mutasyonlarının α -sinüklein yıkımından sorumlu otofajik yollar olan şaperon aracılı otofaji ve makrotofaji aracılı yıkıma etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Elde edilen verilere göre, 'hafif' ve 'ağır' GBA1 mutasyonları durumunda, hem α -sinüklein birikim ve salınımında hem de α -sinükleinin yıkım mekanizmalarında farklılıklar görülmesi, farklı GBA1 mutasyonlarının PH semptomlarında tespit edilen farklılıkları anlamak adına ön veri sağlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GBA1 geni ve β -Glukoserebrosidaz enzimi

β -Glukoserebrosidaz enzimini kodlayan GBA1 (GTP binding protein type A1) geni, yaklaşık ~7,6 kb uzunluğundadır ve 11 ekzondan oluşmaktadır (11). GBA1 geni, gen açısından zengin bir bölge olan kromozom 1q21 bölgesinde yer almaktadır. Şimdiye kadar GBA geninde nokta mutasyonları, çerçeve kayması mutasyonları, *splicing* mutasyonları ve *pseudogen* dizilerini de kapsayan rekombinant alleller dahil olmak üzere 400'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır (12).

GBA1 geni tarafından kodlanan β -Glukoserebrosidaz (veya asit β -glukosidaz, EC: 4.2.1.25) (GCaz) enzimi, 497 amino asitten oluşan bir lizozomal asit hidrolazdır. GCaz enziminin asıl işlevi, lizozomal glukoserebroziti seramit ve glukoz indirgemektir, aynı zamanda enzimin glukozilsfingosin ve potansiyel olarak diğer β -glukozitleri de parçaladığı bilimektedir (2). Ayrıca, GCaz enziminin transglukozilasyon aktivitesi ile sterilglukozit sentezini gerçekleştirdiği ve kolesterol metabolizmasında rol oynadığı da gösterilmiştir (13). GCaz enzimi, Endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenerek lizozomal integral membran protein-2 (LIMP2) aracılığı ile lizozoma taşınmaktadır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, LIMP2 aracılı bu taşınmanın mannoz-6-fosfat yolağından bağımsız gerçekleştirildiğini göstermiştir (11). Lizozoma taşınması sırasında, GCaz çeşitli modifikasyonlara uğramaktadır. İki fonksiyonel ATG başlatma bölgesine sahip olan GCaz, 536 veya 516 aa uzunluğunda kopyalanmaktadır ve daha sonra 19 aa veya 39 aa uzunluğunda lider peptit dizilerinin kesilmesi ile fonksiyonel 497 aa uzunluğundaki enzime dönüştürülmektedir (14). Lizozomun asidik lümenine ulaştığında aktivatör proteini sapozin C ile etkileşerek aktif hale gelen GCaz enzimi, substratları olan glukozilseramit ve glukozilsfingosini hidrolize ederek glukoz, seramit ve sfingozine parçalamaktadır.

GCaz enzimi 3 domaine sahiptir (15): Domain-1, (rezidü 30-75 ve 431-497) bir antiparalel β -tabakadan oluşmaktadır. Domain-2, (rezidü 30-75 ve 431-497) immünoglobulin (Ig) katlanmasına benzeyen 8 iplikli bir beta varil yapısına sahiptir.

Domain 3 (rezidü 76-381 ve 416-430), aktif bölgeyi içeren bir $(\beta/\alpha)_8$ triozfosfat izomeraz (TIM) varil yapısından oluşmaktadır. Domain 3 içerisinde yer alan Glu 340 ve Glu 235 rezidülerinin meydana getirdiği 'katalitik çift', enzimin aktif bölgesini oluşturmaktadır (16).

GBA1 gen mutasyonları, otozomal resesif geçişli lizozomal depo hastalığı olan Gaucher Hastalığı'na (GH, OMIM #230800, #230900, and #231000) neden olmaktadır. Gaucher Hastalığı'nın prevalansı yaklaşık 1: 100.000'dir ve insidansı 1:40.000 ila 1:60.000 arasında değişmektedir (17). GH'de, GCaz enzim eksikliğine bağlı olarak özellikle makrofaj hücrelerinin lizozomlarında substrat birikimi görülmektedir. Substrat birikimi nedeniyle mega boyutlarda lizozomlara sahip olan makrofaj hücrelerine 'Gaucher hücreleri' denilmektedir (18). Gaucher hücrelerinin karaciğer, dalak, akciğer, böbrek ve beyin gibi çeşitli dokulara infiltrasyonu sonucunda, hepatosplenomegali, anemi, trombositopeni, iskelet ve kemik tutulumu ile nörolojik semptomlar gibi klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Nörolojik semptomların varlığına ve şiddetine göre Gaucher Hastalığı klinik açıdan 3 alt tipe ayrılmaktadır: Tip I (nöronopatik olmayan form, GH1), Tip II (akut infantil-nöronopatik form, GH2) ve Tip III (kronik-nöronopatik form, GH3) (19). Tip I; hematolojik semptomlar, organomegali ve kemik tutulumu ile karakterizedir ve tüm GH vakalarının yaklaşık %90-95'ini kapsamaktadır. GH1 hastaları nörolojik tutulum göstermemekle birlikte, diğer klinik veriler asemptomatik bulgulardan ağır organ ve kas tutulumuna kadar yüksek heterojenite göstermektedir (20). Bazı vakalar yaşam boyunca 'asemptomatik' kalabilir. Tip II en şiddetli nörolojik semptomların görüldüğü klinik formdur ve genellikle yaşamın ilk iki yılında ölümle sonuçlanmaktadır (21). Tip III, organomegali, bilişsel problemler, göz hareketi anormallikleri, nöbetler ve kemik tutulumu da dahil olmak üzere çeşitli semptomlara sahip geç başlangıçlı nöronopatik formdur. Gaucher Hastalığı'nda görülen multisistemik semptomlar, çoğu zaman vakaların net bir şekilde klinik alt tiplerine (GH1, GH2 ve GH3) sınıflandırılmasına engel olacak derecede geniş bir fenotipik çeşitlilik sunmaktadır (22). Bu durumda görülen fenotipik süreklilik (*phenotypial continuum*) olgusunun, Gaucher Hastalığı

nörolojik özelliklerin (GH2 ve GH3 alt tiplerinde olduğu gibi) ortaya çıkmasıyla ilişkilidir (26).

Gaucher Hastalığı ile ilişkili 'hafif' semptomlara neden olduğu bilinen N370S mutasyonu, GCaz enziminin Domain I ve Domain II arasındaki 'loop 3' adı verilen α helikal bölgesinde gerçekleşmektedir (27). Rezidü 370 enzimin aktif bölgesinden uzak olmasına rağmen, bulunduğu bölgede oluşturduğu hidrojen bağı etkileşimleri ile substrat bağlanmasını etkileyerek enzimin aktif bölgesinin yapısının korunmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (28). Rezidü 370'te bulunan Asparjin, Serine değiştiğinde, 'loop 3' bölgesindeki stabilitenin azalması sonucu substratın enzime bağlanması engellenmektedir (28). N370S mutasyonunun enzimin yapısında değişikliklere neden olmaktan ziyade, substrat bağlanmasını engelleyerek patolojiye neden olabileceği düşünülmektedir. 'Ağır' klinik semptomlar ve şiddetli nörolojik belirtilerle ilişkilendirilen L444P mutasyonu, Domain II'nin TIM varil motifi ile etkileşimde olduğu hidrofobik kor bölgesinde gerçekleşmektedir. Rezidü 444'ün yer aldığı Domain II'nin enzimin aktif bölgesinden uzak olduğu bilinmekle birlikte, enzimin koaktivatörü olan Saposin C ile etkileşiminin bu bölgeden olabileceği tahmin edilmektedir (27). L444P mutasyonu durumunda, rezidü 444'te yer alan lösinin proline değişiminin, Domain II'deki kor bölgenin hidrofobisite özelliğinde değişikliklere neden olarak GCaz enziminin yapısında bozulmalara neden olabileceği ve mutasyonun enzimin yıkımı ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (28, 29). Nöronopatik GH'ye neden olduğu bilinen 'ağır' mutasyonlardan bir diğeri olan D409H mutasyonunun gerçekleştiği Asparjin 409 rezidüsü, Domain I'de yer almaktadır ve Serin 97 rezidüsü ile hidrojen bağı etkileşiminde bulunmaktadır. D409H mutasyonu durumunda, Asp rezidüsü yerine kodlanan His rezidüsü, Prolin 98-99 rezidüleri ile etkileşime girerek yapısal olarak çok katı bir form ile sonuçlanmaktadır ve bu nedenle Domain I'in yapısal stabilitesinin azalmasına neden olmaktadır (29). Dolayısıyla, D409H mutasyonu sonucunda yanlış katlanmış enzimin ER'de tutulumunun arttığı ve enzimin yıkımı ile sonuçlandığı bildirilmiştir (30).

2.2. α -sinüklein

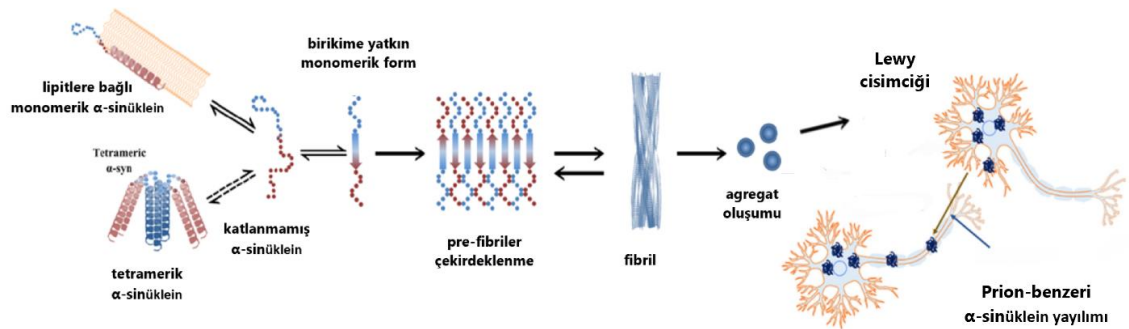
α -sinüklein proteini, kromozom 4q22.1 bölgesinde yer alan SNCA geni tarafından kodlanmaktadır. SNCA geni yaklaşık 114 kb. uzunluğundadır ve 6 ekzondan oluşmaktadır (31). 14,4 kDa ağırlığında, 140 amino asitten oluşan ve yoğunlukla merkezi sinir sistemi (MSS) olmakla birlikte, gelişimsel süreçte kırmızı kan hücreleri, kas, karaciğer, akciğer ve kalp gibi dokularda da ifade olan sitoplazmik bir proteindir (32, 33). SNCA geni tarafından kodlanan α -sinüklein proteini, α , β ve γ sin kleinlerden oluşan sinüklein ailesine dahildir (34). α -sinüklein ve β -sinüklein öncelikle beyinde bulunurken, γ -sinükleinin neoplastik dokularda bulunduğu bilinmektedir (35). α -sinüklein, beyinde özellikle neokorteks, hipokampus, substantia nigra (SN), talamus ve serebellum bölgelerinde ifade edilmektedir (36). Beyindeki total sitozolik proteinlerin %1'ini α -sinüklein oluşturmaktadır ve bu nedenle özellikle nöronal fonksiyonlarda önemli rolü olabileceği düşünülmektedir (37). Pre-sinaptik terminallerde yerleşim gösteren α -sinükleinin, vezikül organizasyonu, vezikül taşınması, endositoz gibi fonksiyonları aracılığıyla sinaptik transmisyonunda ve nöronal plastisitede rolü olduğu düşünülmektedir (38). Bunun dışında, α -sinükleinin dopamin sentezinden sorumlu tirozin hidroksilaz enzimi ile dopamin transportundan sorumlu VMAT2 (*dopamine-transporting vesicular transporter-2*) proteininin ifade ve aktivitesini etkileyerek dopamin homeostazında kritik rol oynadığı bilinmektedir (39-41). Ek olarak, α -sinükleinin fosfolipitlere bağlanması ve A2 sınıfı apolipoproteinlerle benzerlik göstermesi nedeniyle hüresel lipit biyogenezi ve taşınmasında da rolü olabileceğin düşünülmektedir (42-44).

α -sinükleinin yapısı, lizin açısından zengin amfipatik bir N-terminali (rezidü 1-60), NAC bölgesi (*non-amyloid β component of plaques*) (rezidü 61-95) ve C terminali (rezidü 96-140) olmak üzere 3 domainden oluşmaktadır (45). N-terminali tekrarlayan KTKGV hekzamerik konsensus motifi içermekte ve bu motifler aracılığıyla amfipatik α -heliks yapısı oluşt rarak lipitlere bağlanabilmektedir (46). Otozomal dominant PH formlarıyla ilişkili SNCA gen mutasyonların tümünün N-terminal domainde yer aldığı tanımlanmıştır. Bu nedenle N-terminal domaini α -sinükleinin birikimi ile ilişkili

patolojide önemli rol oynamaktadır (47). NAC domaini, proteinin β -tabakası yapısı oluşturabilme özelliğine sahiptir. Proteinin birikime yatkınlığına neden olan ve protofibril/fibril oluşumuna yol açan oldukça hidrofobik bir diziden oluşmaktadır (48). C-terminal domaini ise, α -sinükleinin protein-protein etkileşimleri aracılığıyla şaperon benzeri aktivitesini gerçekleştirdiği domain olarak düşünülmektedir. Ayrıca, C-terminal domainin kesilmesi sonucu oluşan protein ürünlerinin agregasyon ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (49). α -sinükleinin ağırlıklı olarak katlanmamış konformasyonda bulunması nedeniyle özellikle C-terminal bölgesinde fosforilasyon, asetilasyon, nitrasyon ve ubiquitinlenme gibi çeşitli transasyon sonrası modifikasyonlara açık halde bulunduğu bilinmektedir (50). C terminalinde, özellikle Serin 129'un fosforilasyonu, artan agregat oluşturma eğilimi ile ilişkilendirilmiştir (51). Sağlıklı beyin dokusunda, α -sinükleinin fosforillenme oranı %4 iken Parkinson Hastalığı (PH) hastalarının beyin dokularında α -sinükleinin ubiquitinlenme oranı %90'lara kadar çıkmaktadır (52). Yapılan çalışmalarda, hem PH hastalarının beyin dokularında hem de hayvan modellerinde fosforillenmiş α -sinükleinin anormal birikimi gösterilmiştir (53, 54). Bu durumda, C-terminalinde gerçekleşen transasyon sonrası modifikasyonlar ile Lewy cisimciği oluşumu ve nörodejenerasyona arasında potansiyel olarak önemli bir ilişki olduğunu gösterilmiştir.

α -sinükleinin hücrede bulunduğu yapısal formu hakkında literatürde farklı bulgular bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, sitozolik α -sinükleinin hücrede ağırlıklı olarak katlanmamış monomer yapıda bulunduğunu öne sürerken, alternatif hipotezler, α -sinükleinin hücrede biyolojik membranlarla etkileşime girerek tetramerik alfa-helikal oligomer yapısında bulunabileceğini öne sürmektedir (55-57). Bu durum, proteinin bahsedilen dinamik yapısına bağlı olarak farklı hücresel lokasyonlarda farklı fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmektedir (58, 59). Ayrıca, α -sinükleinin, belirli stres koşulları altında veya diğer proteinler, özgül ligandlar ve lipitler gibi moleküllerle etkileşime girdiğinde çözünebilir oligomer/protofibril ve çözünebilir olmayan fibriller formu gibi farklı stabil yapılarda bulunabileceği bilinmektedir (60). Oligomerik formların uzaması sonucunda olgun amiloid fibrillerine dönüşmektedir. Fibriller daha sonra Lewy cisimciğini

oluşturmaktadır ve ayrıca Lewy cisimcikleri prion-benzeri yayılım ile başka hücrelere transfer edilebilmektedir (50, 61). Hücrede α -sinükleinin farklı yapısal formları arasında korunan bir denge bulunmaktadır (Şekil 2.2.). Bu denge, proteinin yapımı, birikimi, salınımı ve yıkımı arasındaki ilişki ile sağlanmaktadır (62). Oksidatif stres, genetik mutasyonlar, translasyon sonrası modifikasyonlar, hücresel pH değişikliği, proteolitik mekanizmalar, hücre içi lipit kompozisyonu, metal iyonlarının varlığı gibi pek çok etken α -sinükleinin protein yapısını etkileyerek bu dengeyi değiştirebilmektedir (63). Hücre içi bu etkenlerde oluşabilecek değişiklikler, α -sinükleinin toksik oligomerik ve/veya fibriler yapıda birikimine neden olmaktadır (34). Literatürde, monomerik ya da tetramerik α -sinükleinin toksik olmadığı, fakat α -sinüklein oligomerleri ve protofibrillerinin α -sinüklein toksisitesinden sorumlu olan formlar olduğu bildirilmiştir (63).



Şekil 2.2. α -sinükleinin yapısal formlarının şematik gösterimi.

α -sinüklein birikiminin yanı sıra, bu proteinin hücrelerarası transferi de PH patolojisinde önemli rol oynamaktadır. α -sinükleinin hem insan plazması ve beyin omurilik sıvısı gibi in vivo koşullarda (64, 65) hem de in vitro koşullarda nöronal kültürlerin besiyerlerinde tespit edilmesi (66), α -sinükleinin hücre dışına salınabileceği görüşüne kesinlik kazandırmıştır. Ayrıca, agregat formundaki α -sinükleinin diğer hücrelere 'prion-benzeri' şekilde transfer edildiği gösterilmiştir (67, 68). α -sinüklein yayılımının kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, bu konuda öne sürülen farklı mekanizmalar bulunmaktadır. Hücre içi α -sinükleinin

eksozom benzeri veziküller içerisinde hücre dışı boşluğuna salındığı bildirilmiştir (69, 70). α -sinüklein eksozomal salınımının yanı sıra, serbest oligomerik formlarının da hücre dışına salınabildiği rapor edilmiştir (71). Literatürde, birçok çalışma salınan α -sinükleinin başka hücreler tarafından hücre içerisine alındığını göstermiştir (66, 67, 72). α -sinükleinin hücre içerisine alınmasının klasik endositoz yolağı aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (73, 74). Öne sürülen diğer mekanizmalar ise, sitozolik α -sinüklein agregatlarının hücrelerarası aktarımının iki hücreyi birbirine bağlayan tünel benzeri nanotüp yapılar aracılığıyla gerçekleştirilebileceğini ileri sürmektedir (75). Ayrıca çalışmalar, monomerik α -sinüklein moleküllerinin membranlar ve lipitler ile etkileşime girerek pasif difüzyon yoluyla potansiyel olarak hücrelere girebileceğini bildirmektedir (76, 77). α -sinükleinin hücre dışına salınması ve diğer hücreler tarafından hücre içerisine alınmasının; PH patolojisinin ilerlemesi, inklüzyon cisimciklerinin yayılması, nörodejenerasyon ve nöroinflamasyon gibi önemli etkilere neden olabileceği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (68, 78-80). Hücre dışına salınan α -sinükleinin bazı koşullarda da proteolitik enzimlere yıkıldığı veya mikroglia ve astrositler tarafından alınır ve lizozomların içinde parçalandığı da rapor edilmiştir (77, 81). Ayrıca, hücrelerde oksidatif stres (82), lizozomal yıkım bozuklukları (70) ve GCaz enzim eksikliği (83) gibi belirli stres koşulları altında α -sinükleinin diğer hücrelere iletiminin önemli ölçüde arttığı ve bu koşulların hastalık patolojisinin ilerlemesini etkilediği gösterilmiştir. Dolayısıyla, PH patolojisinin anlaşılabilmesi için, α -sinüklein birikiminin yanı sıra, salınımı ve salınımını tetikleyen koşulların anlaşılması, hastalığın moleküler temellerinin anlaşılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

α -sinüklein birikimin, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, ER stresi, nöroinflamasyon, Ubikitin Proteozom Sistemi (UPS) bozuklukları, Otofaji-lizozom yolağı bozuklukları gibi çeşitli PH ilişkili patolojik basamaklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (84, 85). Bu yollarla ilişkili olarak da, α -sinükleinin hücre içi diğer kompartmanlarla ilişkisi önem arz etmektedir. Özellikle lipit bağlanma özelliğine sahip α -sinükleinin hücresel pek çok farklı kompartmanla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. PH patolojisinde önemli rolü olan mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına ilişkin olarak, α -sinükleinin mitokondriyal membranlara yüksek afinite göstermesi (86), hücresel

mitokondriyal fraksiyonlarda α -sinükleinin tespit edilmesi (87), mitokondri iç zarı ve dış zarında yerle tiğinin (88) ve mitokondriyal komplekslerde fonksiyon bozukluklarına neden olarak oksidatif stres gibi süreçlerde rol oynadığı (89) gösterilmiştir. Hep birlikte ele alındığında bu veriler, α -sinükleinin PH'deki mitokondriyal fonksiyonda önemli rolü olduğunu göstermektedir. Endoplazmik retikulum, hücrede lipit sentezi, protein sentezi, katlanma gibi görevlerde rol oynamaktadır. Protein sentezi sonrası yanlış katlanmış proteinler yıkılması gerektiğinde katlanmamı  protein yanıtı mekanizmasını aktive ederek proteozomal yıkımı tetiklemektedir. Yapılan bazı çalışmalar oligomerik α -sinükleinin ER'de biriktiğini ve böylece PH'yi tetiklediği bildirilmektedir (90, 91). Yapılan çalışmalarda, lizozomal fonksiyon bozuklukları, oksidatif stres ve apoptoz gibi hücresel stres durumlarında α -sinükleinin çekirdeğe taşındığı da rapor edilmiştir (92, 93). Ayrıca, hücrede otofaji-lizozom yolağının da α -sinüklein ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, hücresel α -sinükleinin birikiminin veziküler trafikte görev alan Rab ailesi proteinlerinden Rab1A'yı inhibe ederek otofagozom oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (94). Yine, α -sinükleinin A30P mutant formunun da dopaminerjik nöronlarda makrotofaji mekanizmasını inhibe edebileceği rapor edilmiştir (95). α -sinükleinin hücrede pekçok farklı kompartmanla etkileşim halinde olması PH patogenezinin farklı yolaklarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir ve bu protein-organel etkileşimlerinin aydınlatılması hastalık patogenezinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

2.3. Parkinson Hastalığı'nda GBA1'in Olası Patolojik Mekanizmaları

Parkinson hastalığı (PH), orta beyinde özellikle substantia nigra'da Lewy cisimciklerinin varlığı ve dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk olarak 1817'de James Parkinson tarafından klinik olarak tanımlanan PH, kas titremeleri ve sertliği, bradikinezi ve denge kaybını içeren motor semptomların yanı sıra kabızlık ve REM uyku bozukluğu gibi motor olmayan semptomlar da sergilemektedir (96, 97). PH çoğunlukla çevresel faktörlerin ve

yaşlanmanın ana risk faktörleri olduğu sporadik bir hastalık olsa da, hastaların yaklaşık %15'inde aile öyküsü görülmekte ve hastaların %5-10'u klasik Mendel kalıtım modelini takip etmektedir (98). PH'ye neden olan genetik faktörlere ilişkin yapılan çalışmalarda monogenik ailevi PH formlarına neden olan pek çok gen tanımlanmıştır (99). Bu genlerden SNCA ve LRRK2 gibi genler otozomal dominant kalıtımla ilişkilendirilirken, Parkin, PINK1, DJ1 ve ATP13A2 gibi genler otozomal resesif kalıtılan formlarla ilişkilendirilmiştir (99). Monogenik formlarla ilişkilendirilen genlerin yanı sıra, PH'de GWAS çalışmaları sonucu risk faktörü olan genler tanımlanmıştır. PH patolojisinde rol oynayan en önemli faktörlerden biri de bir lizozomal asit hidrolaz olan GCaz enzimini kodlayan GBA1 geni ve α -sinüklein arasındaki ilişkidir. GBA1 gen mutasyonlarının Parkinson Hastalığı ve diğer sinükleopatiler için en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bu ilişki ilk olarak, Gaucher hastalarında nörolojik tutulum ile birlikte tremor, rijidite ve bredikinezi gibi PH ile ilişkili klinik semptomların görülmesiyle anlaşılmıştır (100-102). Yapılan nöropatolojik analizler, Gaucher hastalarının beyin kesitlerinde α -sinüklein pozitif Lewy cisimciği oluşumu olduğunu ve mutant GCaz enziminin α -sinüklein pozitif Lewy cisimcikleri içerisinde yer aldığını göstermiştir (103). Uluslararası düzeyde yapılan geniş ölçekli, çok merkezli genetik kohort çalışmaları, Parkinson Hastalarında GBA1 gen mutasyonlarının görülme sıklığının kontrol popülasyona göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ve GBA1 gen mutasyonları varlığında hastalık fenotipinin daha erken ortaya çıktığını göstermiştir (1, 3, 4). Parkinson hastalarının GBA1 gen mutasyonu taşıma oranının farklı etnik gruplarda farklılıklar gösterse de, taşıyıcılık frekansının Aşkenazi yahudilerinde %31, diğer toplumlarda ise %12'ye kadar çıkan oranlarda mevcut olduğunu göstermektedir (104). Kontrol gruplarda ise bu oranlar Aşkenazi yahudilerinde %3, diğer toplumlarda ise %1 oranında görülmektedir (1). Diğer yandan, yüksek ölçekli kohort çalışmaları, GBA1 gen mutasyonları varlığında PH geliştirme olasılığının anlamlı derecede yükseldiğini ortaya koymaktadır. Hem Gaucher hastalarının hem de bu hastaların birinci derece zorunlu taşıyıcı akrabalarının, normal popülasyona göre çok daha yüksek PH insidansı gösterdiği bildirilmiştir (102, 105, 106). Kontrol popülasyon ile karşılaştırıldığında, heterozigot GBA1 gen mutasyon taşıyıcılarının PH geliştirme

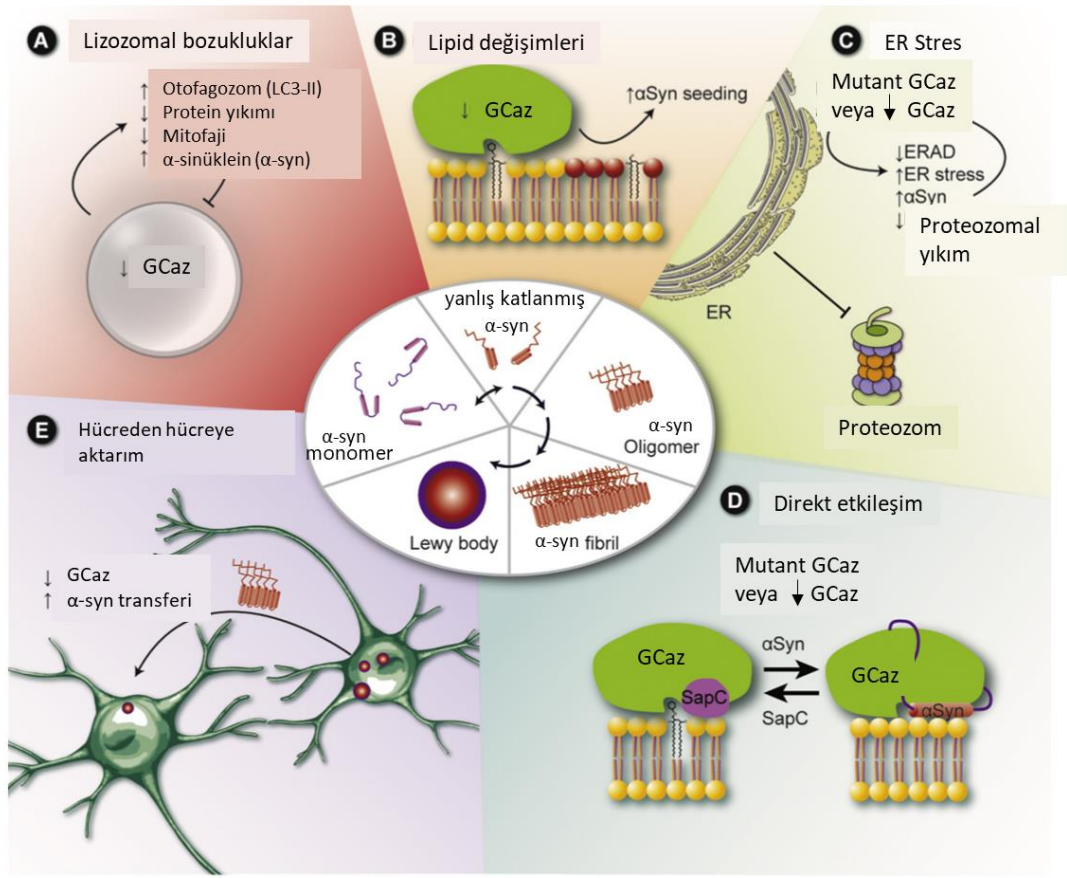
riskinin 5 kat, homozigot GBA1 gen mutasyona sahip bireylerde ise bu riskin 10 ila 20 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (1, 107, 108). Tüm bu klinik, genetik ve nöropatolojik gözlemler, GBA1 gen mutasyonlarının Parkinson Hastalığı ve diğer sinükleopatiler için en önemli risk faktörü olduğunu ve α -sinüklein ile GCaz proteini arasındaki ilişkinin patogeneizde rolü olabileceğini göstermektedir.

Son yıllarda yapılan geniş ölçekli klinik tarama çalışmaları, GBA1 gen mutasyonlarının şiddeti ile Parkinson Hastalığı semptomlarının ciddiyeti arasında olası bir genotip-fenotip korelasyonu olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar, ağır GBA1 gen mutasyonları taşıyıcılarının, hafif GBA1 gen mutasyonları taşıyıcılarına kıyasla yaklaşık 3 ila 4 kat daha yüksek PH geliştirme riskine sahip olduğu ve hastalık başlangıç yaşının bu hastalarda yaklaşık 5 yıl daha erken olduğu rapor edilmiştir (5). Ayrıca, ağır GBA1 gen mutasyonlarına sahip Parkinson hastalarının, hafif GBA1 gen mutasyonuna sahip hastalara kıyasla daha yüksek Birleşik Parkinson Hastalığı Derecelendirme Ölçeği (UPDRS) puanlarına sahip olduğu, daha yüksek oranda REM uykusu davranış bozukluğu ve halüsinasyonlar gösterdiği rapor edilmiştir (6). Ayrıca, ağır GBA1 gen mutasyonlarına sahip Parkinson hastalarında daha fazla motor-olmayan semptomlar ve depresyon görüldüğü saptanmıştır (6). Bahsedilen genotip-fenotip korelasyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılması, GBA1 gen mutasyon taşıyıcılarının genetik ve klinik takibi ile PH patofizyolojisinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

GBA1 gen mutasyonları ile ilişkili nörodejenerasyonun moleküler temelleri ile ilgili olarak çok çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. GCaz enzimi ile α -sinüklein birikimi arasındaki ilişki ilk olarak Mazzulli ve arkadaşları tarafından, GCaz substratı olan glukosilseramidin lizozomal birikiminin α -sinüklein oligomerlerini stabilize ederek birikimine yol açabileceğini göstermiştir (7). Bununla birlikte, hücrede biriken α -sinükleinin GCaz enziminin ER'den lizozoma geçişini inhibe ederek enzim aktivitesinde azalmaya yol açabileceğini rapor etmiştir (7). Bu nedenle, GBA1 gen mutasyonları ile α -sinüklein birikimi arasında çift yönlü patolojik bir döngü olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Önerilen hipotez, sonraki araştırmalar tarafından

desteklenmiştir. Örneğin, α -sinükleinin aşırı ifadesinin, hem in vivo hem de in vitro modellerde GCaz aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (109, 110). Ayrıca, GBA1 gen mutasyonu taşıma durumundan bağımsız olarak Parkinson hastalarının beyin dokularında, periferik kan örneklerinde ve beyin omurilik sıvılarında GCaz seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (111, 112). Bu çalışmalar, GBA1 ile ilişkili PH'nin altında yatan mekanizmayı kısmen açıklayabilen α -sinüklein ile GCaz arasında nörotoksik bir döngü olduğunu gösterse de, bu ilişkiye neden olan yollar ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

GCaz ile α -sinüklein birikimi arasındaki patolojik durumu açıklamaya yönelik olarak farklı hipotezler öne sürülmüştür. Bunlar arasında, hem GCaz enziminin fonksiyon kazanımı hem de fonksiyon kaybına ilişkin teoriler bulunmakla birlikte, her iki teorinin de açıklayamadığı durumlar bulunmaktadır. GCaz fonksiyon kazanımı hipotezine göre, GBA1 gen mutasyonları sonucu oluşan yanlış katlanmış GCaz enziminin lizozomal fonksiyon bozukluğu, ER stresinin artması, Ubikitin Proteazom Sistemi (UPS) yolağının ve otofaji mekanizmasının bozulması gibi durumlara yol açarak α -sinüklein birikimini tetikleyebileceği öngörülmektedir (8, 9). GCaz fonksiyon kaybı hipotezine göre ise, GCaz fonksiyon eksikliği sonucu glukosilseramit birikiminin hücresel lipid homeostazını değiştirerek α -sinükleinin lipitlere direkt olarak bağlanarak çekirdeklenmesini, hücre içi trafiğini ve lokalizasyonunu etkileyerek birikimine neden olabileceği düşünülmektedir (8, 9). Yapılan çalışmalarda, GCaz ve α -sinüklein birikimi arasındaki patolojik ilişki kanıtlanmış olsa da, hala bu durumun nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte konuya ilişkin çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. GCaz ile α -sinüklein birikimi arasındaki patolojik duruma ilişkin ortaya atılan hipotezler Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



Şekil 2.3. α-sinüklein birikiminde β-Glukoserebrosidaz (GCaz) enziminin potansiyel rollerini açıklamaya yönelik öne sürülen hipotezler gösterilmektedir. (A) Azalan GCaz aktivitesi, otofagozomal fonksiyonun azalmasına yol açabilir, bu da protein ve mitokondriyal yıkımın azalması ile artan α-sinüklein seviyelerine neden olmaktadır. (B) GCaz enzim aktivitesindeki azalma, hücresel lipid profilini değiştirerek α-sinüklein çekirdeklenmesini tetiklemektedir. (C) GBA1 gen mutasyonlarının varlığı sonucunda, katlanmamış GCaz enzimi ER stres sinyallerinin aktivasyonuna yol açarak ER ile ilişkili UPS yolağında aksaklıklara neden olarak α-sinüklein birikimine yol açmaktadır. (D) α-sinükleinin GCaz enzimine doğrudan bağlanması sonucu, hidrolaz aktivitesi için gerekli olan aktivatör protein saposin C'nin bağlanmasını engellemektedir. (E) Mutant GCaz, oligomerik α-sinükleinin hücreden hücreye transmisyonunu artırarak hastalığın ilerlemesini tetiklemektedir (8).

α-sinükleinin birikimi ile ilişkilendirilen mekanizmalardan biri hücresel protein yıkım mekanizmalarıdır (Şekil 2.3 (A)). α-sinükleinin yıkımı hem Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS) hem de Otofaji-Lizozom Yolağı (OLY) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Literatürde, hücrede mutant GCaz enzimi varlığında veya enzimin aktivitesinin

inhibitörlerle bastırılması durumunda, otofagozom birikimi ve lizozomal protein yıkımında azalma ile ortaya çıkan otolizozomal aksaklıkların meydana geldiğini göstermiştir (7, 10, 113, 114). Protein yıkımındaki aksaklıklara ek olarak, GCaz eksikliğinin, bozulmuş otofajiye ve işlevsiz proteasomal yollara bağlı olarak hasarlı mitokondri birikimine de neden olabileceği gösterilmiştir (10, 115).

GCaz - α -sinüklein birikimi ilişkisini açıklamaya yönelik olarak öne sürülen fonksiyon kaybı hipotezine göre, enzim eksikliğine bağlı olarak artan glukoserebrositlerin α -sinüklein birikimine neden olabileceği öne sürülmektedir (Şekil 2.3 (B)). Yapılan biyofiziksel çalışmalar, α -sinükleinin fosfolipit ve sfingolipit yapıdaki membranlara bağlanarak farklı biyolojik işlevlere sahip olabileceğini fakat bununla birlikte bu durumun α -sinükleinin amiloid oluşum kinetiğini etkileyerek birikimini hızlandığı gösterilmiştir (116, 117). GBA1 gen mutasyonları durumunda da, hücrede sfingolipit yapıdaki glikozilseramidlerin birikiminin direkt olarak α -sinüklein oligomerizasyonunu tetikleyebildiği gösterilmiştir (7). Biyofiziksel in vitro analizler kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, GBA1 gen mutasyonlarına bağlı olarak hücrede biriken glikozilseramidlerin bir araya gelerek amiloid benzeri fibril kümeleri oluşturduğu ve lizozom pH'sine yakın asidik ortamda bu lipit kümelerinin α -sinüklein oligomerlerini stabilize ettiği ve agregat oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (118). Dolayısıyla, GCaz enzim eksikliğinden kaynaklı hücresel lipit profili değişikliklerinin, lipit mikro çevreleri ile α -sinüklein arasındaki etkileşimi düzenleyerek α -sinüklein birikiminde rol oynayabileceği ve nörodejenerasyon sürecinde etkisi olabileceği tahmin edilmektedir.

GCaz ile α -sinüklein arasındaki moleküler patolojiyi açıklamaya yönelik öne sürülen mekanizmalardan biri de, Endoplazmik retikulum (ER) stresi, ER ile ilişkili yıkım mekanizmalarının (ERAD) bozulması ve ilişkili hücre ölümüdür (Şekil 2.3 (C)). GBA1 gen mutasyonları varlığında, yanlış katlanmış GCaz enziminin ER'de biriktiği ve bunun da katlanmamış protein yanıtını (KPY) ve ER ile ilişkili bozunmayı (ERAD) tetiklediği öne sürülmüştür (119, 120). Yapılan çalışmalar, in vivo ve in vitro GBA1-PH modellerinde ER stresinin patogeneizde rolü olduğunu göstermiştir (121, 122). Ek

olarak, GBA1 gen mutasyonlarından bağımsız olarak, nöroblastom hücrelerinde yabanıl tip GCaz enziminin farmakolojik olarak inhibe edilmesi ile, ER stresini tetikleyebileceği rapor edilmiştir (123).

GBA1-PH patolojisi ile ilişkili olarak, hastaların beyin dokularında Lewy cisimciği oluşumlarında α -sinüklein ile birlikte GCaz enziminin eş yerleşim gösterdiği kanıtlanmıştır (124). Yapılan biyokimyasal çalışmalarda, asidik koşullar altında (pH:5.5) GCaz ve α -sinüklein arasında doğrudan bir fiziksel etkileşim olduğu ve bu etkileşimin Sposin C koaktivatör bağlanmasını engelleyerek, GCaz enziminin hidrolaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir (125, 126). Tüm bu verilere göre, GCaz ve α -sinüklein direkt etkileşiminin daha önceden bahsedilen ‘iki yönlü patoloji’ hipotezine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.3 (D)).

PH ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda, α -sinükleinin hücreden hücreye geçişi hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (127). Sinükleinopatiler durumunda, α -sinüklein agregatlarının komşu hücrelere iletildiği gösterilmiştir (69, 128, 129). Hücrede lizozomal bozukluklar gibi stres durumlarında ise, α -sinüklein salınımını arttırdığı rapor edilmiştir (130, 131). Benzer şekilde, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda GCaz eksikliğinin de α -sinüklein salınımı üzerinde artırıcı etkileri olduğu rapor edilmiştir (132, 133) (Şekil 2.3 (E)). GCaz enziminin α -sinüklein salınımindaki rolüne ve GBA1 mutasyonlarının bu yolak üzerindeki patolojik etkilerine ilişkin çalışmalar devam etmektedir.

2.4. GBA1-PH Hastalık Modelleri

GBA1 ilişkili PH araştırmaları için hem in vivo hem de in vitro modeller sıklıkla kullanılmaktadır. In vivo modeller arasında fare (*Mus musculus*), meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) ve zebrabalığı (*Danio rerio*) dahil olmak üzere farklı transgenik modeller geliştirilmiştir (134). Geliştirilen fare modellerinde yenidoğan ölümcüllüğü (135) veya insana özgü fenotipik özelliklerin tam olarak yansıtılamaması (134) gibi dezavantajlar olduğu rapor edilmiştir. Bahsedilen dezavantajları

engellemek adına, koşullu mutant fare hatları geliştirilerek GBA1 ilişkili GD semptomları ve nörolojik semptomlar modellenmeye çalışılmaktadır (136, 137). Elde edilen modellerde, alfa-sinüklein ve ubikuitinlenmiş proteinlerin birikimi, otofajik ve proteazomal yıkım bozuklukları ve mitokondri fonksiyon bozuklukları geliştirildiği rapor edilse de (10), hastalık semptomlarını tam olarak yansıtan uygun fare modelleri henüz geliştirilememiştir. In vivo modellerden bir diğeri olan meyve sineği modellerinde, insan GBA1 geninin iki homologu olan gba1 ve gba2 genlerinin silinmesi yoluyla bir GCaz bozukluğu modeli oluşturulmuştur fakat bu modelin a-sinüklein patolojisini yansıtmadığı rapor edilmiştir (138). Bunun yanı sıra, insan yabancı tip veya mutant (N370S veya L444P) GBA geni ifade eden meyve sineği modelleri de geliştirilmiştir. Bu meyve sineği modelinde GBA1 ilişkili PH patolojisine benzer ER stresi ve motor fonksiyon bozuklukları gösterdiği rapor edilmiştir (139). In vivo zebra balığı modelinde de GBA1 ilişkili hastalık modeli oluşturulmuştur. Söz konusu modelde, hastalık fenotipi ile ilişkili olarak "Gaucher benzeri" hücreler gözlemlenmiş, anormal kitotriosidaz aktivitesi tespit edilmiş ve mitokondriyal solunum zinciri hataları ve a-sinüklein birikiminden bağımsız dopaminerjik nöron kayıpları rapor edilmiştir (140). GBA1 mutasyonlarına ilişkin hayvan modellerinin hem GH hem de PH patogenezi incelemek açısından gerekli olan fenotipik özellikleri sınırlı olarak sergiledikleri ve çoğunlukla insana özgü fenotipleri göstermedikleri görülmektedir.

GBA1-PH araştırmaları için kullanılan in vivo modellere alternatif olarak, hücre hatları veya hastalardan elde edilebilecek primer hücreler (makrofaj, fibroblast vb.) ile indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) kaynaklı hücreler dahil olmak üzere çok sayıda hücre tabanlı model mevcuttur (129). SH-SY5Y ve PC12 gibi hücre hatları, hem primer hücrelere göre daha kolay idame ettirilebilen ve transfeksiyon gibi zorlu genetik tekniklere daha uygun modellerdir hem de maliyet anlamında daha elverişli ve hastalardan elde edilmedikleri için etik uygulamalardan muaftırlar (141). Bu hücre hatlarının yanı sıra, hayvan primer hücre kültürleri de, GBA1-PH çalışmalarında son derece uygun modeller olarak kullanılabilir (142). Bunun yanı sıra, hasta

biyopsilerinden elde edilen GBA1 mutant in vitro modeller de hastalığın genetik altyapısının patoloji üzerindeki etkileri araştırmak için elverişli modellerdir. Hastalardan elde edilen fibroblast ve makrofaj primer hücreleri, hem GBA1 mutasyonları nedeniyle görülen GH ilişkili moleküler mekanizmaları incelemek hem de potansiyel ilaç taramaları için uygun modellerdir. Fakat, hem GH'de görülen nörolojik tutumların hem de GBA1 ilişkili PH patolojisinin araştırılmasında, hastalardan elde edilen primer fibroblast hücreleri gibi in vitro modellerin nöronal özelliğe sahip olmaması ve alfa-sinüklein ifade etmemeleri dolayısıyla GBA1-PH ile ilişkili araştırmalarda kullanılmaları hastalık patolojisinin anlaşılması açısından kısıtlamalara neden olabilmektedir (143, 144).

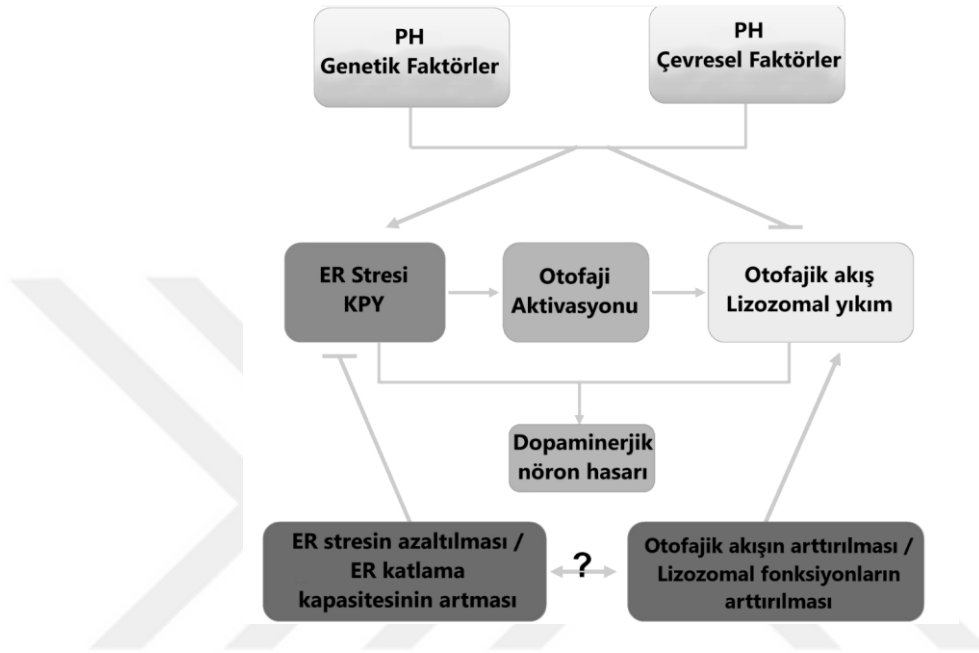
Bu sınırlamalara bir çözüm olarak, son yıllarda, gelişen yeniden programlama teknolojisi (145) ile GBA1 mutasyonu taşıyan indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) kaynaklı in vitro modellerin oluşturulmasında gelişmeler yaşanmıştır. iPKH'ler daha sonra dopaminerjik nöronlar gibi özellikle hastalıkla ilgili hücre tiplerine farklılaştırılabilmektedir (114, 146). Dolayısıyla, iPKH kaynaklı modeller ve genom mühendisliğinde yaşanan gelişmeler, PH gibi nörodejeneratif hastalıkların modellenebilmesi için uygun hücelere erişime olanak sağlamıştır. Bu durum, GBA1 mutasyonları taşıyan insan dopaminerjik nöronlarının hastalık patolojisine ilişkin hücresel ve moleküler düzeyde karakterizasyonuna izin vererek araştırmalara katkı sağlamaktadır (114). Yapılan çalışmalar, GBA1 mutasyonuna sahip iPKH kökenli nöronal modellerin GBA1 ile ilişkili PH patolojisini açıklamaya yönelik olarak öne sürülen α -sinüklein birikimi (7, 114), ER stres artışı (147, 148), GCaz substrat birikimi (147, 149), otofaji-lizozom yolağı bozuklukları (114, 150, 151), veziküler trafik hataları (151), mitokondriyal fonksiyon bozuklukları (152) gibi mekanizmaların araştırılması için oldukça elverişli olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, tez çalışmamızda kullandığımız hem Gaucher hastaları ve taşıyıcılarından hem de Parkinson hastalarından elde edilen iPKH kökenli dopaminerjik nöronlar, GBA1 mutasyonlarının α -sinüklein birikimi ve yıkım mekanizmaları üzerindeki etkilerini araştırmak için oldukça elverişli hastalık modelleri sunmaktadır.

2.5. α -sinüklein yıkım mekanizmaları

Hücrede protein yıkımı Ubikitin Proteozom Sistemi (UPS) ve Otofaji-lizozom yolağı aracılığı olmak üzere iki temel mekanizma ile gerçekleştirilmektedir (153). Otofaji lizozom yolağına ilişkin yıkım mekanizmaları da kendi içerisinde üç alt tipe ayrılmıştır: mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji (şAO) ve makrootofaji. Mikrootofaji, lizozomal membrandaki küçük i e kıvrılma yapılarının oluşması yoluyla sitozolik içeriklerin lizozoma alınarak seçici olmayan yıkımını sağlamaktadır. şAO ise bir konsensüs KFERQ dizisine sahip olan proteinlerin Hsc70 proteini tarafından tanınarak lizozomal ilişkili membran proteini LAMP2A aracılığıyla seçici olarak lizozomal lümene aktarılması ve yıkımı temeline dayanmaktadır (154). Makrootofaji ise temel ve en kapsamlı otofajik yıkım yoludur. Çift zarlı otofagozom yapısı içerisinde yıkılacak olan birikmiş proteinler, hasarlı organeller gibi sitoplazmik içerikleri hapsederek otofagozom-lizozom füzyonu sonucunda lizozomal yıkımlarını gerçekleştirmektedir (155). Makrootofaji mekanizması, yıkılacak substratların türüne göre özgül isimlerle (birikime eğilimli proteinler (*aggrephagy*), mitokondri (mitofaji), peroksizomlar (peksofaji) ve ER (*ERphagy*)) sınıflandırılmaktadırlar (156).

α -sinükleinin yıkım mekanizmalarındaki aksaklıklar ve bu aksaklıklar dolayısıyla hücrede birikimi, PH'nin başlıca patolojik özellikleridir. α -sinükleinin yıkımı; proteinin konformasyonel yapısına, mutasyonlarına, hücre içi lokalizasyonuna ve transkripsiyon sonrası modifikasyonların varlığına göre UPS ve OLY mekanizmaları arasındaki ilişki ile düzenlenmektedir (157). Hücrede α -sinükleinin monomerik formlarının çoğunlukla UPS ve şAO aracılığıyla yıkıldığı gösterilmiştir (158). Fakat bu mekanizmalarda fonksiyon bozukluğuna neden olabilecek genetik, çevresel ve yaşa bağlı etkenler sonucu α -sinükleinin UPS ve şAO aracılı yıkımındaki denge bozularak proteinin oligomerizasyonu tetiklenmektedir. α -sinüklein birikimin artması durumunda, makrootofaji mekanizmasının devreye girerek α -sinüklein agregatları yıkılmaya çalışılmaktadır (159-161). Hücresel protein yıkım mekanizmalarındaki bozukluklar α -sinüklein yıkımını engelleyip birikimine sebep olabileceği gibi, birikmiş α -sinükleinin de UPS ve OLY mekanizmalarının işlevlerini engelleyerek kendi birikimini

tetikleyip nörotoksisiteye neden olabilmektedir (162). α -sinükleinin yıkımını düzenleyen bu mekanizmalar, hastalık mekanizmalarının kritik bir yönü olup, GH ile ilişkili PH ve diğer sinükleinopatilerin tedavisinde potansiyel terapötik hedefleri oluşturmaktadır (161) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. PH patolojisinde ER stresi, otofaji ve dopaminerjik nörodejenerasyonu arasında önerilen çapraz bağlantı modeli. PH ile ilişkili genetik ve çevresel faktörler ER stresini tetikler ve ER stresi UPR'yi aktive eder ve hücrel stresi hafifletmek için otofajiyi indükler. Bununla birlikte, bu PH ile ilişkili faktörler genellikle otofajik akışı bloke eder ve lizozomal fonksiyonları bozar ve bu değişiklikler sinerjik olarak dopaminerjik nöronlarının ciddi hasar görmesine ve dejenerasyonuna neden olur. ER stresini/UPR'yi hafifletmek, ER katlama kapasitesini arttırmak, otofajik akışı teşvik etmek ve lizozomal fonksiyonları geri yüklemek PH için nöroprotektiftir. ER stresi/UPR ve otofajinin birlikte hedef alınması, PH için daha etkili bir terapötik yaklaşım olacaktır.

2.5.1. α -sinükleinin Ubikitin Proteazom Sistemi (UPS) ile yıkımı

Endoplazmik Retikulum, protein sentezi, protein kalite kontrolünü sağlayarak hücrel protein homeostazın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (163). Fizyolojik koşullarda, ER, yeni sentezlenmiş proteinlerin uygun şekilde katlanmasını

sağlamak için ER'de yerleşik olarak bulunan şaperon proteinlerini kullanmaktadır (164). ER'deki kalite kontrol mekanizmaları aracılığıyla da yanlış katlanmış proteinler tanımlanmakta ve hücrede yanlış katlanmış proteinlerin artması, ekzojen viral proteinlerin birikmesi, hücresel metabolik bozukluklar, çevresel toksinlerin varlığı gibi pekçok koşul, ER'nin protein katlama kapasitesini zorlayarak katlanmamış protein yanıtını (KPY) başlatmaktadır (165). Bu mekanizma ER'de yerleşik olarak bulunan üç sensör tarafından kontrol edilmektedir: *inositol-requiring kinase 1α* (IRE1α), *protein kinase RNA-activated (PKR)-like ER kinase* (PERK) ve *activating transcription factor 6* (ATF6) (166). KPY sensörleri, protein yanlış katlanmasını azaltmak, protein sentezini azaltmak ve protein yıkımını arttırmak gibi mekanizmalarla hücrenin hayatta kalması için ER stresini hafifletmeye çalışmaktadırlar (167). Yanlış katlanmış proteinler ayrıştırılarak sitoplazmaya geri gönderilmekte ve ER ile ilişkili yıkım (ERAD) mekanizması devreye girerek Ubikitin Proteazom Sistemi aracılığıyla proteinlerin yıkımı gerçekleşmektedir (168).

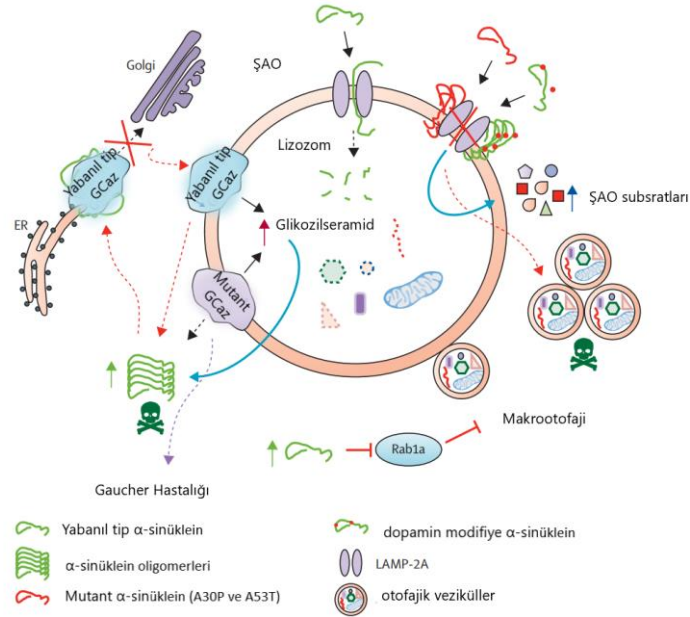
Ubikitin Proteazom Sistemi (UPS), yanlış katlanmış veya hasarlı proteinlerin yıkımı için kullanılan temel hücresel yıkım mekanizmalarından biridir. UPS aracılı protein yıkımı iki ardışık adımda gerçekleşmektedir. İlk olarak, yıkılacak olan hedef proteinlerin yüzeylerindeki lizin rezidülerine, yüksek oranda korunmuş 76 amino asitlik ubikuitin proteininin bağlanması gerçekleşmektedir (169). Ubikitinlenme, her adımın ubikitin-aktive edici (E1), ubikitin-konjuge edici (E2) ve ubikitin-ligaz (E3) enzimleri tarafından katalize edildiği üç aşamalı bir mekanizma yoluyla gerçekleştirilmektedir (170). Ubikitinin yıkılacak olan proteine konjugasyonunu takiben, ubikuitin moleküllerinin sıralı transferi yoluyla substratın poliübikütasyonu gerçekleşmektedir (171). İkinci aşamada, bu poliübikitin zinciri, UPS'in proteolitik kor yıkım ünitesi olan 26S proteazom kompleksi tarafından tanınmaktadır. Burda, yıkılacak olan substrat oligopeptitlere parçalanırken, ubikitin molekülleri de yeniden kullanılmak üzere serbest bırakılmaktadır.

UPS, α-sinüklein yıkımından sorumlu temel mekanizmalardan biridir. PH patolojisi ile ilişkili olarak yapılan post-mortem beyin dokularının biyokimyasal

analizlerinde kontrollere kıyasla Parkinson hastalarında özellikle substantia nigra'da kimotripsin benzeri ve tripsin benzeri proteazom aktivitesinde önemli bir düşüş ve benzer şekilde proteazom alt ünitelerinin ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir (172, 173). Yapılan in vivo çalışmalarda, proteozom inhibitörü laktasistin farelere enjekte edilmesi sonucunda, doza bağlı α -sinüklein birikimi ve nörodejenerasyon olduğu tespit edilmiştir (174). Benzer şekilde, hücre kültürü sistemlerinde yapılan in vitro çalışmalarda da, PC12 hücrelerine proteazom inhibitörü uygulaması yapıldığında hücrelerde α -sinüklein oligomer oluşumunun arttığını göstermiştir (175). Özetle, Ubikitin proteozom sistemi ile ilişkili yıkım mekanizmalarındaki bozuklukların doğrudan α -sinüklein patolojisine neden olabileceği görülmektedir.

2.5.2. α -sinükleinin Şaperon aracılı otofaji (ŞAO) ile yıkımı

Şaperon aracılı otofaji, seçici bir tanıma dizisi (KFERQ-benzeri peptit motif) içeren katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkılmak üzere lizozomlara taşınmasını içeren seçici bir otofaji mekanizmasıdır (176). KFERQ-benzeri peptit motif, sitozolik şaperon protein Hsc70 ve düzenleyici şaperonlar (Bag1, Hip, Hop, Chip ve Hsp40 gibi) tarafından tanınmakta ve yıkılacak olan substratlar şaperon proteinler aracılığıyla lizozom yüzeyine yönlendirilmektedir (177). Yıkılacak olan substrat, özgül şaperon proteinine bağlandıktan sonra, substrat-şaperon kompleksi, ŞAO mekanizmasında reseptör olarak görev alan lizozomal membrane protein tip 2A (LAMP2A) proteininin sitozolik kuyruk domaini ile etkileşime girerek substratın lizozom lümenine aktarılmasına olanak sağlamaktadır (178) (Şekil 2.5). Substratlar, katlanmış bir durumdayken lizozom yüzeyinde LAMP2A reseptörüne bağlanabilir, ancak lizozomal membranı geçmek için substratın açılması gerekir. Bu durumda, lizozomun zarında substrata bağlı halde bulunan HSC70 ve diğer düzenleyici şaperonların bu sürece aracılık ettiği düşünülmektedir (179).



Şekil 2.5. α -sinükleinin ŞAO mekanizması ile lizozomal yıkımı. Yabanıl tip α -sinüklein, ŞAO mekanizmasına özgül reseptör LAMP-2A'ya bağlanarak ŞAO aracılı lizozomal yıkıma uğramaktadır. α -sinükleini kodlayan SNCA geninin A30P ve A53T mutasyonları durumunda veya α -sinükleinin dopamin tarafından modifiye edildiği durumlarda, α -sinüklein ile LAMP2A bağlanması daha güçlüdür ve α -sinüklein lizozom içerisine alınamadığından yıkılamamaktadır. Bu işlev bozukluğu, makrotofaji mekanizmasındaki değişikliklere ve otofajik veziküllerin birikmesine neden olabilmektedir. Ayrıca, GCaz enziminin yabanıl tip ve mutant olduğu durumlarda α -sinükleinin ŞAO yıkımı engellenerek hücrede birikimi gerçekleşmektedir.

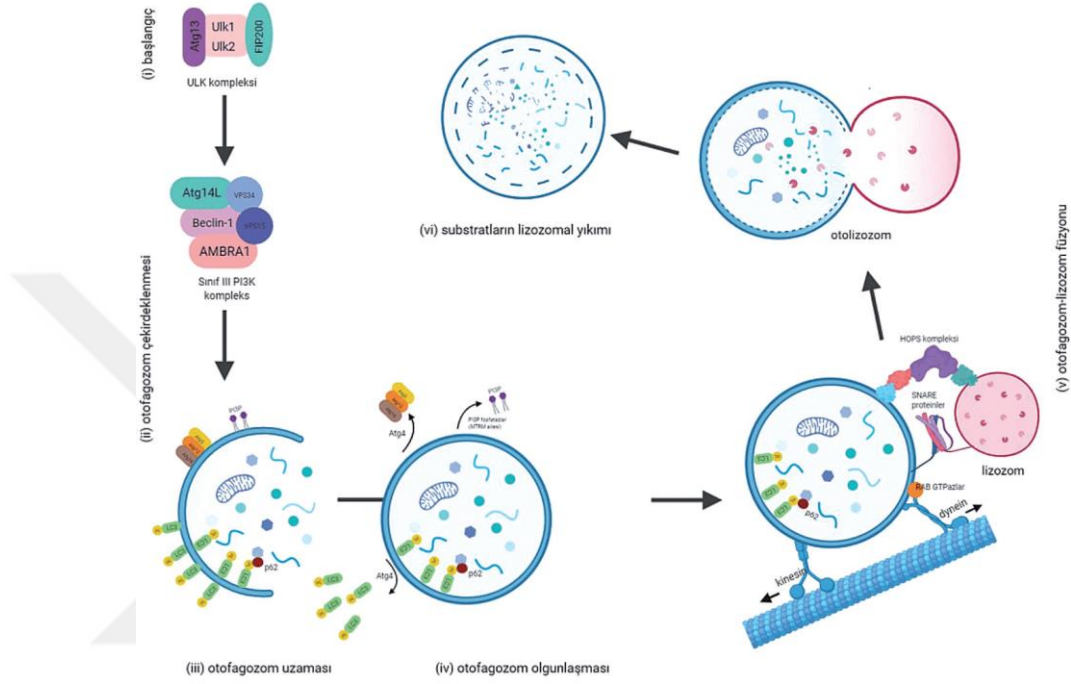
Genel olarak, memeli proteomunun yaklaşık %40'ının seçici KFERQ-benzeri motifi içerebileceği bilinmektedir (180). Bununla birlikte, ŞAO ile ilişkisi tanımlanmamış motifler için de fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar, bu motiflere sağladığı konformasyonel değişikliklerle KFERQ benzeri motif özelliği kazandırabilir (180). α -sinüklein proteini, bir ŞAO tanıma motifi olan VKKDQ pentapeptit dizisini içermektedir ve protein dizisinde yer alan bu motif, α -sinükleinin HSC70 şaperon proteini tarafından tanınmasına ve ŞAO mekanizması aracılığıyla yıkılması için lizozoma yönlendirilerek lizozomal membran proteinlerinden LAMP2A aracılığıyla lizozom içerisine alınmasına olanak sağlamaktadır (181).

α -sinükleinin ŞAO aracılı yıkımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, PH hastalarının beyinlerinde substantia nigra bölgelerinde otofajik vakuol birikiminin tespit edilmiştir (182). PH hastaların beyin dokularında, Şaperon Hsc70 ve LAMP2 belirteçlerinin daha az ifade edildiği tespit edilmiş ve ŞAO mekanizmasındaki bozukluklar PH patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (183, 184). In vivo nöronal hücre kültürü çalışmalarında, ŞAO mekanizmasının baskılanmasının, yüksek moleküler ağırlıklı oligomerik α -sinüklein birikimine yol açtığı gösterilmiştir (185). Bununla birlikte, yapılan in vivo çalışmalarda, ŞAO mekanizmasında rol oynayan LAMP2A proteininin aşırı ifadesinin oksidatif strese karşı koruma sağladığı, otofaji mekanizmasını indüklediği ve ilerleyici lokomotor kusurları hafiflettiği rapor edilmiştir (186). Tüm bu veriler ŞAO mekanizmasının α -sinüklein yıkımında önemli rol oynadığı ve PH patolojisine katkıda bulunabildiğini göstermektedir.

2.5.3. α -sinükleinin Makrootofaji ile yıkımı

Makrootofaji, hasarlı ve yıkılması gereken organellerin ve yanlış katlanmış proteinlerin hücreden toplu olarak temizlenmesinden sorumlu olan, evrimsel olarak korunmuş majör otofajik yıkım mekanizmasıdır. Makrootofaji süreci, yıkılacak olan sitozolik substratların çift zarlı otofagozomlar içerisine alınması ve daha sonra otofagozomların lizozomlar ile birleşerek otofagolizozom yapıları içerisinde substratların lizozomal asit hidrolazlar tarafından parçalanması temeline dayanmaktadır (187) (şekil 2.6). Makrootofaji mekanizmasında ilk olarak ULK kompleksi hücresel açlık gibi sinyallere karşılık aktiveleşerek PI3K kompleksini aktive etmektedir. Bu aktivasyon, otofagozom oluşum aşamasında kritik rol oynayan Atg5-Atg12-Atg16 proteinleri, fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) ve fosfatidiletanolamin ile konjege edilmiş LC3 proteinlerinin bir araya gelerek çift zarlı otofagozom yapısının uzaması sağlamaktadır. Sitozolde yıkılacak olan substratlar p62, OPTN, NBR1 gibi otofajik reseptörler ile işaretlenip etrafında oluşturulan membran, sitozol n de bir kısmını sararak büyüyüp otofajik kargoyu içeren bir otofagozom yapısı oluşurmaktadır. Olgunlaşan otofagozomlar veziküler trafik mekanizması ve

mikrotübüller aracılığıyla lizozomlara doğru hareket ettirmektedir. Son olarak, otofagozom lizozom füzyonu sonucu oluşan otolizozom yapısı içerisinde yıkılacak olan substratlar lizozomal hidrolazlar tarafından yıkılmaktadır.



Şekil 2.6. Makrotofaji mekanizmasının temel basamakları.

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar makrotofaji mekanizmasının α -sinüklein yıkımında önemli rolü olduğunu göstermektedir. α -sinükleinin otofajik yıkımında genel olarak aşırı ifade edilen veya mutant α -sinükleinin daha çok makrotofaji mekanizması ile yıkılabileceği düşünülmektedir (188). Makrotofaji mekanizmasının baskılandığı durumlarda, nöronal hücre kültürlerinde hem endojen hem de aşırı ifade edilmiş α -sinükleinin birikimine neden olduğu tespit edilmiştir (159, 185). Yapılan in vivo çalışmalarda, yabancı tip α -sinükleini aşırı ifade eden transgenik fare modellerinde lizozomal inhibisyonun α -sinüklein birikimi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (185, 189, 190). α -sinükleinin makrotofajik yıkımı ayrıca translayon sonrası modifikasyonlara bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin,

yapılan çalışmalarda fosforilasyon ve SUMOylation durumunda makrotofaji ile α -sinükleinin yıkımının arttığı bildirilmiştir (54, 191).

PH patolojisinde özellikle dopaminerjik nöronların, katlanmamış, yanlış katlanmış ve birikmiş proteinlere duyarlı olduğu bilinmektedir. ER stresi ve otofajik yıkım mekanizmalarındaki bozukluklar, dopaminerjik nöronların kaybına neden olan ve protein homeostazında dengesizliğe yol açan iki temel mekanizmadır. PH patolojisinin anlaşılmasında bu mekanizmalar arasındaki ilişkinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

2.6. Amaç

PH patolojisi ile ilişkili dopaminerjik nöron hasarının; genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle α -sinüklein birikimi, mitokondriyal hasar, oksidatif stres, kalsiyum homeostazı bozukluğu, protein homeostazının bozulması, hücresel yıkım mekanizmalarındaki fonksiyon bozuklukları, aksonal taşımanın bozulması ve nöroinflamasyon gibi çeşitli hücresel süreçler sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir (98). Özellikle, Endoplazmik retikulum (ER) stres kaynaklı katlanmamış protein yanıtı (KPY), Ubikitin Proteozom sistemi ve otofaji mekanizmaları, hücresel protein homeostazının sağlanmasında görevli temel mekanizmalardır ve PH de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde önemli rol oynamaktadırlar (192, 193).

Protein homeostazına etki eden PH ile ilişkili genetik faktörlerden biri de PH için tanımlanan en önemli risk faktörü olan GBA1 mutasyonlarıdır. Yapılan pek çok çalışma, GCaz enzim eksikliğinin lizozomal yıkım kapasitesini azaltarak α -sinüklein birikimine neden olduğunu göstermiştir (106, 191, 192). Benzer şekilde grubumuzun Gaucher hastalarının fibroblastlarında yaptığı bir çalışmada da, GBA1 mutasyonlarının lizozomal pH değerini yükselterek otofaji-lizozom yolağında aksaklıklara neden olduğu gösterilmiştir (yayınlanmamış veri). Ayrıca, yapılan in vivo çalışmalarda da, GCaz enzim eksikliğinin primer nöronlarda ve astrositlerde hem OLY hem de UPS

mekanizmalarında fonksiyon kaybına neden olduğu rapor edilmiştir (10). Dolayısıyla, GBA1 mutasyonlarının hücresel yıkım mekanizmalarını etkileyerek protein homeostazını bozduğu ve α -sinüklein birikimine neden olduğu düşünülmektedir.

Gaucher Hastalığı'nda nöropatik (GH2 ve GH3) ve nöropatik olmayan (GH1) klinik formlarla ilişkilendirilmiş GBA1 mutasyonlarının nöronal hücre hatlarında α -sinüklein birikiminin farklı GBA1 mutasyonları varlığında farklı oranlarda biriktiği rapor edilmiştir (194). Bu veriyle uyumlu olarak yapılan klinik çalışmalarda da, nöropatik ve nöropatik olmayan Gaucher Hastalığı ile ilişkili 'hafif' (N370S) ve 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 mutasyonlarının Parkinson Hastalığı oluşturma riski, hastalık başlangıç yaşı ve hastalığın prognozu açısından farklı fenotipik etkileri olduğu gösterilmiştir (5, 6). Klinik ve biyokimyasal olarak farklı GBA1 mutasyonlarının PH patolojisi açısından farklı etkileri olduğu gösterilmiş olsa da, bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Tez çalışmasında, nöronopatik olmayan Gaucher Hastalığı ile ilişkili 'hafif' GBA1 mutasyonları (N370S gibi) ve nöronopatik olan Gaucher Hastalığı ile ilişkili 'ağır' GBA1 mutasyonlarının (L444P ve D409H gibi), α -sinükleinin hücresel yıkım mekanizmaları arasındaki ilişkiyi etkileyerek α -sinüklein birikimine neden olduğu ve böylece nöronal dejenerasyonda rol oynayabileceği hipotezi kurulmuştur.

Bu doğrultuda tez çalışmasında, nörolojik tutulumu olmayan Tip I (N370S/N370S genotipine sahip) ve nörolojik tutulum gösteren Tip III Gaucher hastaları (L444P/L444P ve D409H/D409H genotiplerine sahip), bu hastaların heterozigot zorunlu taşıyıcı aile bireyleri (N370S/-, L444P/- ve D409H/- genotiplerine sahip), GBA1 mutasyonu taşımayan idyopatik Parkinson hastası, heterozigot GBA1 mutasyonu taşıyan (N370S/-) Parkinson hastası ve sağlıklı bireylerden oluşan bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grubu;

- 'hafif' (N370S) ve 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 mutasyonlarının homozigot durumda hücrede α -sinüklein birikimi ve yıkım mekanizmaları üzerindeki olası farklı etkilerinin araştırılması,

- ‘hafif’ (N370S) ve ‘ağır’ (L444P ve D409H) GBA1 mutasyonlarının heterozigot durumda taşıyıcı bireylerin PH geliştirme riskleri açısından değerlendirilebilmesi,
- GBA1 mutasyonu taşıyan (N370S/-) ve GBA1 mutasyonu taşımayan Parkinson hastalarının hücrelerindeki α -sinüklein birikimi ve yıkım mekanizmaları araştırılarak, GBA1 mutasyonlarının PH patolojisine katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Önerilen hipotez doğrultusunda oluşturulan çalışma grubunda;

- Çalışma grubundaki bireylerden elde edilen primer fibroblast hücrelerinin yeniden programlanarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelere çevrilmesi ve daha sonra dopaminerjik nöron kültürlerine farklılaştırılması,
- GBA1 mutasyonlarının GCaz enzim aktivitesi, ifadesi ve yerleşimine etkilerinin iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde değerlendirilmesi,
- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde monomerik ve birikime yatkın oligomerik α -sinüklein birikimin araştırılması,
- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde GBA1 mutasyonlarının α -sinükleinin hücre dışına salınımına etkilerinin araştırılması,
- iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde GBA1 mutasyonlarının ER stresi ve Ubikitin proteozom sistemi aracılı yıkıma etkilerinin araştırılması,
 - iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde GBA1 mutasyonlarının α -sinüklein yıkımından sorumlu otofajik yollar olan şaperon aracılı otofaji ve makrootofaji aracılı yıkıma etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre Kültürü

- Tripsin-EDTA (Capricorn)
- Modified Eagle's Medium (DMEM), Yüksek glikoz (Gibco)
- Ca++ ve Mg++ içermeyen fosfat tamponlu tuz (PBS), (Sigma-Aldrich)
- Fetal sığır serumu (FBS) (Capricorn)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Amfoterisin B (Capricorn)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn)
- DMEM F12 (+ HEPES) (Life Technologies)
- ITS (Life Technologies)
- Heparin (Sigma-Aldrich)
- FGF2 (Peprotech)
- Askorbik asit (Sigma-Aldrich)
- TGFb1 (Peprotech)
- mTeSR (StemCell Technologies)
- KOSR (Thermo Fischer Scientific)
- Akutaz (Sigma-Aldrich)
- Dispaz (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- BSA (Sigma-Aldrich)
- Sodyum bütirat (Sigma-Aldrich)
- Y-27632 Rock inhibitörü (Abcam)
- Tripan mavisi (Thermo Fischer Scientific)
- *STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (StemCell Technologies)*
- N2B27: modifiye nöronal hücre kültürü besiyeri,
- DMEM F12 (- HEPES) (Life Technologies)
- NeuroBasal besiyeri (Life Technologies)
- GlutaMAX (Life Technologies)

- B27 Supplement (Life Technologies)
- N2 Supplement (Life Technologies)
- SB43152 (Sigma-Aldrich)
- Dorsomorfin (Sigma-Aldrich)
- CHIR99021 (Axon)
- Purmorphamine (Sigma-Aldrich)
- MatriGel (Corning)

3.1.2. Hücre Transfeksiyonu

- pCXLE-hUL (Addgene #27080)
- pCXLE-hSK (Addgene #27078)
- pCXLE-hOCT3/4 (Addgene #27076)
- Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Kit (Lonza VPD-1001)
- Nucleofector™ 2b elektroporasyon cihazı (Lonza)

3.1.3. β -Glukoserebrosidaz Enzim Aktivite Ölçümü

- 4-methylumbelliferryl β -D-glucopyronoside (4Mu- β -Glc) (*Sigma-Aldrich*)
- Glisin (Sigma-Aldrich)
- Sodyum asetat (Merck Millipore)
- SpectraMax M2 Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices)

3.1.4. Proteazom Aktivite Ölçümü

- HEPES (Sigma-Aldrich)
- MgCl₂ (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- EGTA (Sigma-Aldrich)
- Sükroz (MP Biomedicals)
- DTT (1,4-Dithiothreitol) (Life Technologies)
- Proteazom substrat kiti (Enzo Life Sciences)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich)

- Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen PBS (Sigma-Aldrich)
- BCA Protein Test Kiti (Thermofisher Scientific)
- ATP (Sigma-Aldrich)
- Test Tamponu (50 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sükröz, 5 mM DTT, 2 mM ATP)
- Lizis Tamponu (50 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sükröz, 5 mM DTT)
- SpectraMax M2 Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices)
- Soğutmalı santrifüj

3.1.5. İmmünfloresan Boyama

- PBS (Sigma-Aldrich)
- Paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- FBS (Capricorn)
- Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Keçi serumu (Sigma-Aldrich)
- DAPI (4',6-diaminodino-2-phenylindole) (Sigma-Aldrich)
- Prolong® Gold antifade reagent (Molecular Probes)
- Konfokal mikroskop (Zeiss)

3.1.6. Protein izolasyonu ve Kantitasyon

- PBS (Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen) (Sigma- Aldrich)
- 1X RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) tamponu (Sigma-Aldrich)
- Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche)
- Vibra-Cell prob sonikatörü, VCX 130, prob CV 18 (Sonics)
- Pierce BCA Protein Test Kiti (Thermo Fisher Scientific)
- SpectraMax M2 Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices)
- Soğutmalı santrifüj

3.1.7. İmmünblotlama

- %40 akrilamid/bisakrilamid solüsyonu (Applichem)
- Trizma baz (Sigma-Aldrich)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Carlo Erba)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma-Aldrich)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin) (Sigma-Aldrich)
- Mini Protean II elektroforez seti (Bio-Rad)
- 4X Laemmli yükleme tamponu (Bio-Rad)
- Spectra Geniş Aralıklı Protein belirteci (BioRad)
- PVDF membran (0,45 µm) (Thermofisher Scientific)
- Whatman filtre kağıdı, 3 mm (Sigma-Aldrich)
- Bovine Serum Albumin tozu (Sigma-Aldrich)
- Tris-tamponlu tuz çözeltisi, TBS (50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 7.6)
- Tween-20 (Amresco)
- Yağsız süt tozu (Pinar)
- *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermofisher Scientific)
- *GeneGnome 5* kemilüminesan görüntüleme cihazı (Syngene)

3.1.8. WES

- *ProteinSimple* WES otomatize sistem (*ProteinSimple* 004–600)
- 12-230 kDa *Wes Separation 8x25 Capillary Cartridges* (*ProteinSimple* SM-W004-1)
- 12-230 kDa Standart Paket (*ProteinSimple* PS-ST01-8)

3.1.9. dQCM

- Mercapto unodecanoic acid (MUA)
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylamiopropyl)carbodiimide (EDC) (Thermo Scientific)
- N-Hydroxysuccimide (NHS) (Thermo Scientific)
- Etanol (Sigma- Aldrich)

- PBS (Sigma- Aldrich)
- Rekombinant α -sinüklein

3.1.10. Antikorlar

İmmünfloresan boyama, immünblotlama ve WES çalışmalarında kullanılan antikorlara ilişkin detaylar Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. İmmünfloresan boyama, immünblotlama ve WES çalışmalarında kullanılan antikorlar, seyreltme oranları ve inkübasyon koşulları.

	İmmünfloresan boyama		İmmünblotlama			
			Western blot		WES	
Antikor	Seyreltme oranı	İnkübasyon koşulları	Seyreltme oranı	İnkübasyon koşulları	Seyreltme oranı	İnkübasyon koşulları
Fare monoklonal anti-LIMP2 antikor (ab176317, Abcam)			1:1000	1 saat / oda sıcaklığı		
Fare monoklonal anti-Oct3/4 antikor (sc5279, Santa-Cruz)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Tavşan poliklonal anti-Nanog antikor (ab21624, Abcam)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Keçi poliklonal anti-Sox2 antikor (sc17320, Santa-Cruz)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Fare monoklonal anti- α -sinüklein antikor (610787, BD Biosciences)					1:10	oda sıcaklığı
Tavşan poliklonal anti-amiloid oligomer antikor (AB9234, Sigma-Aldrich)	1:100	gece boyu / +4 °C				
Fare monoklonal anti- β Glukoserebrosidaz antikor (sc166407, Santa-Cruz)			1:1000	1 saat / oda sıcaklığı		

Tablo 3.1. İmmünfloresan boyama, immünblotlama ve WES çalışmalarında kullanılan antikorlar, seyreltme oranları ve inkübasyon koşulları (devam).

Fare monoklonal anti-Hsc70 antikor (sc7298, Santa-Cruz)	1:200	1 saat / oda sıcaklığı			1:100	oda sıcaklığı
Tavşan monoklonal anti-BiP antikor (3177, Cell Signalling)					1:100	oda sıcaklığı
Tavşan monoklonal anti-PDI antikor (3501, Cell Signalling)					1:100	oda sıcaklığı
Fare monoklonal anti-Tirozin hidroksilaz antikor (ab75875, Abcam)	1:200	1 saat / oda sıcaklığı	1:1000	1 saat / oda sıcaklığı		
Fare monoklonal anti-Tubulin β III antikor (05559, Sigma-Aldrich)	1:5000	gece boyu / +4 °C				
Fare monoklonal anti-Ubikitin antikor (sc8017, Santa-Cruz)					1:125	oda sıcaklığı
Tavşan poliklonal anti-LAMP2A antikor (an18528, Abcam)	1:200	1 saat / oda sıcaklığı	1:1000	1 saat / oda sıcaklığı		
Fare monoklonal anti-LAMP1 antikor (ab25630, Abcam)	1:200	1 saat / oda sıcaklığı				
Tavşan poliklonal anti-LC3 antikor (L7543, Sigma-Aldrich)	1:200	1 saat / oda sıcaklığı	1:1000	1 saat / oda sıcaklığı		
NL557 Keçi IgG Konjuge Otx2 antikor (967389, R&D Systems)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
NL557 Keçi IgG Konjuge Brachyury antikor (967388, R&D Systems)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
NL637 Keçi IgG Konjuge SOX17 antikor (967393, R&D Systems)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Fare monoklonal anti-SQSTM1 antikor (H00008878-M01J, Abnova)	1:200	1 saat / oda sıcaklığı			1:50	oda sıcaklığı
Fare monoklonal anti-GAPDH antikor (G8795, Sigma-Aldrich)			1:1000	1 saat / oda sıcaklığı	1:5000	oda sıcaklığı

Tablo 3.1. İmmüfloresan boyama, immüblotlama ve WES çalışmalarında kullanılan antikorlar, seyreltme oranları ve inkübasyon koşulları (devam).

Tavşan monoklonal anti- β -Aktin antikor (M01263, Boster)					1:5000	oda sıcaklığı
Tavşan monoklonal anti-Nestin antikor (ab105389, Abcam)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Fare monoklonal anti-Musashi antikor (MABE269, Sigma-Aldrich)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Fare monoklonal anti-Sox1 antikor (BDB560749, Fischer Scientific)	1:250	1 saat / oda sıcaklığı				
Keçi anti-tavşan IgG (H+L) HRP-konjuge sekonder antikor (Invitrogen)			1:5000	1 saat / oda sıcaklığı	1:5000	oda sıcaklığı
Keçi anti-fare IgG (H+L) HRP-konjuge sekonder antikor (Invitrogen)			1:5000	1 saat / oda sıcaklığı	1:5000	oda sıcaklığı
Keçi anti-fare IgG (H+L) sekonder antikor, Alexa Fluor 598 (Invitrogen)	1:500	1 saat / oda sıcaklığı				
Keçi anti-tavşan IgG (H+L) sekonder antikor, Alexa Fluor 488 (Invitrogen)	1:500	1 saat / oda sıcaklığı				
Eşek anti-keçi IgG (H+L) sekonder antikor, Alexa Fluor 647 (Invitrogen)	1:500	1 saat / oda sıcaklığı				

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Grubuna Dahil Edilen Bireylerin Demografik Bilgileri

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda takip edilen Gaucher hastaları ve aile bireyleri ile Nöroloji Anabilim

Dalı'nda takip edilen Parkinson hastalarından bilgilendirilmiş onam formu alınarak çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grubu Tablo 3.2'de belirtilmiştir:

Tablo 3.2. Deri biyopsi örneklerinin elde edildiği bireylerin demografik verileri.

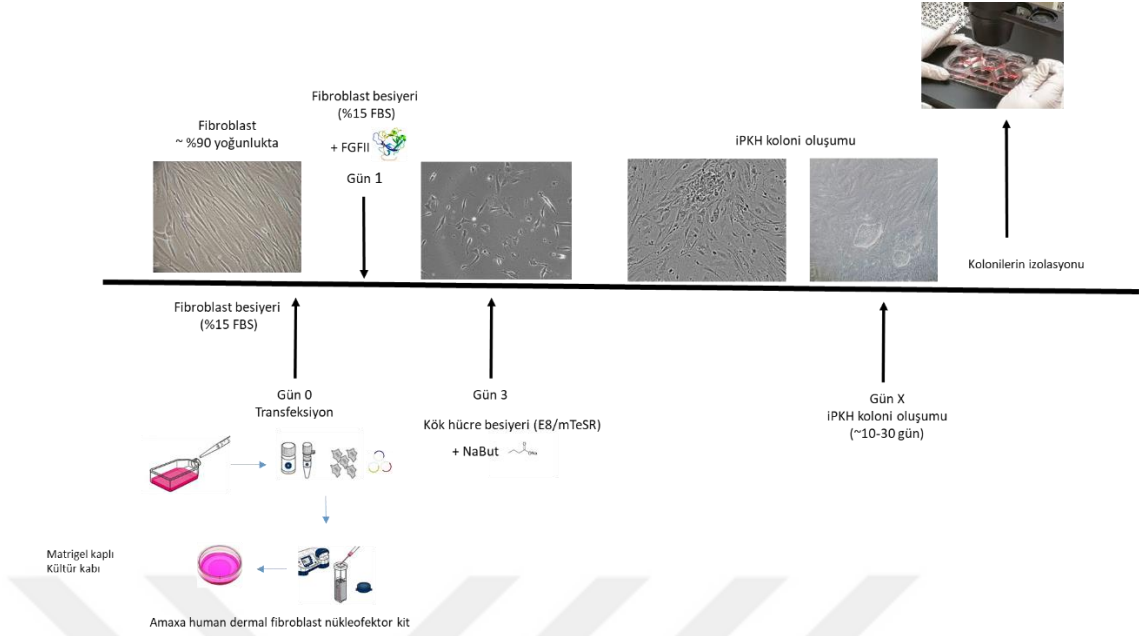
Açıklama	Yaş	Cinsiyet	GBA1 genotipi	Semptomlar
GH Tip I hasta	15	K	N370S/N370S	Organomegali, bilateral erlenmayer deformitesi, karaciğerde depo hücreleri, boy kısalığı, kabızlık
GH taşıyıcı	34	K	N370S/-	-
GH Tip III hasta	10	E	L444P/L444P	Splenomegali, anemi, erlenmayer deformitesi, osteoporoz, epilepsi, nörolojik tutulum, dışa bakış paralizisi
GH taşıyıcı	31	E	L444P/-	-
GH Tip III hasta	12	E	D409H/D409H	Splenomegali, femur fibröz kortikal defekt, nörolojik tutulum, epilepsi, apraksi, gaze palsy, sistolik fonksiyonlarda azalma
GH taşıyıcı	35	E	D409H/-	-
GBA1 mutasyonu taşımayan idyopatik PH	49	K	-/-	PH başlangıç yaşı:44 (5 yıl) MDS UPDRS skoru: 11 LEDD: 1396 mg Sol elde istirahat tremoru
Heterozigot GBA1 mutasyonu taşıyan PH	47	K	N370S/-	PH başlangıç yaşı:46 (1 yıl) MDS UPDRS skoru:6 LEDD: 525 mg Sol elde istirahat tremoru, sol bacakta ağrı ve yavaşlık, sol el ve sol bacakta rijidite
Kontrol	45	E	-/-	-
Kontrol	42	K	-/-	-

3.2.2. Primer Fibroblast Kùltürlerinin Kurulması

Fibroblast kùltürleri kurulurken; öncelikli olarak 4mm yuvarlak Visipunch aleti ile steril koşullarda çıkartılan deri biyopsi örneği uygun ortam (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), %20 FBS (Fetal Sığır Serumı), %5 Penisilin/Streptomisin ve %5 Amphoterasin B içeren) içerisinde buz üzerinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakùltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hücre kùltürü laboratuvarına ulaştırılmıştır. Doku örneği, 35 mm'lik şeffaf petriye transfer edilerek 1 kez %5 Penisilin/Streptomisin ve %5 Amfoterisin B içeren 1X PBS ile ve 2 kez antibiyotik/antimikotik içermeyen 1X PBS ile yıkanmıştır. Devamında deri biyopsi dokusu steril koşullarda bistüri yardımıyla 12-15 parçaya parçalanarak parçaların petri kabına yapışması sağlanmıştır. Dokuların üzerine %20 Fetal Sığır Serumı, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 Amfoterisin B içeren DMEM besiyeri eklenerek uygun saklama koşullarındaki (37°C'de, %5CO₂) etüve kaldırılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değıştirilerek hücreler çoğaltılmıştır. Yaklaşık iki hafta içerisinde fibroblast hücrelerinin %90-100 yoğunluğa ulaşması ile, hücreler 5 dk. 37 °C'de Tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Tripsin inaktivasyonu için 2 kat hacimde fibroblast proliferasyon besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılmış ve 2000 rpm'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine proliferasyon besiyeri eklenmiş ve Thoma lamında hücre sayımı yapılarak hücreler kùltür kaplarına ekilmiştir. Hücreler 5. pasaja kadar çoğaltılarak, her pasajda uygun dondurma ortamı kullanılarak 1X10⁶ hücre/vial olacak şekilde cryo tüplerde (%10 DMSO içeren DMEM besiyeri içerisinde) dondurulmuş ve sıvı azotta saklanmıştır. Tez çalışmasında 3-5 arası pasaj numarasına sahip hücreler kullanılmıştır. Fibroblast hücrelerin mikoplazma kontaminasyon kontrolleri her bireyden alınan doku için 1. pasaj sonrasında DAPI Boyaması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokol 3.2.6 immünfloresan boyama protokolü kısmında detaylı şekilde anlatılmıştır.

3.2.3. Primer Fibroblast Hücrelerin İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelere Yeniden Programlanması

Çalışma grubuna dahil edilen bireylerden elde edilen fibroblast hücreleri episomal yeniden programlama yöntemi kullanılarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelere çevrilmiştir. Episomal yeniden programlama yönteminde ticari olarak satın alınan pCXLE-hUL (insan L-MYC ve LIN28 genlerini içeren plazmid) (Addgene #27080), pCXLE-hSK (insan Sox2 ve Klf4 genlerini içeren plazmid) (Addgene #27078) ve pCXLE-hOCT3/4 (insan OCT3/4 geni içeren plazmid) (Addgene #27076) plazmidleri kullanılmıştır. Plazmidlerin konsantrasyon ve saflık değerleri Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılacak plazmidlerin konsantrasyon ve saflık değerleri belirlendikten sonra fibroblast hücrelere bu plazmidler kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Fibroblast hücreleri 3 dk. 37°C'de Tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Hücre sayımı gerçekleştirilerek her bir primer fibroblast hücre hattı için 500.000 hücre ayrılmıştır. Hücreler nükleofeksiyon solüsyonu içerisinde çözülerek (82 uL insan dermal fibroblast nükleofektör solüsyonu, 18 uL takviye solüsyonu ve her plazmitten 1 ug/10⁵ hücre) elektroporasyon kuvetine alınmıştır. Amaxa nükleofaktör cihazının B16 programı kullanılarak elektroporasyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon kuvetine 500 uL DMEM besiyeri eklenerek (%10 FBS içeren entibiyotiksiz besiyeri) ve 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler matrijel kaplı kültür kaplarına ekilmiştir. Elektroporasyon sonrası 3. günde hücrelerin besiyeri 100uM sodyum bütirat içeren E8 kök hücre besiyeri (DMEM F12 (w/ HEPES), Penisilin/Streptomisin (%1), Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) (%1), Heparin (100 ng/mL), FGF2 (10 ng/mL), L-Askorbik asit (64 µg/mL), TGFb1 (2 ng/mL), mTesR (%10)) ile iki günde bir değiştirilmiştir. iPKH koloni oluşumu gözlemlendikten sonra koloniler mikroskop altında izole edilerek yeni kültür kaplarına ekilerek çoğaltılmıştır. iPKH kolonilerinin oluşum süreci Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Plasmid yeniden programlama yöntemi ile fibroblast hücrelerinin iPKH kolonilerine dönüşüm aşamaları.

3.2.4. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Elde edilen iPK hücrelerinin kök hücre özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kök hücrelere özgü transkripsiyon faktörlerinden olan Oct4, Sox2 ve Nanog belirteçlerinin hücre içi lokalizasyonları ve protein seviyesinde ifadesi immünfloresan boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Uygulanan protokol ve kullanılan antikorlar 3.2.6 immünfloresan boyama protokolü kısmında detaylı şekilde anlatılmıştır.

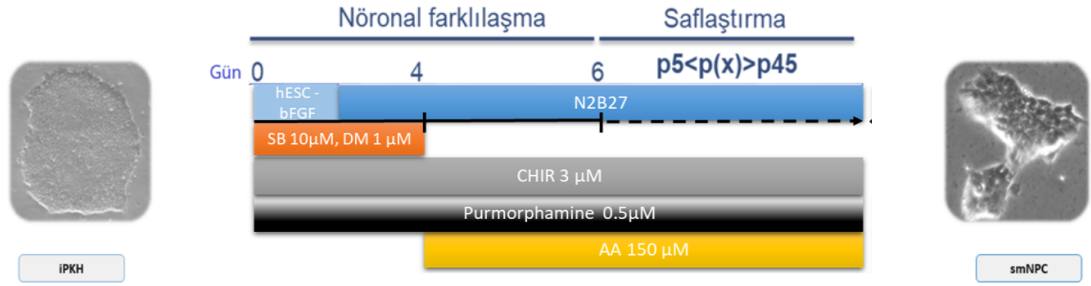
iPKH kolonilerinin pluripotensi özelliğinin belirlenmesi amacıyla hücrelerin in vitro ortamda endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarına farklılaştırılması tetiklenmiştir. Üç farklı germ tabakasına farklılaştırma deneyi *STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (StemCell Technologies)* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. E8/mTeSR besiyerinde kültüre edilen iPKH kolonileri yeterli yoğunluğa ulaştığında PBS (Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen) ile yıkanıp *Accutase* enzimi ile 3 dk. 37°C 'de muamele edilerek kaldırılmıştır. Hücreler enzimin 3 katı hacimde Y-27632 Rock inhibitörü içeren besiyeri eklenerek falkon tüplere alınıp $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür.

Süpernatant uzaklaştırılarak besiyerinde çözölen hücreler *Trypan* mavisi ile boyanıp hemasitometre kullanarak sayılmıştır. Hücreler 12 kuyucuklu költür kaplarına uygun yoğunluklarda (endoderm ve ektoderm için 800.000 hücre ve mezoderm için 200.000 hücre) Y-27632 Rock inhibitörü içeren E8/mTeSR besiyerine ekilmiştir. Ertesi gün besiyeri çekilerek her bir kuyucuğa uygun farklılaştırma besiyeri eklenmiştir. Mezoderm ve endoderm farklılaşması için 5. güne ve ektoderm farklılaşması için 7. güne kadar her gün farklılaştırma besiyeri değiştirilmiştir. Farklılaşma sonucunda bu tabakalara özgül belirteçler (Otx-2 (ektoderm), Brachyury (mezoderm) ve Sox17 (endoderm)) kullanılarak immünfloresan boyama yapılmıştır ve hücrelerin bu belirteçleri ifade edip etmediği gözlemlenmiştir. Uygulanan protokol ve kullanılan antikorlar 3.2.6 immünfloresan boyama protokolü ve 3.1.9 antikorlar kısmında detaylı şekilde anlatılmıştır.

Yeniden programlama sürecinde iPKH kolonilerinde görölebilecek olası kromozomal anomalilerin tespiti için moleküler karyotip analizi HumanOmni2.5Exome-8 BeadChip v1.3 array kullanılarak hizmet alımı şeklinde (*Life&Brain GENOMICS, Bonn, Germany*) gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Dopaminerjik Nöron Hücrelerine Farklılaştırılması

iPKH hücrelerinin dopaminerjik nöronlara farklılaştırılması deneyleri 2 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir (195). İlk aşamada iPKH'lerin nöron progenitör hücrelerine farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokolün detayları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



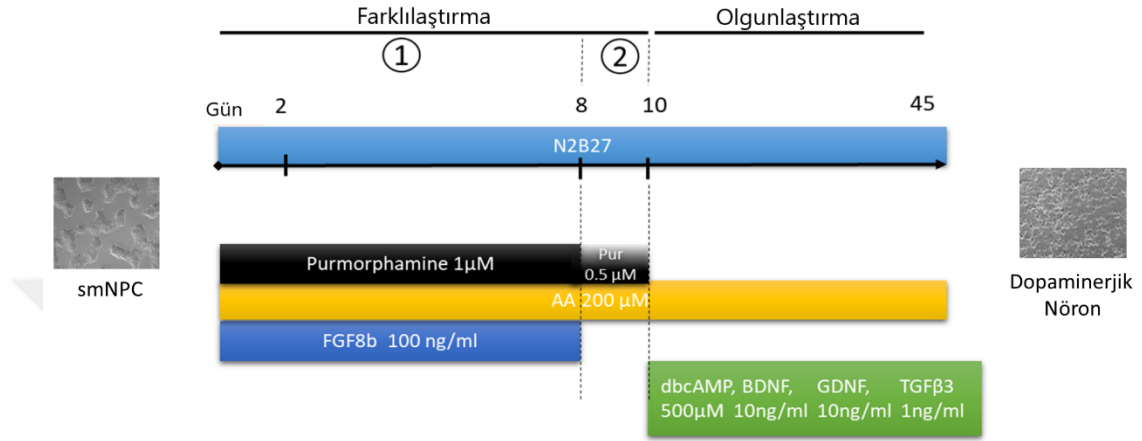
Şekil 3.2. iPKH’lerin nöron progenitör hücrelerine (small molecule Neuronal Progenitor Cells (smNPC)) farklılaştırılması protokolü. Farklı günlerde uygulanan moleküller ve uygulanan konsantrasyonlar farklı renklerde belirtilmiştir. (hESC:insan embryonik kök hücre besiyeri, bFGF: temel fibroblast büyüme faktörü, N2B27: modifiye nöronal hücre kültürü besiyeri, SB: SB43152, DM: dorsomorfin, CHIR: CHIR99021, AA: Askorbik asit)

iPKH’lerin nöronal prekürsör hücrelerine farklılaştırılması aşamasında, bFGF içeren insan embryonik kök hücre besiyerine SB43152 (SB), dorsomorphin (DM) ve CHIR99021 (CHIR) eklenmiştir ve hücreler bu besiyeri ile 4 gün boyunca inkübe edilerek hücrelerdeki nöronal farklılaşma tetiklenmiştir. 4. gün sonrasında nöronal hücre kültürü besiyerine olan purmorphamine ve askorbik asit (AA) eklenmiştir. Nöronal progenitör hücreler, hücre kültürünün homojenliğinin sağlanabilmesi için minimum 13. pasaja kadar pasajlanmıştır.

Nöronal progenitör hücreler elde edildikten sonra hücrelerin karakterizasyonu, Nestin, Musashi ve Sox2 nöronal kök hücre belirteçlerinin ifadesi analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokol ve kullanılan antikorlar 3.2.6 immünfloresan boyama protokolü kısmında detaylı şekilde anlatılmıştır.

13. pasaja kadar saflaştırılan nöronal progenitör hücrelerin Şekil 3.3’te uygulanan protokole göre dopaminerjik nöronlara farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokole göre farklılaştırmanın 21. gününde olgun

dopaminerjik nöron kültürlerinin elde edildiği literatürde belirtilmiştir (195). Tez çalışmasında, hücrelerde α -sinüklein birikiminin tetiklenmesi için hücresel yaşlandırma tekniği kullanılarak dopaminerjik nöronların farklılaştırma süresi 40 ila 90 gün olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.3. iPKH'lerin nöron progenitör hücrelerine (small molecule Neuronal Progenitör Cells (smNPC)) farklılaştırılması protokolü. Farklı günlerde uygulanan moleküller ve uygulanan konsantrasyonlar farklı renklerde belirtilmiştir. (N2B27: modifiye nöronal hücre kültürü besiyeri, AA: Askorbik asit, Pur: *Purmorphamine*, FGF8b: *Fibroblast growth factor 8*, dbcAMP: *Dibutyl cyclic-AMP*, BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, GDNF: *Glial cell-derived neurotrophic factor*, TGFβ3: *Transforming Growth Factor Beta 3*)

3.2.6. İmmü floresan boyama

Hücreler, önceden steril yuvarlak uygun boyutlu lameller yerleştirilen ve Matrigel ile kapanan 12 kuyucuklu veya 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında %4 paraformaldehit ile 25 dk boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Devamında hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon sonrası hücreler 60 dk süreyle %10 keçi serumunda bloke edildi. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında 1 saat boyunca veya gece boyunca 4 °C'de primer antikorlar ile muamele edilmiştir (antikorların seyreltme oranları ve inkübasyon koşulları Tablo 3.1'de gösterilmiştir). PBS ile yıkanan hücreler devamında oda sıcaklığında 1 saat boyunca özgül ikincil antikorlar (antikorların seyreltme oranları ve inkübasyon koşulları Tablo 3.1'de gösterilmiştir) ile inkübe edilmiştir. Çekirdek boyaması için,

hücreler oda sıcaklığında 1 dk boyunca DAPI (1:4000 oranında seyreltilmiş) ile muamele edilmiştir. *ProLong™ Gold anti-fade reagent (Invitrogen, Thermo Fisher)* ajanı ile lam üzerine kapatılan lameller *Zeiss LSM710* konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Görüntüler ayrıca Image J yazılımı kullanılarak floresan yoğunluğu ve eş yerleşim analizi açısından kantite edilmiştir.

3.2.7. Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

T25 hücre kültür kaplarına ekilen hücreler bir kez soğuk 1X PBS ile yıkanarak proteaz inhibitörü (1X Proteaz İnhibitör Kokteyli) içeren 100 ul RIPA tamponu içerisinde toplanmıştır. Örnekler buz üzerinde, 20 saniye boyunca %50 genlikte 6 kez sonike edilmiştir. Sonikasyon sonrasında örnekler 20 dk 14.000 rpm'de -4 °C'de sentrifüj edilmiştir. Hücre kalıntılarını içeren pelet atılarak protein süpernatantları yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üreticinin protokolüne göre BCA Protein Test Kiti (*ThermoFisher Scientific*) kullanılarak protein miktarı belirlenmiştir. Kısaca, 0,08, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 ve 1,2 mg/ml BSA'dan oluşan standart protein numuneleri kullanılarak bir standart eğri çizilmiştir. Ölçülecek protein numuneleri, örneklerin yoğunluğuna göre %1 SDS ile 10 veya 20 kez seyreltilmiştir. Tüm numuneler BCA Protein Test Kitinin çalışma solüsyonu ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra SpectraMax M2 spektrofotometrede 562 nm'de protein konsantrasyonları ölçülmüştür.

3.2.8. İmmünblotlama

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi için, Tablo 3.3'te gösterildiği gibi %12 veya %14 ayırıcı jeller ve %4 yığma jeli hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. SDS-PAGE'de kullanılan jellerin bileşimi.

	%12 Ayırıcı jel	%14 Ayırıcı jel	%4 Yığılma jel
Distile su	3,4 ml	3ml	3,1 ml
%40 akrilamid / bisakrilamid solüsyonu	2,4 ml	2,8 ml	0,5ml
1.5 M Tris pH 8,8	2 ml	2 ml	-
0.5 M Tris pH 6,8	-	-	1,25ml
%10 SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,05 ml
%10 APS	0,08 ml	0,08 ml	0,05 ml
Temed	0,008 ml	0,008 ml	0,005 ml

30 µg protein ekstraktı 4X Laemmli tamponu ile karıştırılarak 100 °C'de 5 dakika denatüre edilmiştir ve protein moleküler ağırlık belirteci ile SDS-PAGE jellerine yüklenmiştir. Elektroforez 100 V'de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Islak transfer için jel ve nitroselüloz membran transfer kasetinde dört Whatman filtre kağıdı ve iki sünger arasına sıkıştırılarak sandviç hazırlanmıştır. Islak transfer 100 V'de 1,5 saat oda sıcaklığında buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Membranlar, oda sıcaklığında 1 saat süreyle %0,1 Tween 20 içeren TBS (TBS-T) içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu solüsyonu ile bloke edilmiştir. Birincil antikorlar, %0,1 TBS-T içinde seyreltilmiştir (antikorların seyreltme oranları Tablo 3.1'de gösterilmiştir) ve membranlar gece boyunca 4 °C'de veya 1 saat oda sıcaklığında antikorlarla inkübe edilmiştir (antikorların inkübasyon koşulları Tablo 3.1'de gösterilmiştir). Inkübasyon sonrası membranlar 10'ar dakika boyunca üç kez PBS ile yıkanarak oda sıcaklığında 1 saat boyunca %0,1 TBS-T içinde 1:5000 oranında seyreltilmiş HRP-konjuge sekonder antikorlarla inkübe edilmiştir. 10'ar dakika boyunca üç kez PBS ile yıkandıktan sonra membranlar, üreticinin protokolüne göre *SuperSignal™ West Femto Maximum*

Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific) ile muamele edilmiştir. *GeneGnome 5* cihazında (*Syngene*) kemilüminesan görüntüleme yapılmıştır.

3.2.9. WES

ProteinSimple WES otomatize sistemin standart protokolü takip edilerek standart paket içindeki bileşenler hazırlanmıştır. DTT tüpü içerisine 40µl distile su eklenerek 400mM DTT solüsyonu hazırlanmıştır. Floresan 5X solüsyon tüpünün içerisine 20µl 10X Örnek tamponu ve 20µl 400mM DTT solüsyonu eklenilerek floresan 5X master mix hazırlanmıştır. Biotinlenmiş ağırlık belirleyicisi tüpünün içerisine 16µl distile su + 2µl 10X örnek tamponu + 2µl 400mM DTT solüsyonu eklenip steril 0,6ml ependorfa aktarılmıştır. Cihaza yüklenilecek örnekler final konsantrasyonu 0,8mg/ml olacak şekilde 0,1X örnek tamponu ile seyreltilmiştir. Örnekler; 1 birim Floresan 5X karışımı + 4 birim örnek lizati olacak şekilde karıştırılmıştır. Örnekler 95°C'de 5dk inkübe edildikten sonra hızlıca buz üzerinde soğutulmuştur. Primer antikorlar uygun seyreltme oranlarına göre antikor seyreltici 2 solüsyonu ile dilüe edilmiştir. Primer antikorlara göre türe özgü seçilen HRP işaretli ikincil antikorlar kullanılmıştır. Kullanılan antikorların seyreltme oranları Tablo 3.1'de gösterilmiştir. 200µl Luminol-S + 200µl Hidrojen Peroksit steril ependorf içinde karıştırılıp plakaya yüklenene kadar buz üzerinde bekletilmiştir. 12-230 kDa Wes Ayırma yetisine sahip 8x25 kuyucuklu plakaya üretici talimatlarına göre yükleme yapılmıştır. Örnekler kuyu başına 4ul, birincil antikorlar ve ikincil antikorlar kuyu başına 10ul olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Plaka 25°C'de 2500 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Kılcal Kartuş ve 8X25 kuyucuklu plaka cihaza yerleştirilmiştir. Protokol 375 V ve 43 dakika olarak uygulanmıştır.

3.2.10. Proteazom Aktivite Ölçümü

Hücre içerisinde yıkılması gereken proteinlerin yıkımı, UPS mekanizması tarafından iki ardışık reaksiyon ile gerçekleştirilmektedir. İlk olarak, protein lizin rezidülerinin ubikuitin (Ub) ile işaretlenmekte ve ikinci olarak, etiketlenmiş proteinler proteazom tarafından yıkılmaktadır. *In vitro* proteazom aktivite ölçümü için

bahsedilen ikinci aşamanın aktivitesini ölçmeye yönelik bir deney protokolü uygulanmıştır (196). Bu protokole göre, proteazomun her üç tip aktivitesi için (kimotripsin benzeri aktivite, tripsin benzeri aktivite ve kaspaz benzeri aktivite) özgül florojenik substratlar kullanılmıştır ve proteazom tarafından florojenik substrattan floroforun kesilmesi ile elde edilen floresan ışımaya bir floresan plaka okuyucu ile tespit edilmiştir. 60 mm'lik hücre kültür kaplarındaki hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler lastik hücre kazıyıcı kullanılarak 400 µl lizis tamponu içerisinde eppendorf tüplere alınmıştır. Hücreler 10 saniye boyunca %50 genlikte 3 kez sonike edilmiştir. Örnekler 4°C'de 10 dakika boyunca 16.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar yeni eppendorf tüplere toplanmıştır. Analiz tamponuna 100 µM konsantrasyonda özgül proteazom substratları (Caspaz benzeri aktivite substratı: Z-Leu-Leu-Glu-AMC; Tripsin benzeri aktivite substratı: Ac-Arg-Leu-Arg-AMC; Kimotripsin benzeri aktivite substratı: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) eklenmiştir. Her bir örnek için siyah duvarlı 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının 3'er kuyusuna substrat içeren 200'ul analiz tamponu eklenmiştir. Üzerine her kuyucuğa 50 µl hücre lizatı eklenmiştir (analiz *blank* ölçümleri için hücre içermeyen substratlı lizis tamponu 3'er kuyucuğa eklenmiştir). Floroforun proteazom substratından ayrılmasını sağlamak için örnekler 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Floresan ışımaya floresan plaka okuyucuda A360/A460 (excitation/emission) değeri ile okunmuştur. Sonuçlar hücre lizatlarının BCA protein test kiti kullanılarak ölçülen protein konsantrasyon değerlerine normalize edilmiştir.

3.2.11. β -Glukoserebrosidaz Enzim Aktivite Ölçümü

Her bir örnek için daha önceden Matrigel ile kaplanmış 96 kuyulu siyah hücre kültürü kaplarının 3'er kuyusuna 5000'er hücre ekilmiştir. 1-2 gün sonra, β -Glukoserebrosidaz enziminin 4-methylumbelliferyl β -D-glucopyronoside (4Mu- β -Glc) substratını parçalaması için hücreler, 0.2 M 50 µL sodyum asetat tamponu (pH:4) içinde 2.5 mM 4Mu- β -Glc substrat ile 37 °C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Analiz *blank* ölçümleri için substrat içermeyen 0,2 M 50 µL sodyum asetat tamponu (pH:4) 3'er kuyucuğa eklenmiştir. Reaksiyon 150 µL 0.2 M glisin tamponu (pH: 10,8) ile

durdurulmuştur. Floresan ışımada floresan plaka okuyucuda A355/A460 (*excitation/emission*) 0,1 sn. değeri ile okunmuştur. Sonuçlar hücre lizatlarının BCA protein test kiti kullanılarak ölçülen protein konsantrasyon değerlerine normalize edilmiştir.

3.2.12. Quartz Crystal Microbalance (dQCM) Analizi

Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensörü, rezonans frekansı kullanarak çeşitli biyoanalitleri tespit etmek için çok çeşitli biyo-algılama uygulamalarında kullanılan altın kaplı kuvars kristal yüzeyindeki toplam kütle artışına bağlı değişimi nanogram düzeyinde hassasiyetle tespit edebilen bir tekniktir (197). Dağılımlı Kuvars Kristal Mikro terazisi (QCM-D) izleme, kristal yüzeyinde moleküler adsorpsiyon ve/veya etkileşimin gerçek zamanlı, etiketsiz ölçümlerini sağlar. Ayrıca, Q-Sense tarafından patentli olan dağılma parametresi (D) ile adsorbe edilen tabakanın viskoelastik özelliklerinin de izlenmesini sağlar. Dağılma, kristal üzerindeki voltaj kesildiğinde ve salınan kristalin enerjisi dağıldığında gerçekleşir [54, 55]. dQCM çipinin altın yüzeyinin tek katmanlı 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA) tabakasıyla kaplanması ve 11-MUA tabakasının karboksil grubunun 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) / N-hydroxysuccinimide (NHS) ajanları kullanılarak aktive edilmesi ile SPR bazlı biyoalgılama için altın yüzeyin hedef antikorlarla kaplanması protokolü yaygın olarak kullanılmaktadır (198, 199). Uyguladığımız protokolde, dQCM çipinin yüzeyi 20 mM 11-MUA ile kaplanmış ve etanol ile yıkanmıştır. Sonrasında çip yüzeyi 400 nM EDC ve 100 mM NHS ile aktive edilmiştir. Daha sonra, Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) Doç. Dr. Urartu Özgür İşafak ŞEKER'in sentetik biyoloji laboratuvarında rekombinant olarak sentezlenen monomerik α -sinüklein ile çip yüzeyi kaplanmış ve dopaminerjik nöron besiyeri ile yıkanmıştır. Sonrasında çip, 90 günlük iPKH kökenli dopaminerjik nöronların eşit hacimdeki besiyerleri ile muamele edilmiştir. Çip yüzeyine bağlanan besiyeri içerisindeki α -sinüklein proteini frekans değişimi olarak kantite edilmiştir. Elde edilen değerler, besiyerlerinin alındığı kültürlerin total protein konsantrasyonlarına normalize edilmiştir.

3.2.13. Verilerin Analizi

Deneylerin sonucunda elde edilen veriler D'Agostino-Pearson normalite testi ile değerlendirilmiştir. Veriler normal dağılım göstermeleri durumunda iki yönlü varyans analizi ve post-hoc Bonferroni testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin analizinde Kruskal-Wallis ve Dunn post-hoc testleri kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerin yapılmasında GraphPad Prism versiyon 6.0.3 deneme sürümü paketi kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Primer Fibroblast Kültürlerin Episomal Yeniden Programlama ile iPKH'lere Dönüştürülmesi

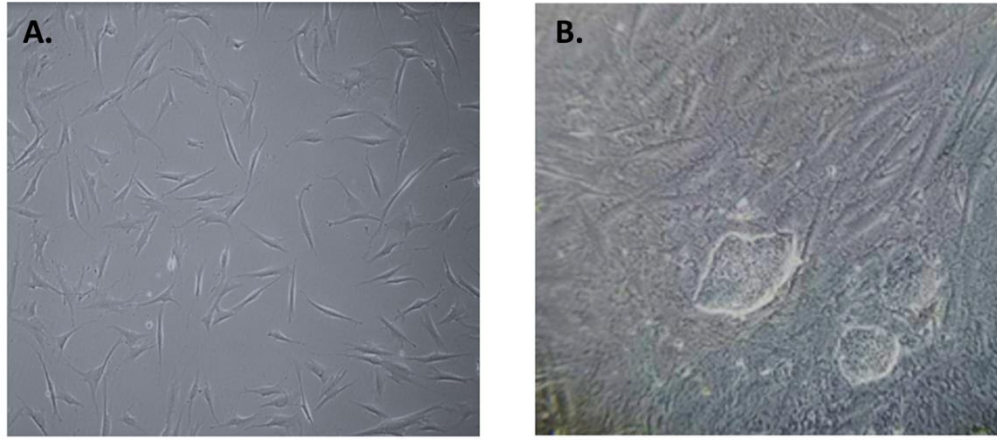
Bölüm 3.2.1’de bahsedildiği üzere, çalışma grubuna dahil edilen bireylerden elde edilen primer fibroblast kültürleri L-MYC, LIN28, Sox2, Klf4 ve OCT3/4 transkripsiyon faktörleri kullanılarak episomal yeniden programlama yöntemi ile indüklenmiş pluripotent kök hücrelere dönüştürülmüştür (195). Episomal yeniden programlamada kullanılan plazmidlerin (pCXLE-hUL (insan L-MYC ve LIN28 genlerini içeren plazmid) (Addgene #27080), pCXLE-hSK (insan Sox2 ve Klf4 genlerini içeren plazmid) (Addgene #27078) ve pCXLE-hOCT3/4 (insan OCT3/4 geni içeren plazmid) (Addgene #27076)) konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Episomal yeniden programlama yönteminde kullanılan plazmidlerin saflık ve miktar tayini sonuçları.

Plazmid adı	Konsantrasyon (ng/μl)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
pCXLE-hSK	5107,2	1,93	2,18
pCXLE-hUL	3605	1,95	2,25
pCXLE-hOCT 3/4	2291	1,95	2,24

(OD: optik dansite)

Primer fibroblast hücrelerinin (Pasaj #2) yeniden programlanmasından itibaren yaklaşık 10 ila 30 gün içerisinde oluşan iPKH kolonileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Çalışma grubuna dahil edilen her bir bireyin fibroblast örneğinden en az 3’er iPKH kolonisi seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. iPKH’lerin morfolojik yapıları Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Elde edilen koloniler, mikroskop yardımıyla izole edilip kültür kabındaki fibroblast hücrelerden ayrıştırılarak E8 besiyeri içerisinde çoğaltılmıştır.

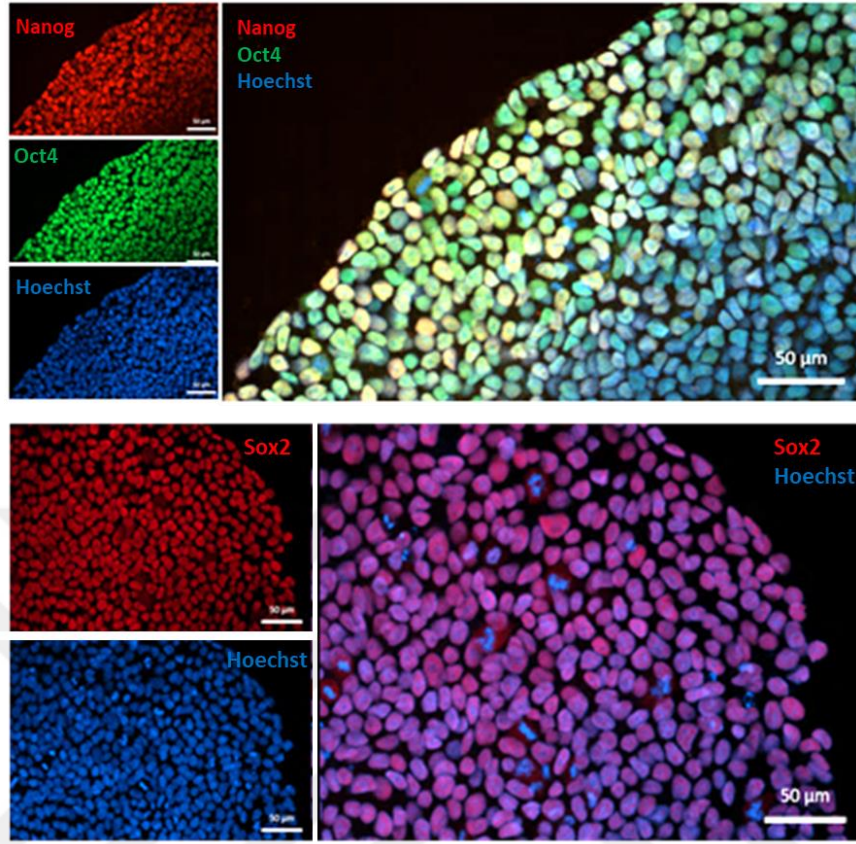


Şekil 4.1. (A) Yeniden programlama öncesinde kültüre edilen primer fibroblast hücreleri. (B) Primer fibroblast hücrelerin yeniden programlanması sonucu elde edilen iPKH kolonileri. (Büyütme: (A)10X (B)20X).

4.2. iPKH'lerin Karakterizasyonu

4.2.1. iPKH'lerin Kök Hücre Özelliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen iPKH kolonileri pasaj#5'e kadar çoğaltıldıktan sonra karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. iPKH'lerin kök hücre özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kök hücrelere özgü transkripsiyon faktörlerinden olan Oct4, Sox2 ve Nanog belirteçlerinin hücre içi lokalizasyonları ve ifadesi immüno floresan boyama yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Belirtilen belirteçlerin elde edilen tüm iPKH'lerde ifade olduğu ve bahsedilen transkripsiyon faktörlerinin çekirdekte yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Kök hücre transkripsiyon faktörlerinin (Oct4, Sox2 ve Nanog) iPKH’lerde ifade ve yerleşiminin görüntüsü (Ölçek çubuğu: 50μm).

4.2.2. iPKH’lerin Karyotip Analizleri

Yeniden programlama sürecinde hücrelerin ‘Yamanaka Faktörleri’ ile transfeksiyonu sonrasında genomda oluşabilecek kromozomal anomalilerin tespiti için moleküler karyotip analizi gerçekleştirilmiş olup, elde edilen iPKH kolonilerinde herhangi bir kromozomal anomali (delesyon/insersiyon) saptanmamıştır. Kromozomal anomali saptanmayan iPKH’lerden birine ait moleküler karyotip analiz raporu Şekil 4.3 (A)’de gösterilmiştir. Elde edilen bazı iPKH’lerin karyotip moleküler karyotip analiz sonuçlarında ise genomda bazı lokasyonlarda ‘heterozigotluk kaybı’ olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3 (B)). Tespit edilen ‘heterozigotluk kaybı’ yeniden programlama sonucu görülebilecek bir kromozomal anomali olmamakla birlikte, bu durum akraba evliliği sonucunda allellerdeki heterozigotluğun kaybindan ileri gelen

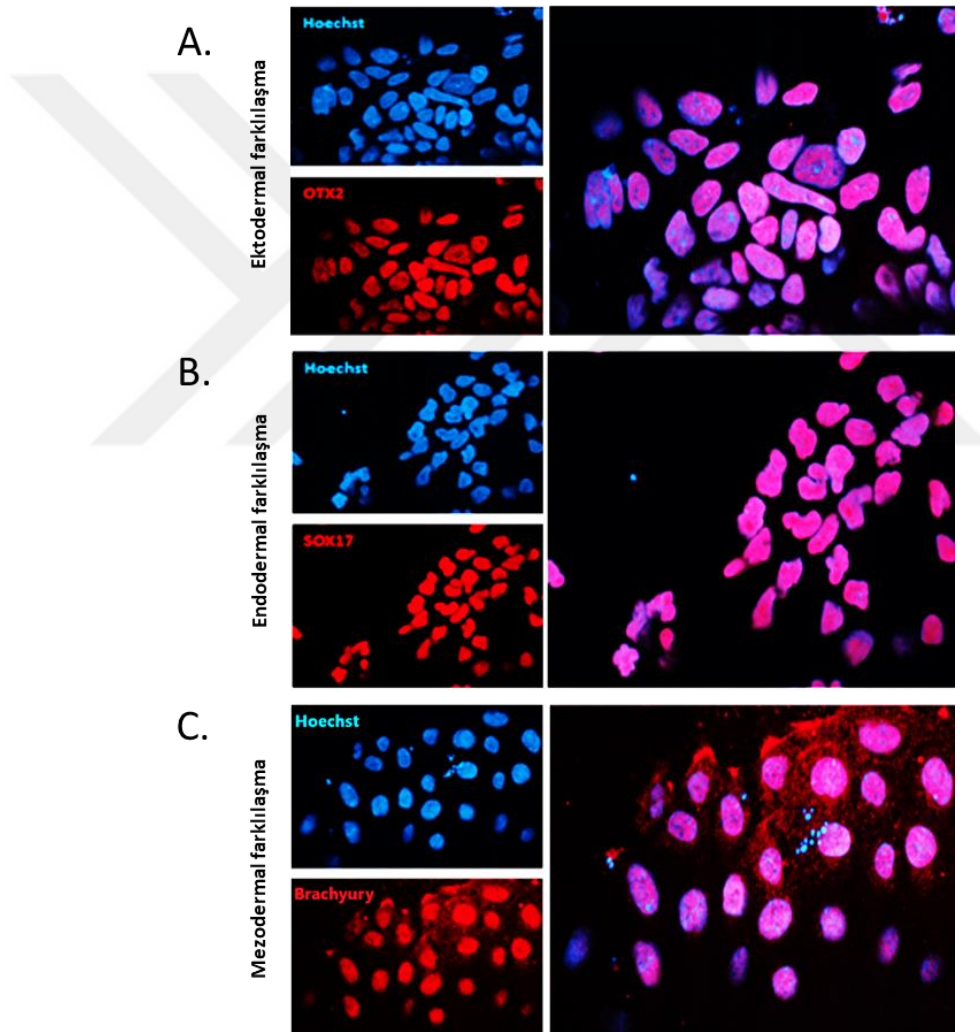
bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Pek çok otozomal resesif genetik hastalık, ebeveynlerin akrabalığı ile ilişkilidir ve bu tür ailelerde doğan bireyler tipik olarak kromozomal ‘heterozigotluk kaybı’ sergilemektedir (200). Çalışma grubuna dahil edilen iki hastada (L444P/L444P ve D409H/D409H genotipine sahip bireyler) bulunduğu ailelerde akraba evliliği öyküsü olduğundan, bu bireylerin iPKH’lerinde genom boyunca birden farklı kromozomal bölgelerde ‘heterozigotluk kaybı’ olduğu tespit edilmiştir. Fakat çalışma grubuna dahil edilen iPKH’lerde fonksiyonel analizlerle kullanılmalarına engel olacak herhangi bir kromozomal anomali tespit edilmemiştir.

A.  Karyotype Report Customer sample ID: 110123C_C1 Internal sample ID: LU71DIVULUD100116 Date of receipt: 02.07.2018 Genotype identity with: 110123C_C3_P8-2018-07-02 / LUDIVULU00115 Karyotyping Technology used: Illumina BeadArray Product: HumanOmni2.5Exome-8 BeadChip v1.3 Manifest file: HumanOmni2-5Exome-8v1-3_A1.bpm Cluster file: HumanOmni2-5Exome-8v1-3_A1.egt Chip barcode and segment: 201353490002 R02C01 Batch ID and 96 well position: WG6906660-MSA6 B01 Call rate: 0,9849067 Typing Scanner: Illumina iScan, S/N: N234 Site of processing: Life&Brain GENOMICS, Bonn, Germany Manufacturer: Illumina, Inc., San Diego, United States of America Date of scan: 2018-07-30-1618 Genotype Analysis Genome Studio: GenomeStudio V2.0.2 Genotyping module: Ver. 2.0.2 Copy Number Analysis Algorithm applied: CNV-Partition Version: 3.2 Software producer: Illumina, Inc., San Diego, United States of America Noteworthy findings No larger chromosomal aberrations to be reported. Analyst Stefan Herms Stefan.Herms@unibas.ch Tel.: +41 61 328 50 19	B.  Karyotype Report Customer sample ID: 060512C_C2 Internal sample ID: LU17DIVULUD100118 Date of receipt: 02.07.2018 Genotype identity with: 060512C_C5_P9-2018-07-02 / LUDIVULU00119, 060512C_C7-2018-07-02 / LUDIVULU00120 Karyotyping Technology used: Illumina BeadArray Product: HumanOmni2.5Exome-8 BeadChip v1.3 Manifest file: HumanOmni2-5Exome-8v1-3_A1.bpm Cluster file: HumanOmni2-5Exome-8v1-3_A1.egt Chip barcode and segment: 201353490002 R04C01 Batch ID and 96 well position: WG6906660-MSA6 D01 Call rate: 0,9920038 Typing Scanner: Illumina iScan, S/N: N234 Site of processing: Life&Brain GENOMICS, Bonn, Germany Manufacturer: Illumina, Inc., San Diego, United States of America Date of scan: 2018-07-30-1643 Genotype Analysis Genome Studio: GenomeStudio V2.0.2 Genotyping module: Ver. 2.0.2 Copy Number Analysis Algorithm applied: CNV-Partition Version: 3.2 Software producer: Illumina, Inc., San Diego, United States of America Noteworthy findings Extended regions of loss of heterozygosity on chrs: 2, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 18 Analyst Stefan Herms Stefan.Herms@unibas.ch Tel.: +41 61 328 50 19
--	--

Şekil 4.3. Moleküler karyotipleme ile elde edilen analiz sonucu örnekleri.

4.2.3. iPKH'lerin Pluripotent Özelliklerinin Belirlenmesi

iPKH kolonilerin pluripotent özelliğinin test edilmesi amacıyla hücreler *in vitro* ortamda endodermal, mezodermal ve ektodermal farklılaşmaya bırakılmıştır. Farklılaşma sonucunda hücrelerin pluripotensi kapasiteleri her bir germ tabakasına özgül belirteçler (Ektoderm için Otx-2, Endoderm için SOX17 ve Mezoderm için Brachyury) kullanılarak analiz edilmiştir. iPKH hücrelerinin her 3 germ tabakasına özgül belirteçleri ifade ettiği ve bu tabakalara farklılaşma potansiyeli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

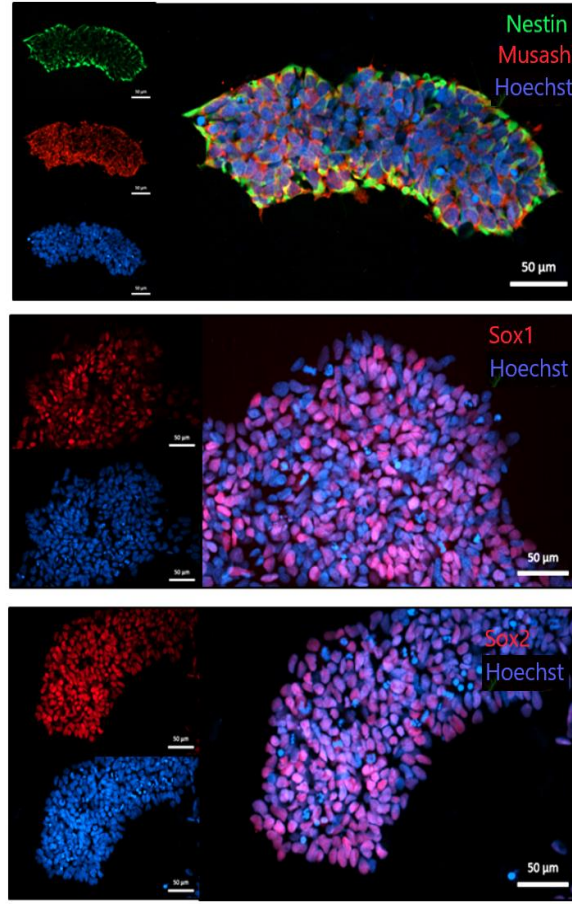


Şekil 4.4. iPKH kolonilerinin 3 farklı germ tabakasına farklılaştırıldıktan sonra ifade ettikleri germ tabakalarına özgül belirteçlerin (A) ektoderm için Otx2; (B) Endoderm için SOX17 ve (C) Mezoderm için Brachyury immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63x).

4.3. iPKH'lerin Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırılması ve Nöronal Kültürlerin Karakterizasyonu

iPKH kolonilerinin kromozomal anomali taşımadığı, kök hücre belirteçlerini ifade ettiği ve pluripotent özelliklerinin olduğu tespit edildikten sonra hücreler dopaminerjik nöronlara farklılaştırılmak üzere iki aşamalı bir protokole tabi tutulmuştur (195). Bu protokolün ilk aşamasında, hücreler nöronal progenitör hücrelere farklılaştırılmıştır. iPKH'lerin nöronal progenitör hücrelerine farklılaştırılması aşamasında, bFGF içeren insan embriyonik kök hücre besiyerine BMP ve TGF β sinyal yollarının inhibitörü olan SB43152 (SB) ve dorsomorphin (DM) ile GSK3b inhibitörü olan CHIR99021 (CHIR) eklenerek nöronal farklılaşma tetiklenmiştir. Ayrıca, nöronal hücre kültürü besiyerine GSK3b inhibitörü olan CHIR99021, SHH yolağı stimülatörü olan purmorphamine ve nöronal olgunlaşma için askorbik asit (AA) eklenerek nöronal progenitör hücreler elde edilmiştir.

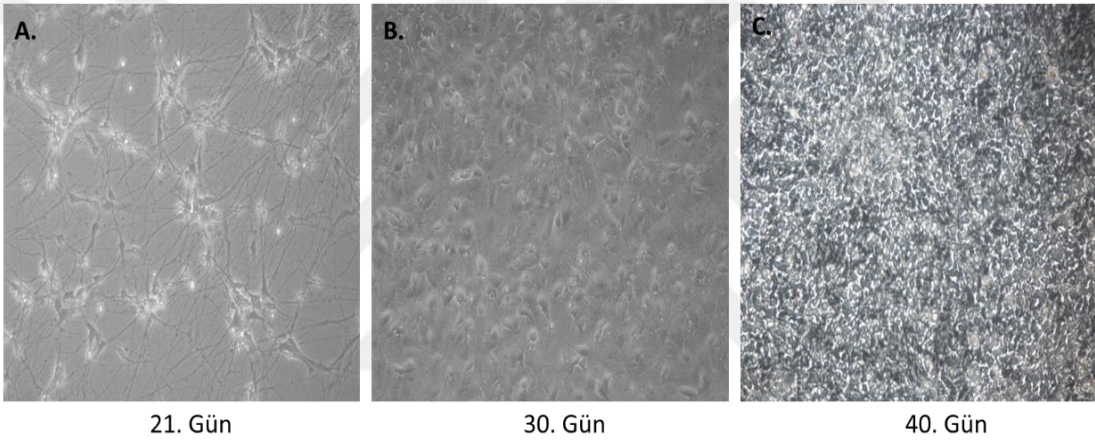
Elde edilen nöronal progenitör hücrelerin nöron kök hücre özelliği taşıyıp taşımadıkları nöron kök hücre belirteçleri (Nestin, Musashi, Sox1 ve Sox2) kullanılarak yapılan immünofloresan boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen nöronal progenitör hücrelerin nöron kök hücre belirteçlerini ifade ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Nöron progenitör hücrelerde nörona özgül belirteçlerin (Nestin, Musashi, Sox1 ve Sox2) ifadesinin immünfloresan görüntüleri. (Ölçek çubuğu: 50 µm)

Nöron kök hücre karakteri taşıdığı tespit edilen nöronal progenitör hücreler daha sonra farklılaştırmanın ikinci aşaması olan dopaminerjik nöronlara farklılaştırma protokolüne tabi tutulmuştur. Bu aşamada, modifiye nöronal hücre kültürü besiyerine ilk 8 günlük süreçte askorbik asit, *purmorphamine* ve FGF8b (*Fibroblast growth factor 8*) eklenerek dopaminerjik nöronlar da dahil olmak üzere orta beyin hücrelerinin oluşumu tetiklenmiştir (201). Daha sonra nöronların olgunlaşması aşamasında da BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*), TGFβ3 (*Transforming Growth Factor Beta 3*), ve dbcAMP (*Dibutyl cyclic-AMP*) eklenerek hücreler olgunlaştırılmıştır (195). Kullanılan farklılaştırma protokolüne göre iPKH kökenli dopaminerjik nöronların farklılaşmanın 21. gününde olgun nöronlar haline geldikleri ve fonksiyonel çalışmalarda

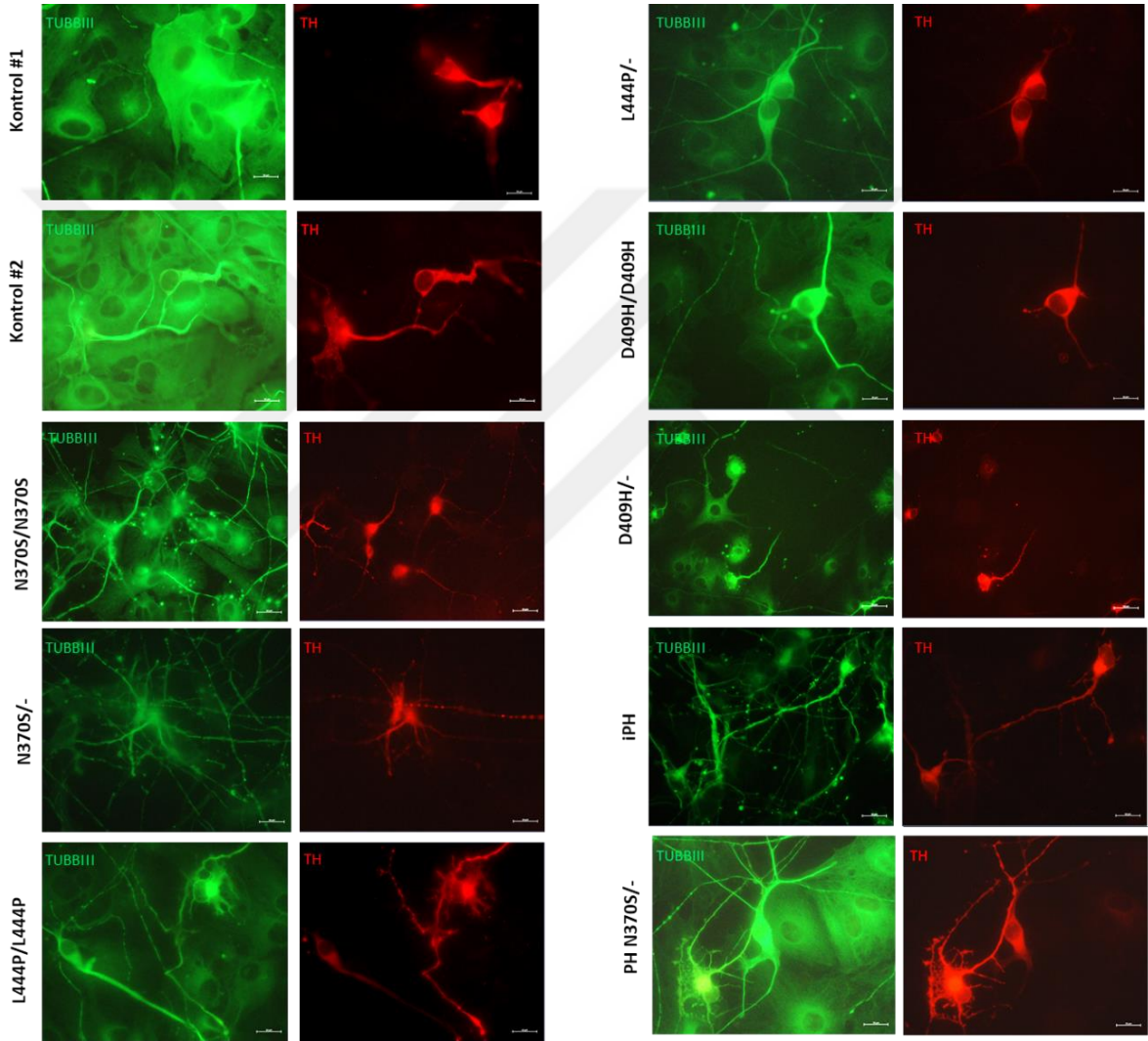
kullanılabilecekleri belirtilmektedir (195). Bu çalışmada ise, fonksiyonel analizlerde kullanılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürleri 40 ila 90 gün boyunca farklılaştırılmış ve böylece hücrelere α -sinüklein birikimin tetiklenmesi için hücresel yaşlandırma tekniği uygulanmıştır. Literatürde de, GBA mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöron modelleri 30 ila 120 gün arasında farklılaştırılarak α -sinüklein ilişkili patolojiyi araştırmaya yönelik fonksiyonel analizler gerçekleştirilmiştir (114, 202). Nöronal progenitör hücrelerden farklılaştırılan dopaminerjik nöronların farklılaşma sürecinde 21. (Şekil 4.6. (A)), 30. (Şekil 4.6. (B)) ve 40. (Şekil 4.6. (C))günlerde morfolojik görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Nöron progenitör hücrelerin dopaminerjik nöronlara farklılaştırılması sürecinde farklılaşmanın (A) 21., (B) 30. ve (C) 40. günlerinde hücrelerin morfolojik görüntüleri (Büyütme A ve B: 20X, C: 10X).

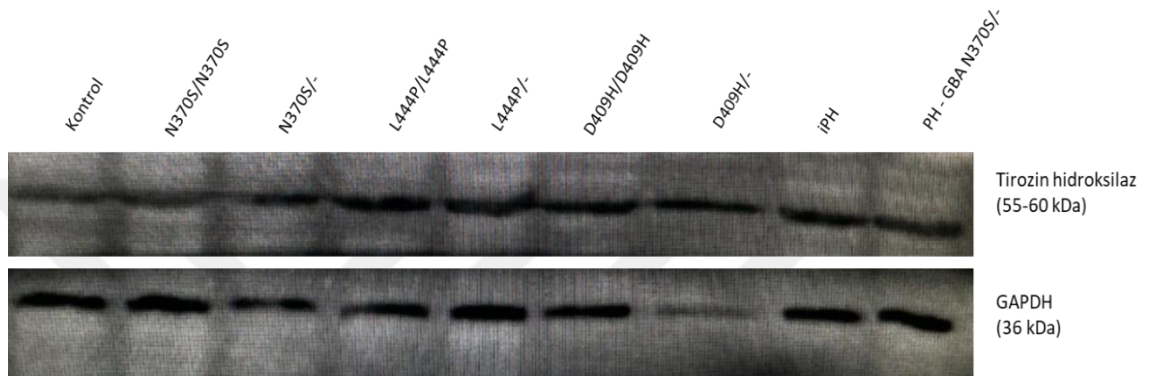
iPKH'lerin iki aşamalı farklılaştırma protokolü kullanılarak dopaminerjik nöron kültürlerine farklılaştırılması sonucunda, içerisinde dopaminerjik nöronlar da dahil olmak üzere heterojen bir nöron kültürü elde edilmektedir. Elde edilen nöronal kültürlerde bulunan dopaminerjik nöronların karakterizasyonu için tirozin hidroksilaz enziminin ifadesi analiz edilmiştir (Şekil 4.7.). Dopaminerjik nöronların tanımlanmasında, bu hücrelerdeki dopamin sentez yolağında L-tirozinin L-3,4-dihidroksifenilalanine dönüşümünde hız sınırlayıcı enzim olan tirozin hidroksilaz (TH) ifadesinin analizi altın standart olarak kabul edilmektedir (203). Çalışmamızda,

iPKH'lerin farklılaştırma protokolü sonrasında 40. günde, elde edilen tüm hücre hatlarında β -TubIII ifade eden nöronların ve tirozin hidroksilaz ifade eden dopaminerjik nöronların varlığı immünfloresan boyama tekniği ile tespit edilmiştir (Şekil 4.7.). İmmünfloresan boyama görüntülerine göre iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde TH ifade eden dopaminerjik nöronların yüzdesinin kültürdeki oranının %15 ila %25 oranında olduğu saptanmıştır



Şekil 4.7. Nöronal farklılaşma sonrası hücre gruplarında nöron belirteci Sınıf 3 β -tübülin (TUBBIII, yeşil) ve dopaminerjik nöron belirteci tirozin hidroksilaz (TH, kırmızı) ifadelerinin immünfloresan görüntüleri. (Ölçek çubuğu: 10 μ m)

İmmünblot tekniği ile hücrelerde tirozin hidroksilaz ifade oranına bakıldığında ise gruplar arasında dopaminerjik nöron farklılaşma potansiyelleri arasında ifade farklılığı olmadığı görülmektedir (Şekil 4.8.). Gruplar arasında dopaminerjik nöronların oranları arasında anlamlı farklılıkların olmaması, elde edilen in vitro modellerin α -sinüklein patolojisini fonksiyonel olarak incelemek açısından uygun bir model olduğunu ortaya koymaktadır.



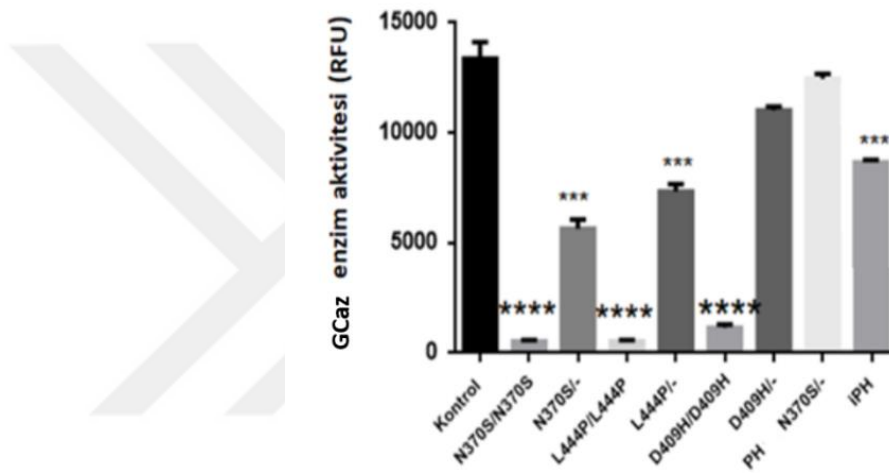
Şekil 4.8. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda tirozin hidroksilaz ifade seviyelerini gösteren immünblot analizi görüntüsü.

Yapılan farklılaştırma ve karakterizasyon analizleri sonucuna göre, fonksiyonel analizlerde kullanılmak üzere uygun hasta kaynaklı primer fibroblast hücrelerinden iPKH kökenli dopaminerjik nöron modelleri başarıyla elde edilmiştir.

4.4. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda β -Glukoserebrosidaz (GCaz) enzim ifade ve aktivitesinin belirlenmesi

iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda GCaz enziminin aktivitesi, ifadesi ve LIMP II aracılı lizozoma taşınımı analiz edilmiştir. İlk olarak, 40 gün süresince dopaminerjik nöronal farklılaşmaya maruz bırakılan hücrelerde GCaz enziminin aktivite analizi, enzimin modifiye bir substratı olan florojenik 4Mu- β -Glc kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, homozigot GBA1 gen mutasyonlarının (N370S/N370S, L444P/L444P

ve D409H/D409H) GCaz enzim aktivitesinde anlamlı şekilde inhibisyona neden oldukları tespit edilmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4.9). N370S/- ve L444P/- genotipine sahip heterozigot taşıyıcı bireylerin hücrelerde enzim aktivitesinin %50 seviyelerinde anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). D409H/- genotipine sahip taşıyıcı bireyin hücrelerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. İdyopatik PH hastasının ve N370S/- genotipine sahip PH hastasının hücreleri karşılaştırıldığında ise, GBA1 N370S heterozigot mutasyonunun GCaz enzim aktivitesinde anlamlı şekilde düşüşe sebep olduğu görülmüştür.

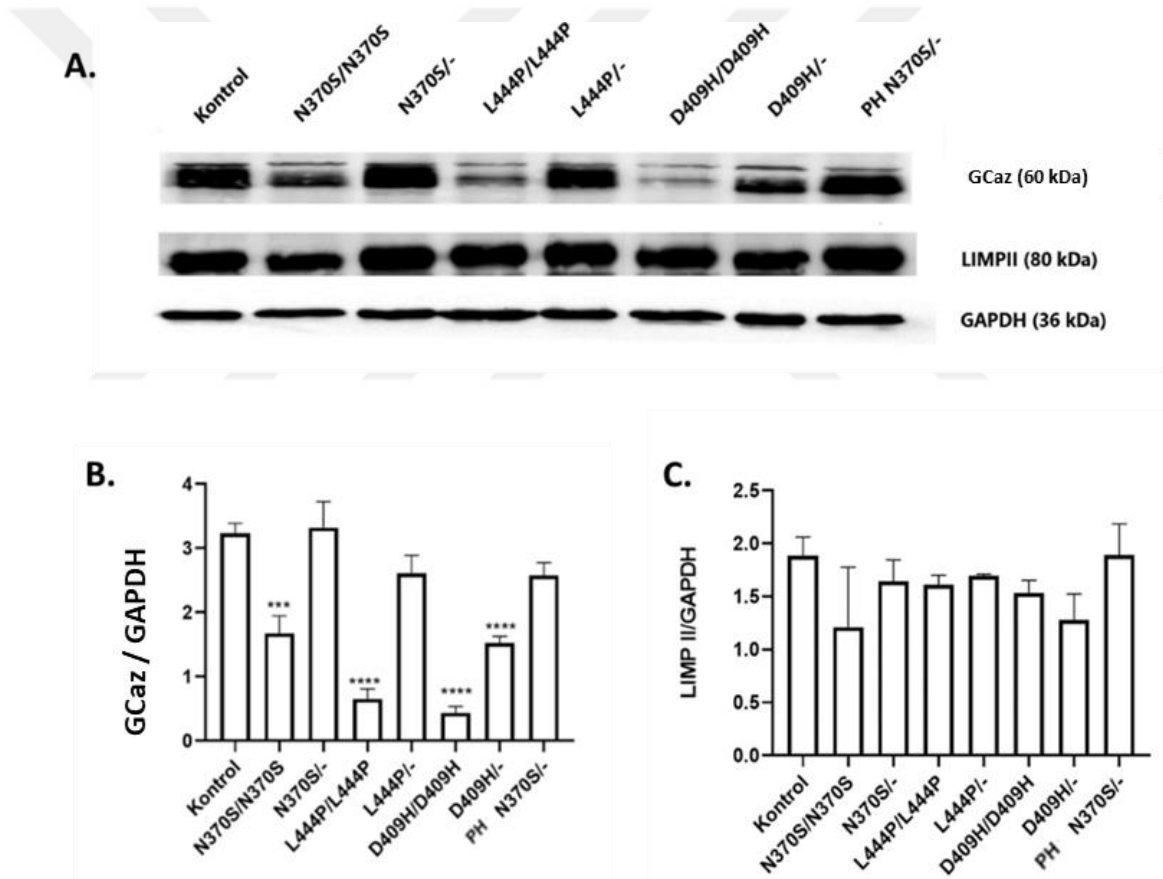


Şekil 4.9. GCaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *** ve **** ile gösterilmiştir (RFU: rölatif floresan ünite, $n=3$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$).

GBA1 gen mutasyonlarının GCaz enziminin ifadesine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla, immüblot yöntemi ile protein ifade analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10 (A)). Elde edilen verilere göre, kontrol hücrelere kıyasla, GCaz enzim ifadesinin N370S/N370S, L444P/L444P ve D409H/D409H genotiplerine sahip hücrelerde anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$ ve $p<0,0001$) (Şekil 4.10 (B)). Heterozigot GBA1 mutasyonuna sahip taşıyıcı bireylerden elde edilen hücrelerde yalnızca D409H/- mutasyonuna sahip hücrelerde anlamlı şekilde GCaz ifadesinde azalma saptanmıştır ($p<0,0001$). N370S/- ve L444P/- genotipine sahip

taşıyıcı bireylerin hücrelerinde anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, iPH ve PH N370S/- hücrelerinde enzim ifadesinde farklılık tespit edilmemiştir.

GBA1 gen mutasyonlarının GCaz ifadesine etkilerinin yanı sıra, bu enzimin lizozoma taşınması sürecine de etkilerinin olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple, GCaz enzimin ER’de sentezlenmesinden sonra mannoz-6-fosfat yolağından bağımsız şekilde lizozoma taşınmasından sorumlu olan LIMP II lizozomal reseptör proteininin ifadesi analiz edilmiştir (Şekil 4.10 (A)). Yapılan analizler sonucunda GBA1 gen mutasyonlarının GCaz enziminin lizozoma ulaşmasında görevli olan LIMP II proteininin ifadesini etkilemediği tespit edilmiştir (Şekil 4.10 (C)).



Şekil 4.10. (A) 40 gün farklılaştırılmış iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda GCaz ve LIMP II protein ifade seviyelerini gösteren immünblot analizi görüntüsü. Kontrol ve GBA1 gen mutasyonlarına sahip hücrelerde GAPDH ifadesine normalize edilmiş (B) GCaz (C) LIMP II ifadelerinin grafiği. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *** ve **** ile gösterilmiştir (RFU: rölatif floresan ünite, n=3, ***: p<0,001, ****: p<0,0001).

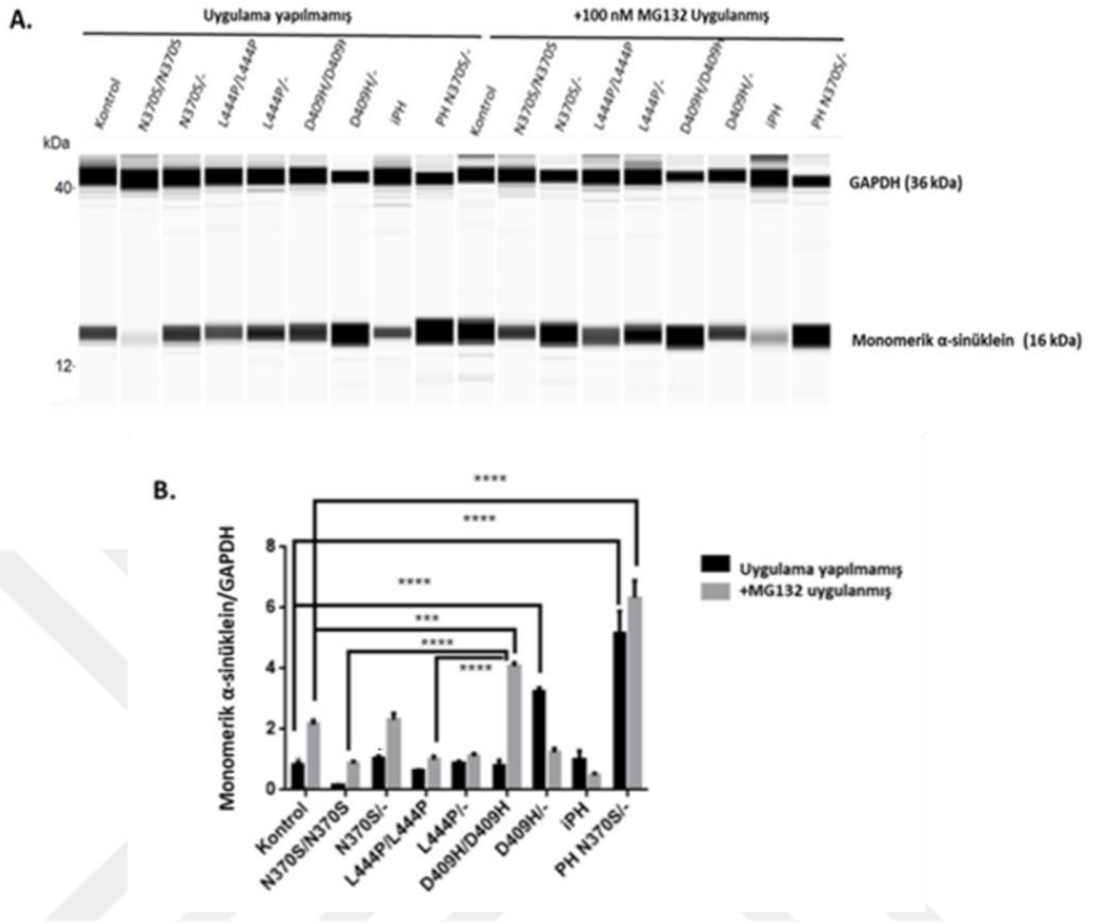
Sonuç olarak, GBA1 gen mutasyonlarının homozigot olduğu durumlarda (N370S/N370S, L444P/L444P ve D409H/D409H) iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde, hem GCaz enzim aktivitesinin hem de GCaz ifadesinin kontrol hücrelere kıyasla anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. GCaz ifadesindeki azalmanın, özellikle ‘ağır’ GBA gen mutasyonlarında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. N370S/- ve L444P/- heterozigot GBA1 gen mutasyonlarına sahip hücrelerde GCaz aktivitesinde anlamlı şekilde azalma görülürken, D409H/- heterozigot GBA1 mutant hücrelerde ise GCaz aktivitesinde değişiklik saptanmazken, GCaz ifadesinde anlamlı azalma tespit edilmiştir. GBA1 gen mutasyonlarının, GCaz enziminin lizozoma taşınmasında herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Parkinson hastası bireylerin hücrelerinde GCaz enzim ifadesi ve lizozomal taşınımı ile ilgili bir değişiklik saptanmamıştır. Fakat, idyopatik PH hastası ve N370S/- GBA1 genotipine sahip PH hastasının GCaz enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, GBA1 heterozigot mutasyon varlığında enzim aktivitesinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür.

4.5. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda α -sinüklein ifadesi ve hücre dışına salınımının belirlenmesi

Mutant GCaz enzimi ve α -sinükleinin patolojik birikimi arasında doğrudan bir bağlantı olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (7, 142, 204). Özellikle mutant GCaz enziminin hücre içi α -sinüklein birikimini tetiklediği, biriken α -sinükleinin de GCaz enziminin ER’den lizozoma taşınımını bozarak aktivitesini inhibe ettiği ve böylece iki protein arasında ‘iki yönlü bir patolojik döngü’ mekanizmasının olduğu öne sürülmüştür (7). Bu nedenle, çalışmamızda iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde ‘hafif’ (N370S) ve ‘ağır’ (L444P ve D409H) GBA1 gen mutasyonlarının homozigot ve/veya heterozigot durumda α -sinüklein birikimine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk olarak, iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde monomerik α -sinüklein birikimi immüno blot tekniği ile analiz edilmiştir (Şekil 4.11 (A)). Elde edilen verilere göre, bazal koşullarda, kontrol hücrelere kıyasla GBA1 gen mutasyonu taşıyan Parkinson hastası (PH N370S/-) ve D409H heterozigot GBA1 gen

mutasyonuna sahip taşıyıcı bireyin (D409H/-) hücrelerinde anlamlı seviyede monomerik α -sinüklein artışı tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Diğer gruplarda kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.11 (B)).

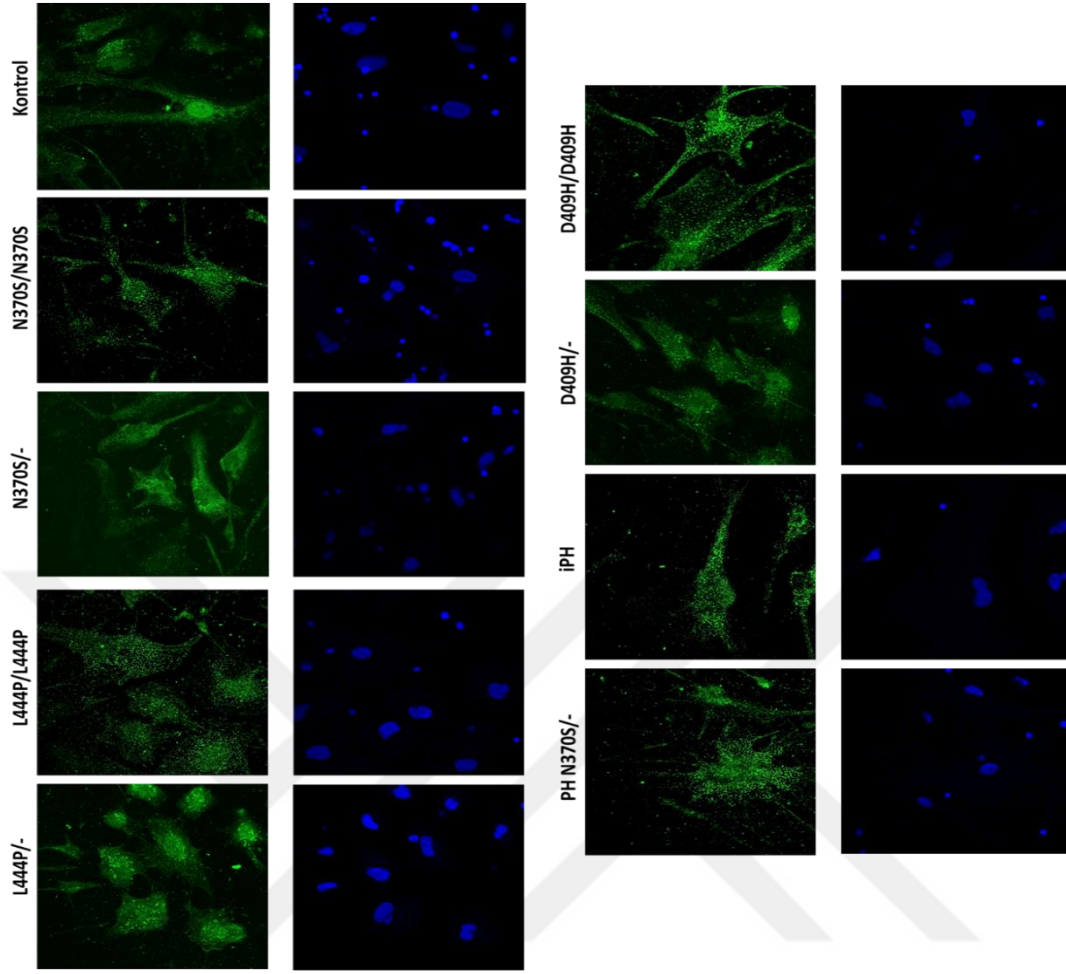
Bazal koşullara ek olarak, GBA1 gen mutasyonlarının hücrelerde monomerik α -sinüklein birikimi üzerindeki etkileri, bu proteinin yıkımından sorumlu temel mekanizma olan Ubikitin-Proteazom Sistemi (UPS) baskılanarak da değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, UPS sistemini baskılamak üzere hücrelere 24 saat boyunca 100 nM MG132 uygulaması yapılmıştır. MG132 (*carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*), 26S proteazom kompleksinin proteolitik aktivitesini etkili bir şekilde bloke eden bir peptit aldehit olup geri dönüşümlü proteazom inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Elde edilen verilere göre, MG132 uygulaması sonrasında, kontrol hücrelere kıyasla, D409H/D409H hücrelerinde ve GBA1 gen mutasyonu taşıyan Parkinson hastası hücrelerinde (PH N370S/-) anlamlı şekilde monomerik α -sinüklein artışı tespit edilmiştir ($p< 0.001$ ve $p<0,0001$) (Şekil 4.11 (B)).



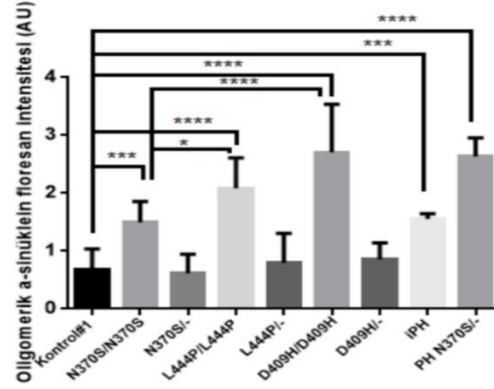
Şekil 4.11. (A) iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda uygulama yapılmamış bazal koşullarda ve 24 saat boyunca 100 nM MG132 proteazom inhibitörü uygulanmış koşullarda hücre içi α -sinüklein protein ifade seviyelerini gösteren immünblot analizi görüntüsü. (B) Kontrol ve GBA1 mutant hücrelerde GAPDH ifadesine normalize edilmiş α -sinüklein bantlarının optik yoğunluklarının grafiği. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *** ve **** ile gösterilmiştir (n=3, ***: p<0,001, ****: p<0,0001).

Hücrelerdeki monomerik α -sinüklein birikiminin yanı sıra, hücrelerde oligomerik ve fibriller α -sinüklein birikimine neden olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu amaçla, hücrelerdeki α -sinükleinlerin oligomerleşme potansiyelini incelemek üzere α -sinüklein gibi amiloidojenik yapıdaki proteinlere özgül bir epitopu tanıyarak oligomer ve protofibriller yapıdaki agregatlarla reaksiyona girebilen anti-oligomerik (A11) antikoru (205) kullanılarak immünfloresan boyama yöntemi ile oligomer formdaki α -sinüklein birikimi analiz edilmiştir. Elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri Şekil 4.12 (A)'da gösterilmektedir. Verilerin floresan intensite kantitasyon

sonuçlarının grafiği Şekil 4.12 (B)'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm homozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip hastaların (N370S/ N370S, L444P/ L444P ve D409H/ D409H) hem de Parkinson hastalarının (iPH ve PH N370S/-) iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla anlamlı şekilde oligomerik α -sinüklein birikimi olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$, ****: $p<0,0001$) (Şekil 4.12). Ek olarak, 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 homozigot gen mutasyonlarının 'hafif' (N370S) GBA1 homozigot gen mutasyonu durumuna göre hücrelerde daha fazla oligomerik α -sinüklein birikimine neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12 (B)). Bununla birlikte, N370S heterozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip Parkinson hastası bireyin hücrelerinde, GBA1 gen mutasyonu taşımayan idyopatik Parkinson hastası bireye göre anlamlı şekilde daha fazla oligomerik α -sinüklein birikimi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12 (B)).

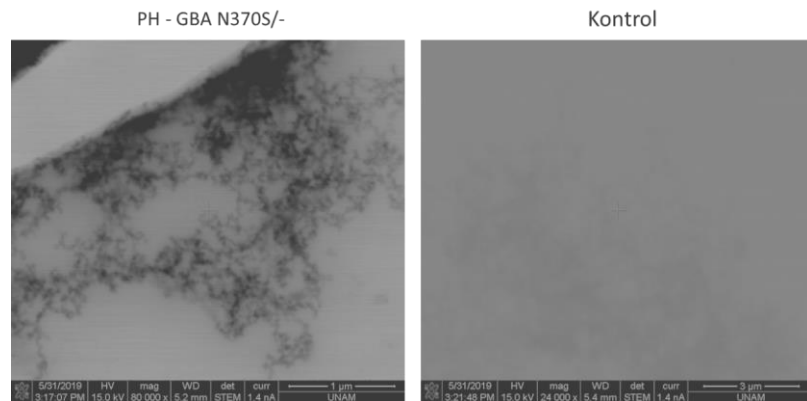


B.

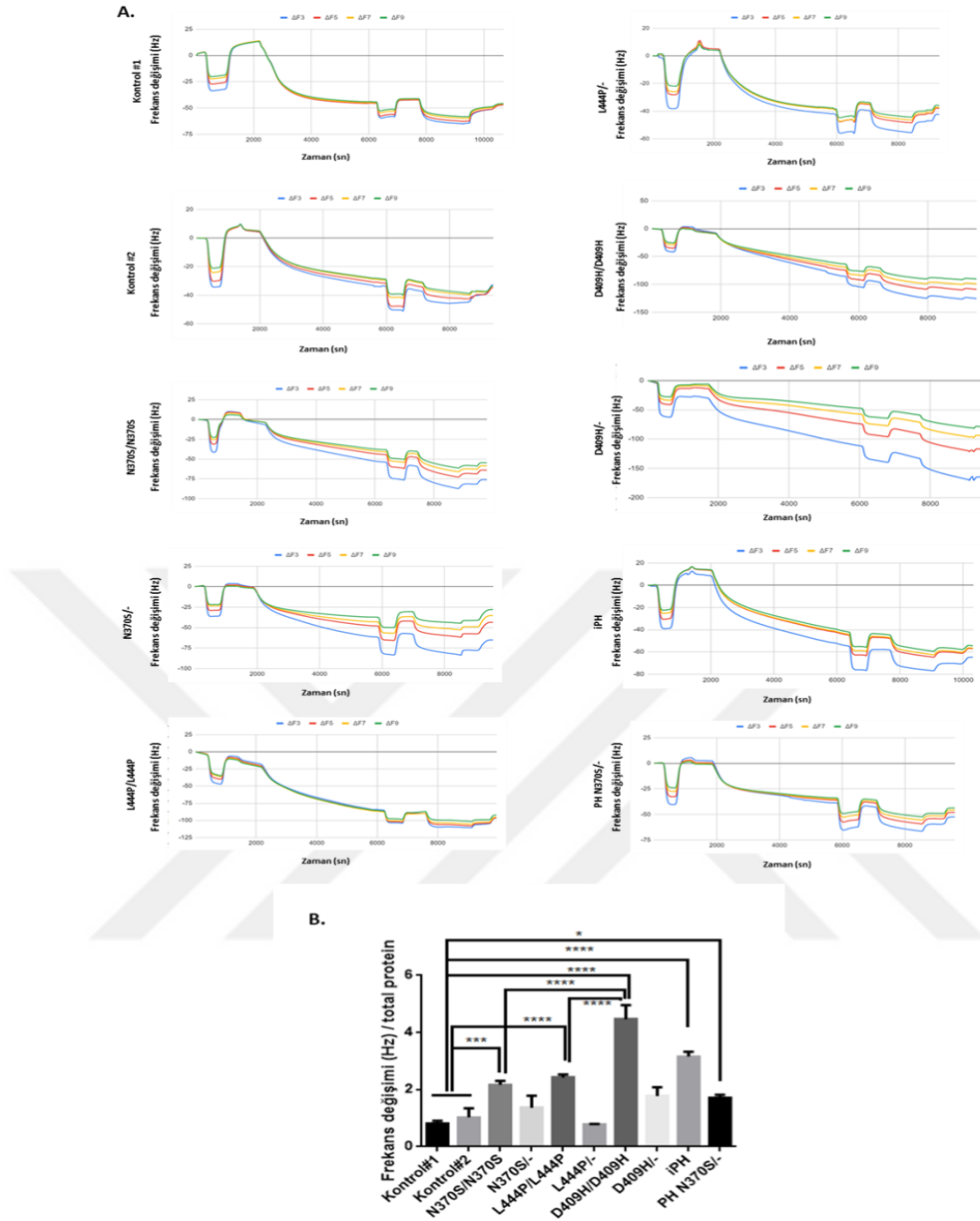


Şekil 4.12. (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde oligomer/fibriller yapıdaki α -sinükleinin (yeşil) ve çekirdeklerin (mavi) immünfloresan görüntüleri (Büyütme: 63X). (B) Hücrelerde oligomer/fibriller yapıdaki α -sinükleinin immünfloresan intensite kantitasyon analizi sonuçları 'Arbitrary Unit (AU)' olarak gösterilmiştir. (Veriler her bir hücre grubundan 20'şer hücre analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *, *** ve **** ile gösterilmiştir (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

GBA1 geni ile ilişkili PH patogenezinde, mutant GCaz enziminin α -sinüklein birikimini tetiklemesinin yanı sıra, α -sinüklein salınımını da etkileyebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (83, 206, 207). Bu nedenle bu çalışmada, GBA1 mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde α -sinüklein salınımının incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, ilk olarak 90 gün boyunca farklılaştırılmış kültürlerin besiyerlerinden alınan örnekler transmisyon elektron mikroskobu ile analiz edilmiştir. Elektron mikroskop sonuçlarına göre, kontrol hücrelerin besiyeri örneklerinde herhangi bir agregat benzeri yapı tanımlanmazken, en yüksek oranda α -sinüklein salınımı beklenen PH N370S/- genotipine sahip hücrelerin besiyerlerinde agregasyon olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Hücrelerden salınan α -sinüklein miktarının kantitasyonuna olanak sağlayan dQCM tekniği ile α -sinüklein salınımı analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar zaman bağlı frekans değişimi grafiği olarak gösterilmiştir (Şekil 4.14 (A)). Verilerin kantitasyonu sonucunda elde edilen grafik (Şekil 4.14 (B))’de gösterilmiştir. Homozigot GBA1 gen mutasyonlarına sahip Gaucher hastalarından (N370S/N370S, L444P/L444P, D409H/D409H) ve Parkinson hastalarından (iPH ve PH N370S/-) elde edilen iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinin besiyerlerinde kontrol hücrelere kıyasla anlamlı şekilde α -sinüklein salınımı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$, $p < 0,001$ ve $p < 0,0001$) (Şekil 4.14 B)). Hererozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip taşıyıcı bireylerin hücre kültür besiyerlerinde α -sinüklein salınımında kontrol hücrelerin besiyerlerine kıyasla anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 4.13. 90 gün boyunca farklılaştırılmış iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinin besiyerlerine salınan α -sinükleinin transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri.



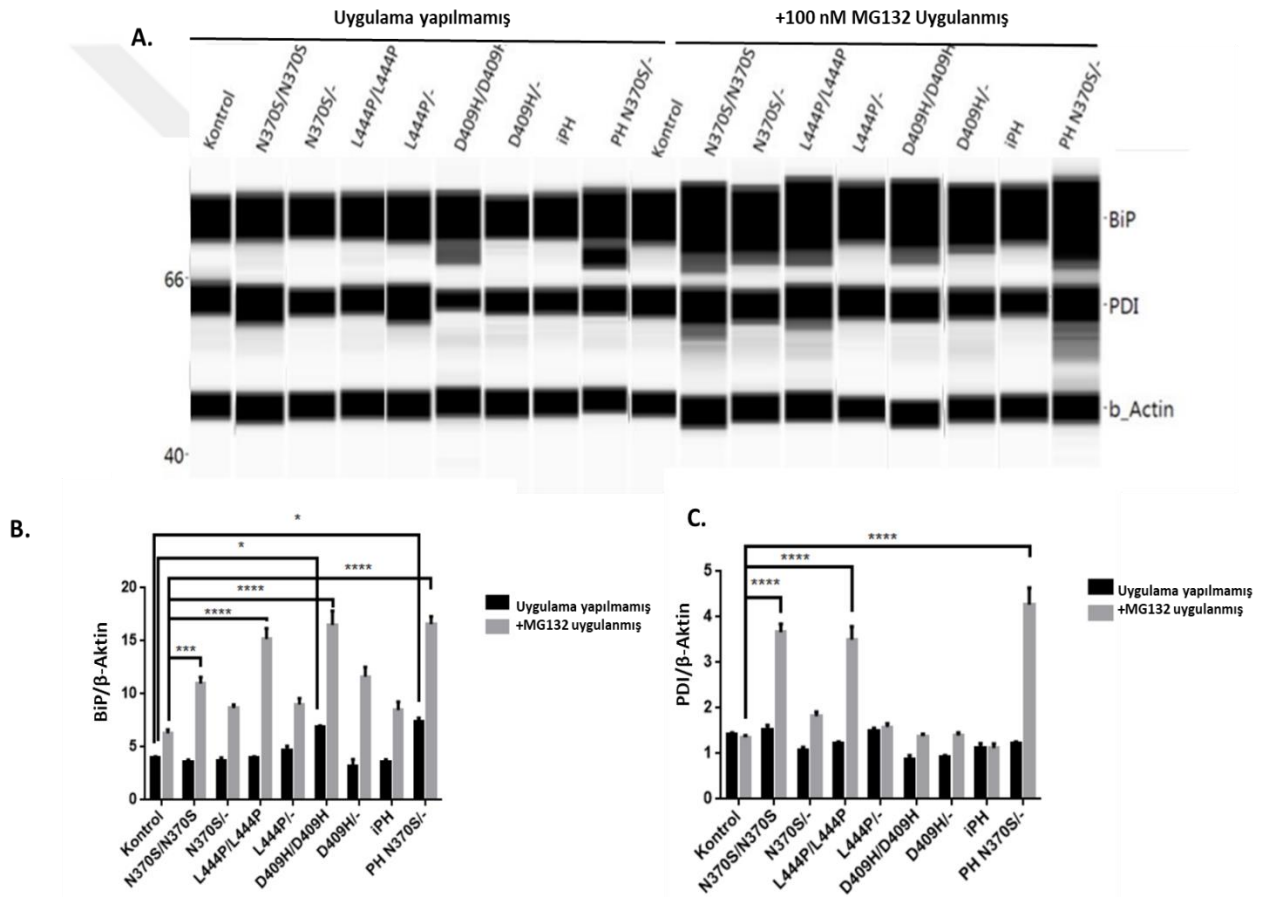
Şekil 4.14. (A) 90 gün boyunca farklılaştırılmış iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinin 90. günde toplanan besiyerlerinde dQCM analizi sonucunda elde edilen frekans değişimi-zaman grafikleri gösterilmektedir. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlardan besiyerlerine salınan α -sinüklein molekülleri dQCM çipinin yüzeyine önceden bağlanmış olan rekombinant monomerik α -sinüklein moleküllerine bağlanmakta ve bu bağlanma sonucu frekans değişimi olarak ölçülmektedir. dQCM tekniğinin detayları Bölüm 3.2.12’de anlatılmıştır. Sarı, mavi, yeşil ve kırmızı renklerde gösterilen eğriler farklı frekans değerlerinde aynı örnek için alınan ölçümleri göstermektedir. Verilerin kantitasyonunda tüm farklı frekans aralıklarında alınan değerlerin (ΔF_3 , ΔF_5 , ΔF_7 ve ΔF_9) ortalaması kullanılmıştır. (B) dQCM datasının kantitasyonu sonucunda elde edilen frekans değişimi grafiği. Sonuçlar total protein miktarlarına oranlanarak normalize edilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *, ** ve **** ile gösterilmiştir (n=3, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001).

4.6. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda Ubikitin Protezom Sistemi Aracılı Protein Yıkımı

ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, proteinin yeniden katlanması için ER stresini indükleyerek katlanmamış protein yanıtının (KPY) aktivasyonuna yol açmaktadır. GBA1 gen mutasyonlarının da, GCaz enziminin ER'de katlanmasında ve stabilizasyonunda bozukluklara sebep olarak katlanmamış protein yanıtını (KPY) aktive ettiği bilinmektedir (30). Bu durumda, KPY'nin üç temel alt mekanizması olan IRE1, PERK ve ATF6 proteinleri devreye girerek yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin doğru katlanmasını sağlamak ve ER'deki protein yükünü azaltmak için ER şaperonlarının (BiP, PDI ve Ire1 α gibi) ifadesini arttırırken aynı zamanda hücresel protein yapımını da baskılamaktadır (208). GBA1 gen mutasyonları durumunda, mutant GCaz enzimi, ER'de yanlış katlanmış olarak tanınmaktadır ve ER kalite kontrol mekanizmaları tarafından doğru şekilde katlanmak amacıyla orada tutulmaktadır. GCaz enzimi, ER'de görevli şaperonlar tarafından doğru katlanamaz ise, sitoplazmaya tekrar gönderilerek ubikuitin-proteazom sistemi tarafından yıkılmaktadır (209). KPY'nin kalıcı aktivasyonu ise, ER stresi ile sonuçlanmaktadır (210). Çalışmada, farklı GBA1 gen mutasyonlarının ER stresi ve UPS üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, GBA1 mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerindeki ER stresi, total ubikitinlenme oranı ve proteazom aktiviteleri analiz edilmiştir.

ER stresine ilişkin KPY mekanizmasında şaperon görevi gören BiP ve PDI şaperonlarının protein ifadeleri immünblot yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.15 (A)). Bazal koşullarda, kontrol hücrelerine kıyasla D409H/D409H ve PH N370S/- mutant hücrelerde BiP ifadesinin anlamlı şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.15 (B)). GBA1 geninde homozigot ve heterozigot mutasyon bulunan fiğer hücrelerde anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bazal koşullarda PDI ifadesinde gruplar arasında değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.15 (C)). Hücrelere MG132 proteazom inhibitörü uygulandığı durumda ise, homozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip hücrelerde (N370S/N370S, L444P/L444P ve D409H/D409H) ve PH

N370S/- hücrelerinde kontrol hücrelere göre BiP ifadesinin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15 (B)). Aynı koşullarda homozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip hücreler kendi aralarında kıyaslandığında ise, ‘hafif’ GBA1 gen mutasyonuna sahip N370S/N370S hücrelere göre, ‘ağır’ GBA1 mutant hücrelerde (L444P/L444P ve D409H/D409H) daha fazla BiP ifade artışı tespit edilmiştir ($p<0,001$ ve $p<0,0001$) (Şekil 4.15 (B)). MG132 proteazom inhibitörü uygulandığı durumda N370S/N370S, L444P/L444P ve PH N370S/- genotiplerine sahip hücrelerde anlamlı şekilde PDI ifade artışı tespit edilmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4.15 (C)).

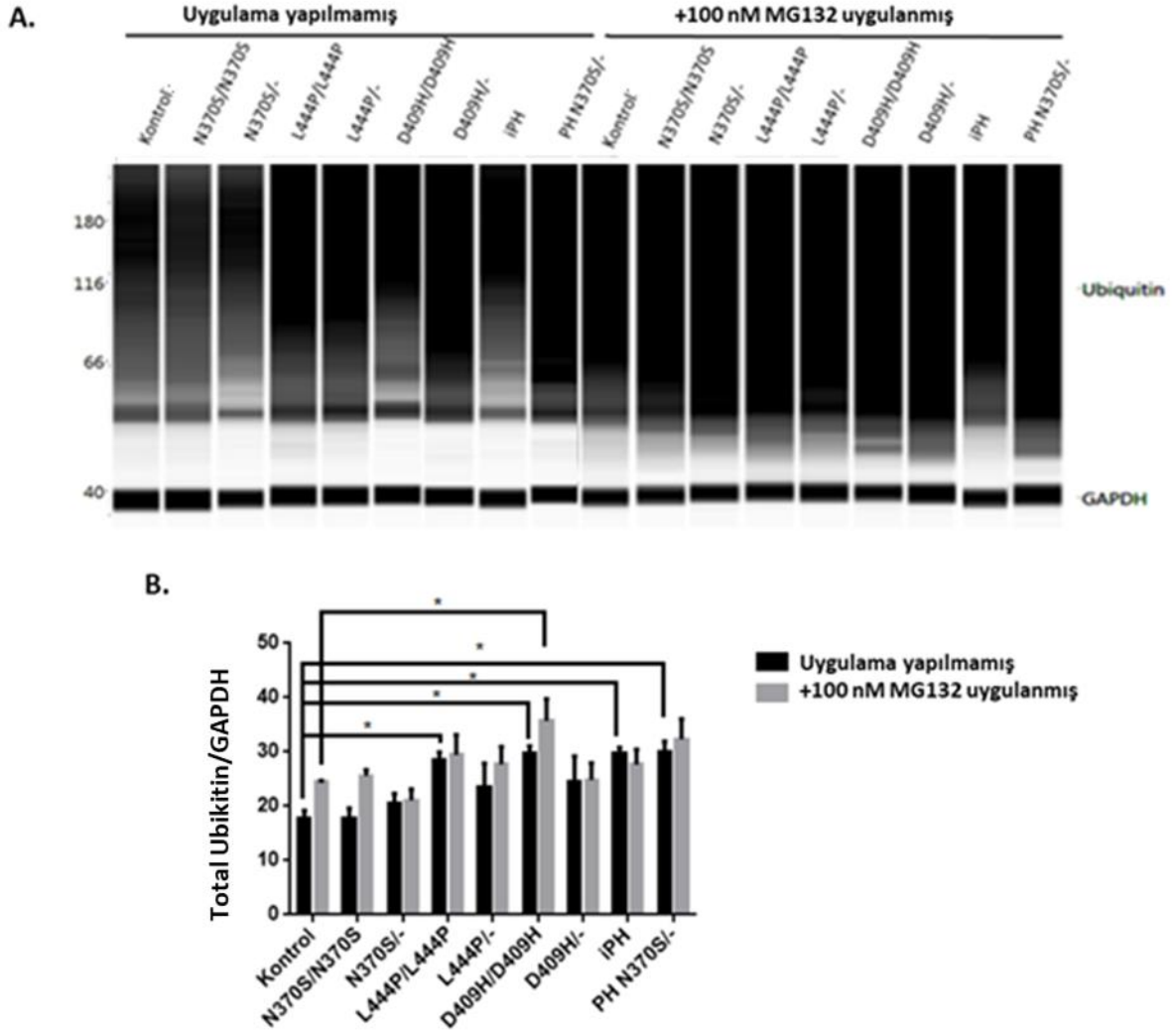


Şekil 4.15. 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde BiP ve PDI ER stresi belirteçlerinin immünblot görüntüsü (A) ve kantitasyon grafikleri (B ve C). İmmünblot bantlarının intensite değerleri β-Aktin bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *, ** ve **** ile gösterilmiştir (*: $p<0,05$ **: $p<0,001$; ****: $p<0,0001$).

Sonuç olarak, bazal koşullarda, D409H/D409H ve PH N370S/- hücrelerinde ER stresi olduğu görülmüştür. Hücrelere proteazom baskılaması stresi uygulandığında tüm GBA1 homozigot mutant hücrelerde (N370S/N370S, L444P/L444P ve D409H/D409H) ER stresi olduğu saptanmış ve bu artışın özellikle 'ağır' GBA1 gen mutasyonlarına (L444P/L444P ve D409H/D409H) sahip hücrelerde anlamlı şekilde daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Parkinson Hastalığı'nda görülen α -sinüklein birikimini patolojisinin Ubikuitin Proteazom Sisteminde (UPS) oluşan aksaklıklarla ilişkili olarak ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, PH ilişkili hücrelerde intranöronal proteinlerin ubikitinlenmesinin arttığı rapor edilmiştir (211). Çalışmamızda da, GBA1 gen mutasyonlarının iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde total ubikitinlenme seviyelerinde bir değişikliğe sebep olup olmayacağı immünblot yöntemi kullanılarak test edilmiştir (Şekil 4.16 (A)). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bazal koşullarda hücrelerdeki total ubikitinlenmiş protein miktarı 'ağır' GBA1 gen mutasyonlarına sahip homozigot hücrelerde (L444P/L444P ve D409H/D409H), idyopatik PH hücresinde ve GBA1 mutant PH hücresinde (PH N370S/-) anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0,05$). Hücreler proteazom inhibitörüne maruz bırakıldığında ise, sadece D409H/D409H genotipine sahip hücrede kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı şekilde total ubikitinlenmiş protein miktarı artışı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16 (B)).

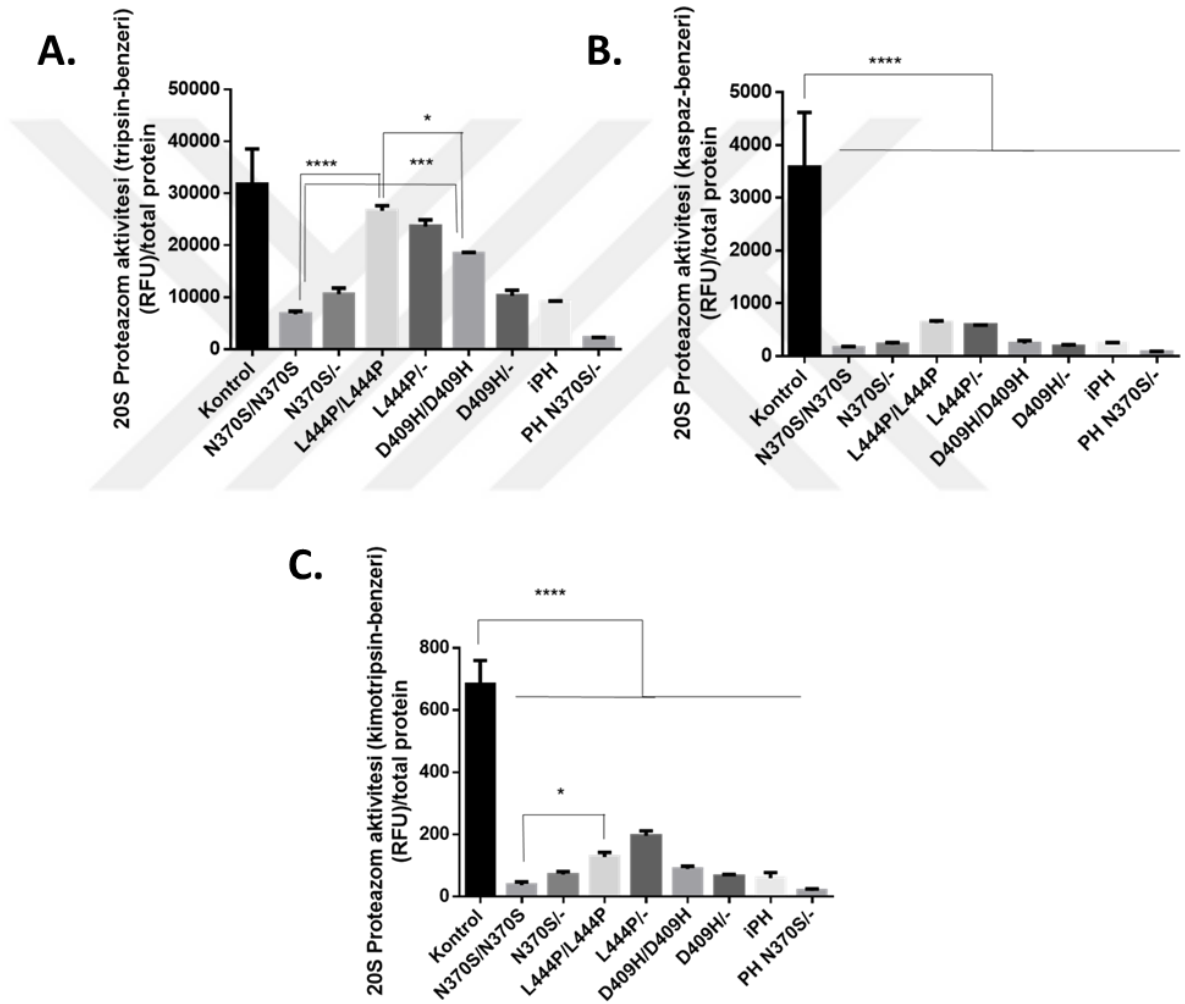
Sonuç olarak, bazal koşullar altında hücrelerdeki total ubikitinlenme oranı kontrol hücrelere kıyasla 'ağır' GBA1 gen mutasyonuna sahip homozigot hücrelerde ve PH hücrelerinde anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bununla birlikte, hücreler proteazom inhibitörü stresine maruz bırakıldıklarında yalnızca D409H/D409H homozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip hücrelerde total ubikitinlenme oranında anlamlı artış tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde total ubiquitinlenmiş proteinlerin immünblot görüntüsü (A) ve kantitasyon grafiği (B). İmmünblot bantlarının intensite değerleri GAPDH bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar * ile gösterilmiştir (*: p<0,05).

Ubikitinleme sonucunda proteinler yıkılmak üzere proteazomlara gönderilmektedir. Dolayısıyla, ER stresi ile ilişkili UPS yıkım yolağında hücrelerdeki proteazom aktivite kapasitesi de test edilmiştir. Hücrelerdeki tripsin benzeri, kaspaz benzeri ve kimotripsin benzeri proteazom aktivitesinin kontrol hücrelere kıyasla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Tripsin benzeri proteazom

aktivitesinin kontrol hücrelerine göre N370S ($p<0,0001$) ve D409H ($p<0,05$) GBA homozigot mutant hücrelerde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.17. (A)). L444P GBA1 gen mutasyonlarının tripsin benzeri proteazom aktivitesine bir etkisi görülmemiştir. Kaspaz benzeri (Şekil 4.17. (B)) ve kimotripsin benzeri (Şekil 4.17. (C)) proteazom aktivitesinin kontrol hücrelere kıyasla, Gaucher hastalarının, GBA1 gen mutasyonları taşıyıcılarının ve Parkinson hastalarının hücre modellerinde yaklaşık 10 kat ($p<0,0001$) azalmıştır.



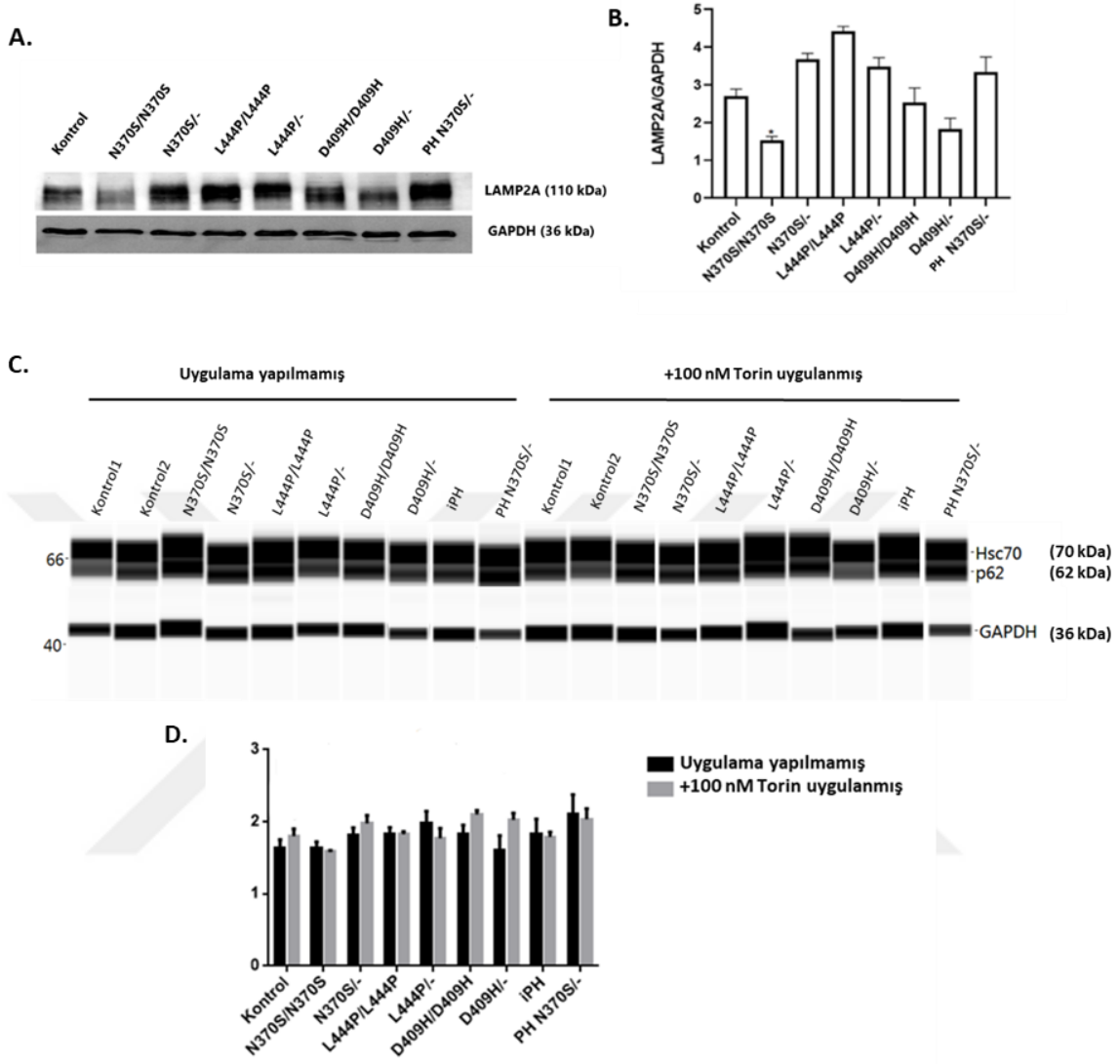
Şekil 4.17. GBA1 mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde (A) tripsin benzeri, (B) kaspaz benzeri ve (C) kimotripsin benzeri proteazom aktivitesi farklılaşmadan 40 gün sonra bazal koşullarda ölçülmüştür. RFU olarak ölçülen floresan ışıma değeri protein konsantrasyonlarına normalize edilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar *, *** ve **** ile gösterilmiştir (RFU: rölatif floresan ünite, n=3, *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$).

Sonuç olarak, GBA1 gen mutasyonlarının dozaj ve ciddiyetinden bağımsız bir şekilde tüm hücrelerde kontrole kıyasla anlamlı şekilde genel olarak proteazom aktivitelerinde azalma olduğu sonucu elde edilmiştir.

4.7. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda Şaperon Aracılı Otofaji ile protein yıkımı

a-sinüklein proteini, Şaperon-aracılı otofaji tanıma motifi (KFERQ benzeri motif) ile uyumlu bir pentapeptit dizisi (₉₅VKKDQ₉₉) içerdiğinden, HSC70 şaperon proteini tarafından tanınmakta ve ŞAO yoluyla yıkılmak üzere lizozomal membran proteini LAMP2A'ya bağlanarak lizozoma taşınmakta ve bu yolla lizozomlarda yıkılmaktadır (181).

GBA1 mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda ŞAO mekanizmasında rol oynayan belirteçler olan Hsc70 ve LAMP2A ifadeleri immünblot yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.18. (A ve C)). Analiz sonucunda ŞAO mekanizmasında görev alan LAMP2A lizozomal membran proteini ifadesine bakıldığında ise, N370S/N370S genotipine sahip iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda LAMP2A ifadesinin kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.18 (B)). Diğer hücrelerde kontrole göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Hsc70 proteininin ifadesinde ise Gaucher hastalarının, Gaucher hastalarının zorunlu taşıyıcı aile bireylerinin ve Parkinson hastalarının hücrelerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.18 (D)).

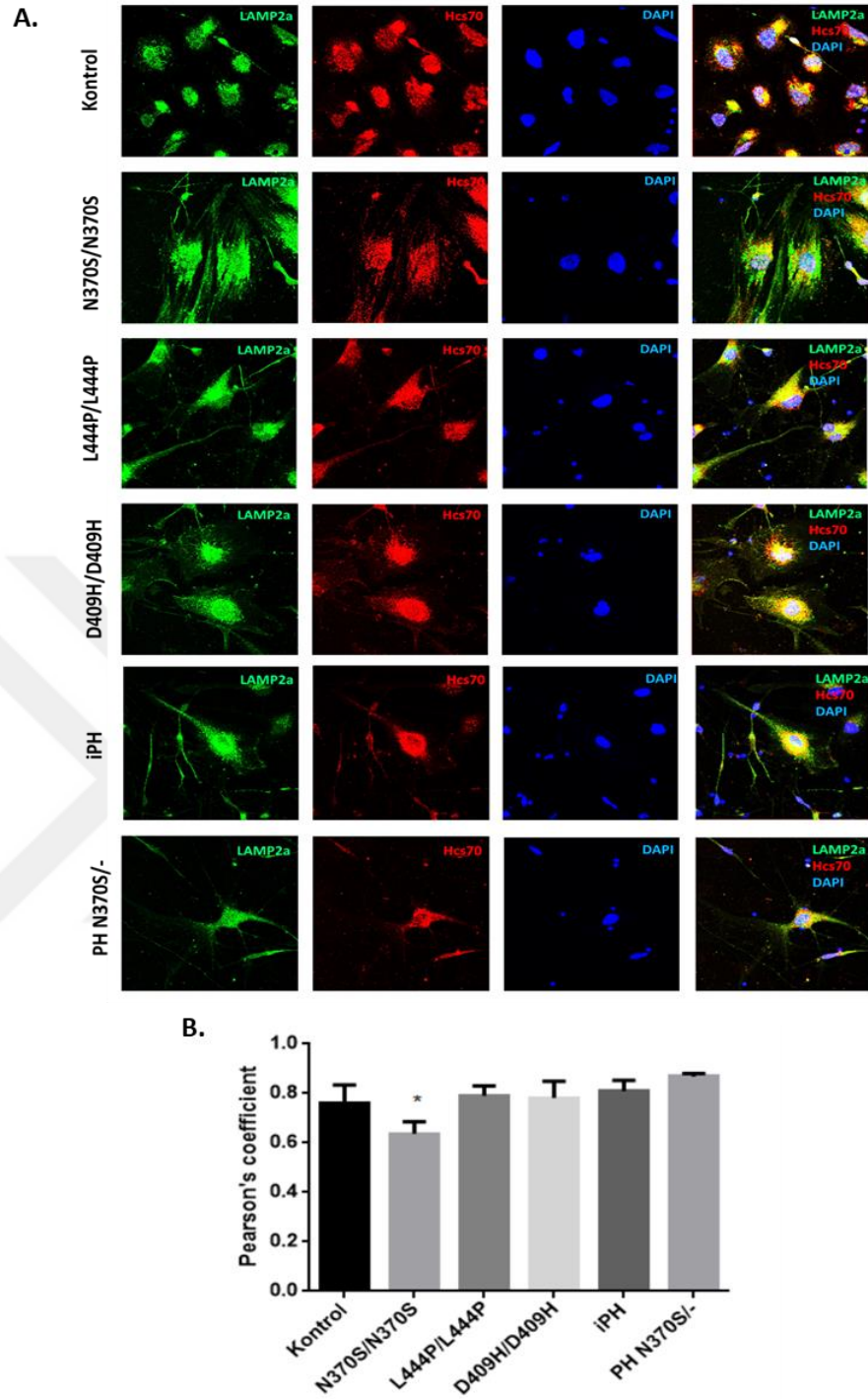


Şekil 4.18. 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde Şaperon aracılı otofaji belirteçleri LAMP2A (A ve B) ve Hsc70 (C ve D) proteinlerinin ifade analizlerinin immünblot görüntüleri. LAMP2A (B) ve Hsc70 (D) protein ifadelerinin kantitasyon grafikleri. İmmünblot bantlarının intensite değerleri GAPDH bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar * ve ** ile gösterilmiştir (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$).

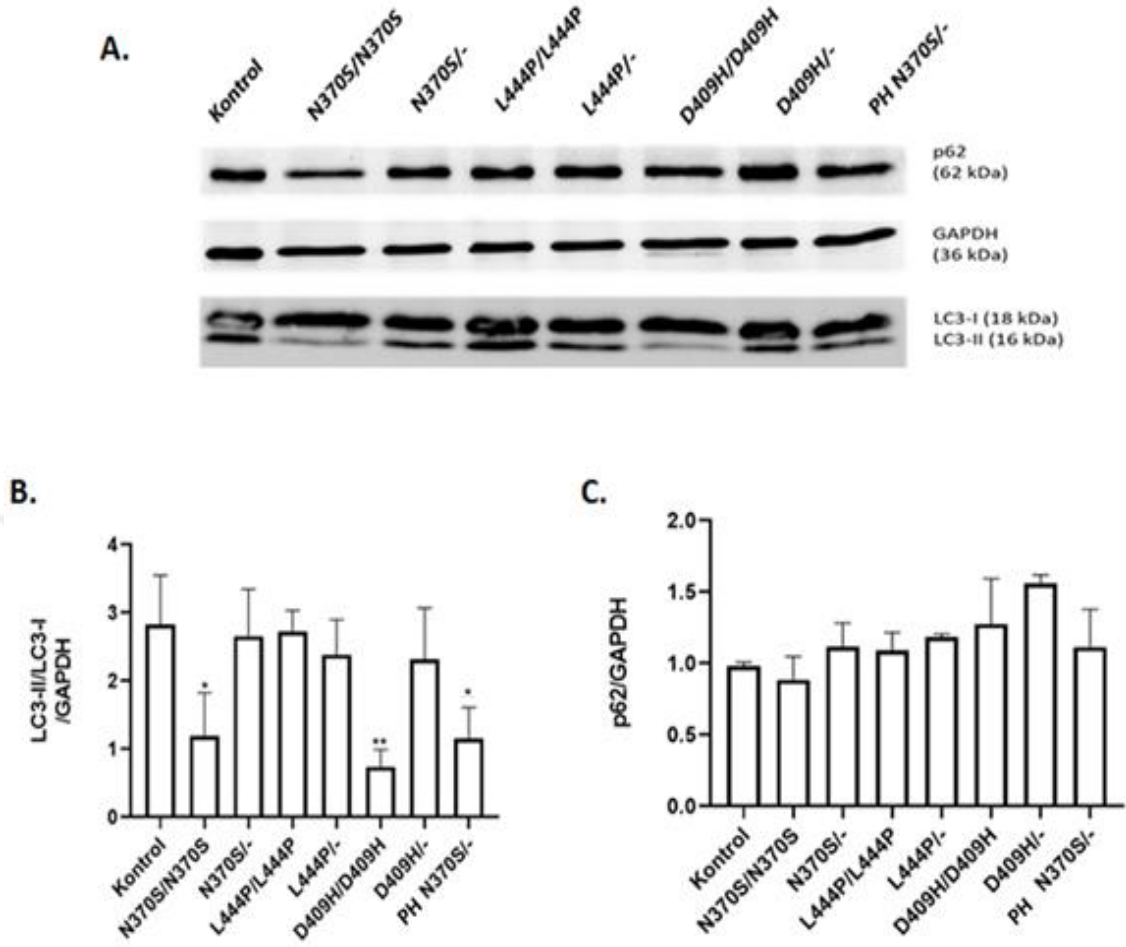
GBA1 mutasyonlarının hücrelerde, ŞAO mekanizmasında rol oynayan proteinlerin ifadelerinin yanı sıra, bu proteinlerin etkileşimlerini de etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda Hsc70 ve LAMP2A proteinlerinin eş yerleşim analizleri immünfloresan boyama yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmünfloresan boyama görüntüleri ve eş yerleşim analizi sonuçları Şekil 4.19 (A)'da gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, LAMP2A ifadesinde azalma tespit edilen N370S/N370S genotipine sahip hücrelerde Hsc70-LAMP2A eş yerleşiminin de kontrol ve diğer GBA1 mutant hücrelere kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.19 (B)). Sonuç olarak, LAMP2A ifadesinin ve Hsc70-LAMP2A eş yerleşiminin N370S/N370S genotipine sahip hücrelerde anlamlı şekilde azaldığı ve bu nedenle ŞAO mekanizmasında aksaklıklar olabileceği tespit edilmiştir.

4.8. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda makrotofaji ile protein yıkımı

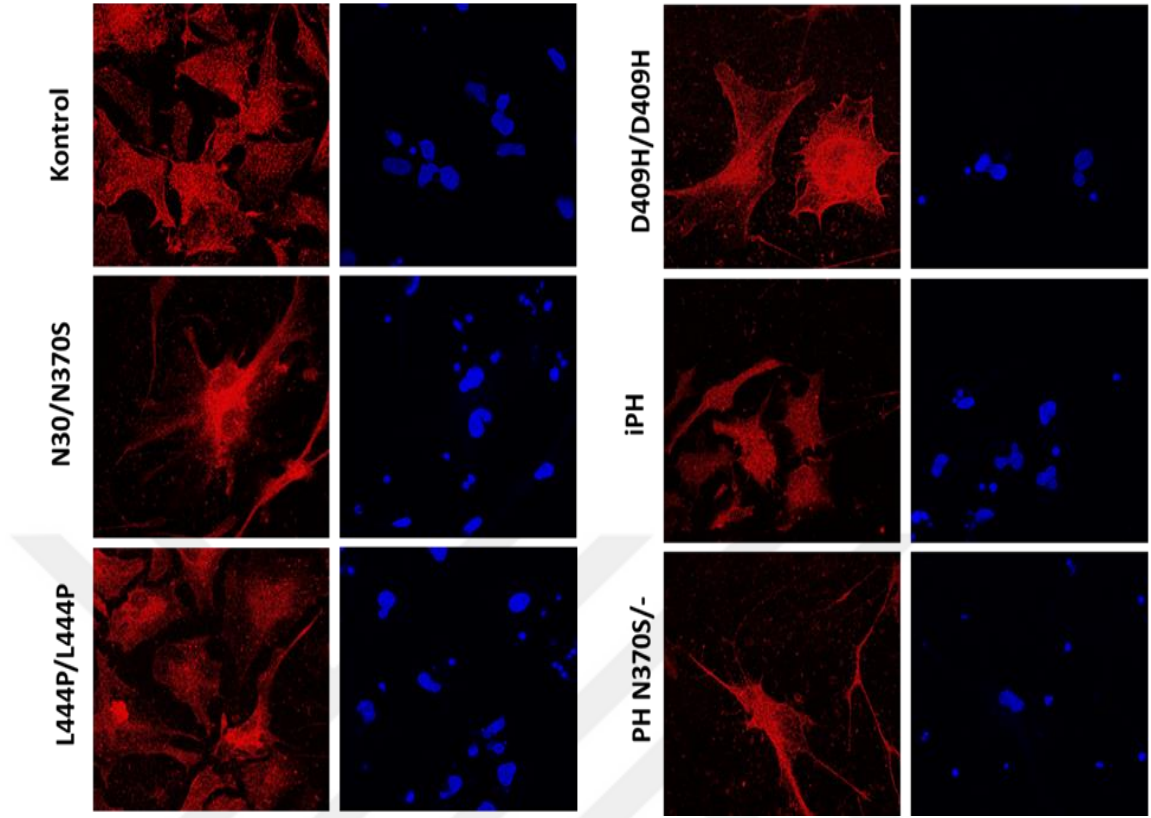
GBA1 gen mutasyonlarının makrotofajik süreç üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amacıyla otofajik aktivitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan (212) mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3A (MAP1LC3A veya LC3) ve p62 proteinlerinin ifadesi immünblot yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.20 (A)'da gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, otofagozom oluşum aktivasyon göstergelerinden biri olan LC3-II/LC3-I oranı dikkate alındığında, N370S/N370S, D409H/D409H ve PH N370S/- genotiplerine sahip bireylerde kontrol hücrelere kıyasla anlamlı şekilde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.20 (B)). Bu durumda bu hücrelerde otofagozom aktivasyonunu temsil eden LC3'e fosfatidiletanolamin eklenmesi aşamasında aksaklıklar olduğu söylenebilir. Gruplar arasında p62 ifadeleri karşılaştırıldığında ise anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir (Şekil 4.20 (C)). Ek olarak, p62 proteininin hücresel yerleşimi immünfloresan boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, GBA1 gen mutasyonları durumunda p62 proteininin hücresel yerleşiminde gruplar arasında bir farklılık olmadığı görülmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.19. (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde Şaperon aracılı otofaji belirteçleri Hsc70 (kırmızı) ve LAMP2a (yeşil) immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63X). (B) Hücrelerde Hsc70 ve LAMP2a'nın eş yerleşim kantitasyon sonuçları Pearson's coefficient kullanılarak hesaplanmıştır. (Veriler her bir hücre grubundan 20'şer hücre analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar * ile gösterilmiştir (*: $p < 0,05$).

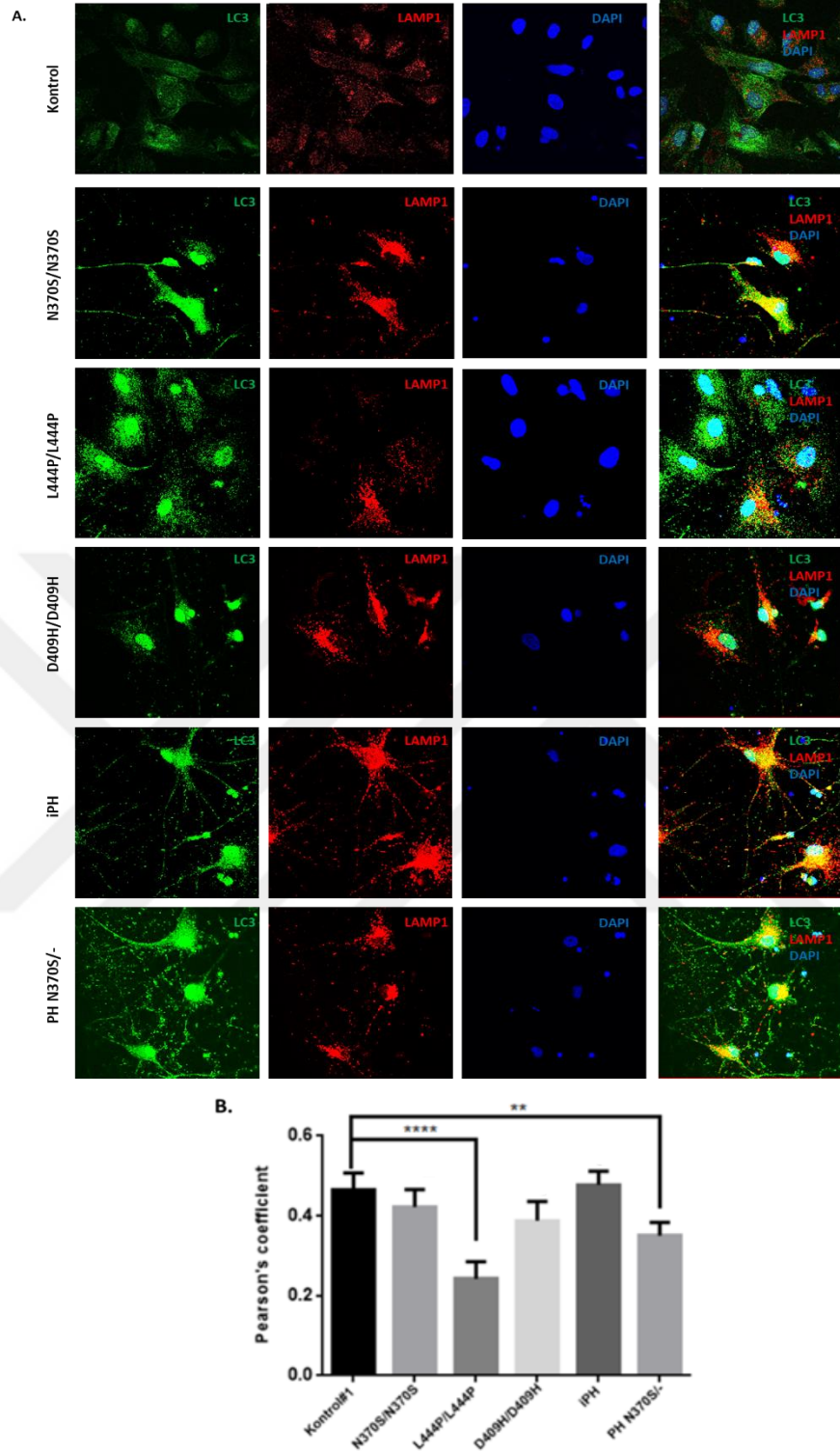


Şekil 4.20. (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde makrotofaji belirteçleri LC3 ve p62 proteinlerinin ifade analizlerinin immünblot görüntüsü. LC3 (B) ve p62 (C) protein ifadelerinin kantitasyon grafikleri. İmmünblot bantlarının intensite değerleri GAPDH bant intensite değerlerine normalize edilmiştir. (n=3, Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar * ve ** ile gösterilmiştir (*: p<0,05; **: p<0,01).



Şekil 4.21. 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde p62 (kırmızı) ve DAPI (mavi) immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63X).

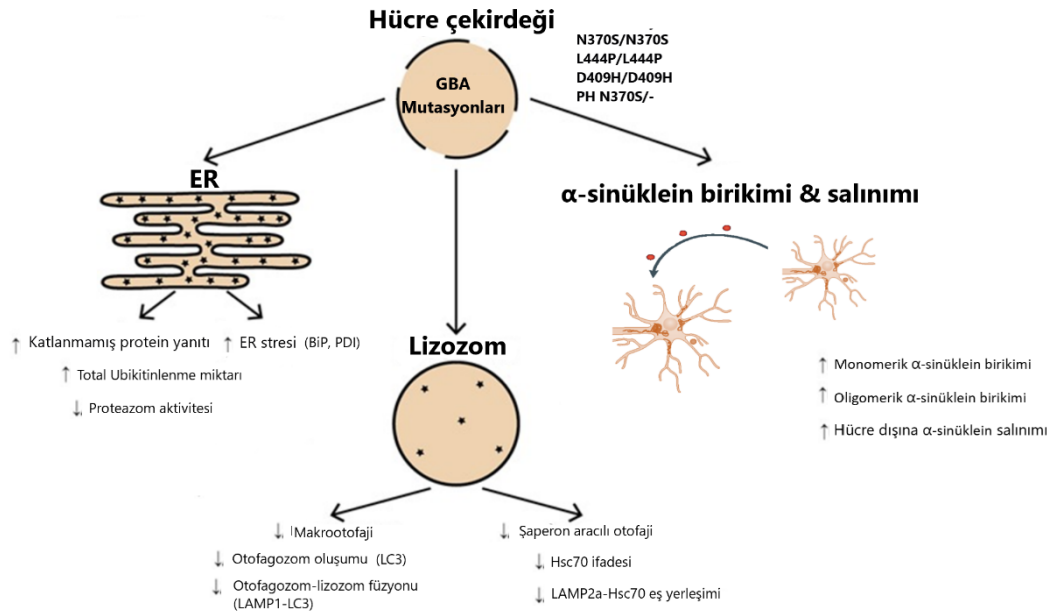
iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde otofagozom-lizozom füzyonunu incelemek için, LC3 ve LAMP1 makrotofaji belirteçlerinin immünfloresan boyama yöntemi kullanılarak hücrelerdeki eş yerleşimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ve eş yerleşim kantitasyon grafiği Şekil 4.22 (A)'da gösterilmiştir. L444P/L444P ve PH N370S/- hücrelerinde LC3 ve LAMP1 vakuelleri arasında anlamlı derecede azalmış bir eş yerleşim tespit edilmiştir (Şekil 4.22 (B)). Dolayısıyla, bu hücrelerde bozulmuş bir otofagozom-lizozom füzyonu olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.22. (A) 40 gün farklılaştırılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde Makrotofaji belirteçleri LAMP1 (kırmızı) ve LC3 (yeşil) immünfloresan boyama görüntüleri (Büyütme: 63X). (B) Hücrelerde LC3 ve LAMP1'in eş yerleşim kantitasyon sonuçları Pearson's coefficient kullanılarak hesaplanmıştır. (Veriler her bir hücre grubundan 20'şer hücre analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Veriler standart+ortalamanın standart hatası olarak gösterilmiştir. Anlamlı farklılık belirlenen gruplar ** ve **** ile gösterilmiştir (**: $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$).

Genel olarak, N370S/N370S ve D409H/D409H genotipine sahip hücrelerde LC3-II otofagozom oluşum aşamasında kontrol hücrelere kıyasla aksaklıklar olduğu tespit edilmiştir. L444P/L444P genotipine sahip hücrelerde ise, otofagozom oluşum aşamasında herhangi bir problem olmamasına rağmen, otofagozom-lizozom füzyonunda azalma saptanmıştır. N370S/- GBA1 gen mutasyonu taşıyan Parkinson hastasına ait hücrelerde ise hem otofagozom oluşumu hem de otofagozom-lizozom füzyonunda aksaklıklar tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, GBA1 mutasyonları durumunda, proteozomal/lizozomal yıkım bozukluklarının görülmesi sonucunda, iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde α -sinüklein birikimi ve salınımı ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. GBA1 mutasyonlarının ER ve lizozoma ilişkin yollardaki etkileri. GBA1 mutasyonları durumunda ER aracılı protein yıkımı ve otofaji-lizozom yolağı aracılı protein yıkımında saptanan aksaklıklar dolayısıyla iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda PH ile ilişkili α -sinüklein birikimi ve salınımı artmaktadır (Migdalska-Richards ve arkadaşlarının çalışmasından uyarlanmıştır) (207).

5. TARTIŞMA

GBA1 mutasyonları, Parkinson Hastalığı veya sinükleopatilerin meydana gelmesi için en güçlü risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, N370S/N370S, L444P/L444P ve D409H/D409H genotiplerine sahip Gaucher hastalarından, bu hastaların zorunlu heterozigot GBA1 gen mutasyonu taşıyıcı aile bireylerinden, GBA1 gen mutasyonuna (N370S/-) sahip Parkinson hastasından, idyopatik Parkinson hastasından ve kontrol bireylerden iPKH hücre hatları elde edilerek karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. GBA1 mutasyonlarıyla ilişkili PH patolojisini tanımlamak için elde edilen iPKH'ler dopaminerjik nöron kültürlerine farklılaştırılıp karakterize edilmiştir. Dolayısıyla, GBA1 mutasyonlarının α -sinüklein birikimi açısından etkilerini incelemek üzere fonksiyonel analizlerde kullanılmak için hasta kökenli in vitro hastalık modelleri elde edilmiştir.

iPKH kökenli dopaminerjik nöron modelleri, PH ile ilişkili nörodejenerasyon mekanizmasının çalışılması için gereken modellere ilişkin zorlukların ve eksikliklerin üstesinden gelebilmek için oldukça uygun modellerdir. iPKH teknolojisi öncesinde, PH patolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesi hususunda, temel fonksiyonel araştırmalarda kullanılmak üzere hastalıkta primer olarak etkilenen insan dopaminerjik (DA) nöronlarına erişimin olamaması, çalışmaların yapılabileceği postmortem beyin dokularının nadir olması, etik kısıtlamalar gibi nedenlerle çalışmalar kısıtlanmaktaydı. Fakat günümüzde, iPKH kökenli hücre kaynaklı PH modellerinin elde edilebilmesi daha önceden yeterli miktarda veya kalitede elde edilemeyen hastalık modellerine erişim sağlamak ve PH etiyolojisinin aydınlatılarak potansiyel terapötiklerin geliştirilmesi konusunda önemli olanaklar sunmaktadır. Özellikle hastaya özgül ve/veya genom düzenlemesine tabi tutulmuş iPKH kökenli nöronal PH modelleri hastalık patofizyolojisinin araştırılması ve tedaviye yönelik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır (213). Hastalardan elde edilen özgül iPKH kökenli nöronal PH modelleri, özellikle hücresel patolojik yolların tanısı ve ayrıca aday ilaç moleküllerinin keşfedilmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır (214). Bunun yanı sıra, iPKH kökenli nöronal modellerde genom düzenleme teknikleri

kullanılarak, bireyler arasındaki genetik arka plandaki varyasyonları ortadan kaldırılıp hastalığın patofizyolojik temelleri daha objektif şekilde değerlendirilebilmektedir (215, 216).

Yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar için risk faktörüdür ve hastalık patofizyolojisinin ortaya çıkmasında önemli bir etmendir. iPKH kökenli nöronal PH modellerinin kullanımındaki önemli bir dezavantaj, yeniden programlama sonucunda hücrelerin embriyonik evreye geri dönmesi ve telomer kısalması veya artan mitokondriyal hasar gibi yaşa bağlı özellikler sergilememesidir (217, 218). Bu aşamadaki hücrelerin, hastalardan biyopsi örneklerinin alındığı yaşından bağımsız olarak yeniden programlama sonucu embriyonik yaşa sıfırlandığı düşünülmektedir (219, 220). Bu durum, bu hücrelerde yaşlanma ile birlikte görülen nörodejenereasyon patolojisinin incelenmesi açısından bir sınırlama getirmektedir. Dolayısıyla, bu hücrelerde yaşa bağlı hücreSEL fenotiplerin indüklenmesi için iki temel yaşlandırma protokolü uygulanmaktadır: eksojen olarak yaşlanmanın indüklenmesi ve zamana bağlı hücreSEL yaşlandırma. Eksojen olarak yaşlanmanın indüklenmesi için literatürde erken yaşlanma ile ilişkisi olduğu bilinen progerinin hücrelerde aşırı ifade ettirilmesi yöntemi kullanılmaktadır (221). Yaşlanmaya bağlı PH patogenezi incelemek için kullanılabilecek bir diğer yaşlandırma yöntemi ise, zamana bağlı hücreSEL yaşlandırmadır. Nörodejenerasyon sürecinde, özellikle yaşlanmaya bağlı en önemli hücreSEL PH patolojisi olan α -sinüklein birikimini incelemek için, iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde hücreSEL yaşlandırma tekniği kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla, literatürde pek çok çalışma, GBA1 mutant iPKH'lerin dopaminerjik nöronal kültürlerle tek aşamalı direkt farklılaşmasını sağlayan farklılaşma protokolü uygulayarak, α -sinüklein birikiminin farklılaşmanın 65 ila 330 günler arasında tespit edilebildiğini göstermiştir (7, 149, 222). Tez çalışmamızda ise, Reinhardt ve grubunun oluşturduğu iki aşamalı bir farklılaşma protokolü uygulanmıştır (195). Çalışmamızda kullandığımız protokole göre iPKH'ler önce nöronal progenitor hücrelere farklılaştırılmış olup en az pasaj#20'ye kadar (yaklaşık 70 gün boyunca) kültüre edilmiştir. Sonrasında nöronal progenitor hücreler 40 ila 90

gün boyunca dopaminerjik nöronlara farklılaştırılmıştır. Dolayısıyla, çalışmamızda uygulanan hücresel yaşlandırma protokolüne göre iPKH'ler toplamda 110 ila 160 gün boyunca farklılaşmaya tabi tutulmuştur. Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde uyguladığımız farklılaştırma süreleri sonunda, iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda hem hücre içi monomerik ve oligomerik α -sinüklein birikimi hem de hücrelerden salınan α -sinüklein miktarları tespit edilmiştir (Şekil 4.11-4.14). Bunun yanı sıra, uygulanan farklılaştırma süresi, hücrelerde GBA1 gen mutasyonlarına bağlı olarak görülen yıkım mekanizmalarına ilişkin hücresel patolojinin tespit edilebilmesi için uygundur.

iPKH'lerin elde edilmesi için kullanılan yeniden programlama tekniği dolayısıyla hücrede yaşa bağlı hücresel özelliklerin görülmemesi durumu, bu çalışma için bir önemli avantaj olarak da kullanılmıştır. Çalışma grubuna dahil edilen bireylerin yaş aralıkları 10-49 arasında değişmektedir. Gaucher Hastaları çocukluk çağındaki hastalarından oluşmakta olup, özellikle GH2 ve GH3 kliniğine sahip hastaların erken yaşlarda kaybedilmesi ve erişkin yaşlara ulaşamamaları dolayısıyla bu hastalardan erken yaşlarda biyopsi örnekleri alınmıştır. Çalışma grubuna dahil edilen bireyler arasındaki yaş farkından dolayı hem hücrelerin yeniden programlama ve farklılaşma kapasitelerinde hem de yaşa bağlı hücresel fenotiplerinde değişikliklerin beklenmesi olasıdır. Fakat, bireylerden alınan biyopsi örneklerinden kurulan primer fibroblast hücrelerin Yamanaka faktörleri kullanılarak yeniden programlanması sonucunda hücrelerin embryonik yaşa geri döndüğü ve yaşlılıkla ilişkili fenotipleri sergilemediği öne sürülmektedir (223). Yapılan çalışmalarda, yaşlı ve genç bireylerden elde edilen primer fibroblast hücrelerinin iPKH'lere yeniden programlanma kapasitelerinin (224), elde edilen iPKH'lerin kök hücre özelliklerinin, diğer germ tabakalarına farklılaşma kapasitelerinin (224), hücresel yaşlanmaya ve apoptoza ilişkin belirteçlerin ifade seviyelerinin (225) anlamlı farklılık göstermediği ve donör yaşından bağımsız olarak elde edilen iPKH'lerde yaşlanmaya ilişkin faktörlerin embryonik duruma döndüğü (226) rapor edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, donörlerden biyopsi alınma yaşının tez çalışmasında kullanılan iPKH kökenli dopaminerjik nöron modellerinin

oluşturulması ve PH patolojisine ilişkin fonksiyonel çalışmalarda anlamlı bir etkisinin olması beklenmemektedir.

GBA1 mutasyonlarının PH ve diğer sinükleopatiler için en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir. Veriler GBA1 mutasyonlarının PH geliştirme açısından önemli bir faktör olduğunu gösterse de, çoğu GBA1 gen mutasyonu taşıyıcılarının yaşamları boyunca Parkinson Hastalığı fenotipi göstermediği bilinmektedir. Bu durum, GBA1 varyantlarının eksik penetransı ile açıklanmaktadır ve dolayısıyla GBA1 mutasyonları ile PH patogenezi arasındaki ilişkiyi tam olarak aydınlatamamaktadır (227). Tez çalışmasında, çalışma grubuna homozigot GBA1 mutasyonuna sahip Gaucher hasta bireylerin yanı sıra, bu hastaların zorunlu GBA1 gen mutasyonu taşıyıcı aile bireyleri dahil edilerek, iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde α -sinüklein birikimini açıklamaya yönelik patolojik yolların araştırılması bu bireylerin ilerde hastalık geliştirme riskleri açısından önemli bilgiler sağlamaktadır.

GBA1 gen mutasyonlarının PH için en önemli risk faktörü olmasının yanı sıra, 'ağır' (L444P ve D409) ve 'hafif' (N370S) GBA1 gen mutasyonlarının PH hastalığı oluşturma riski, hastalık başlangıç yaşı ve hastalık fenotipi üzerinde anlamlı farklılıklara neden olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda, klinik olarak saptanan bu GBA1 mutasyon 'şiddetine' bağlı farklılıkların moleküler temellerini araştırmak üzere çalışma grubumuza farklı GBA1 gen mutasyonlarına ('hafif' veya 'ağır') sahip Gaucher hastası bireyler dahil edilmiştir. Ek olarak, idyopatik Parkinson hastası ve GBA1 geninde N370S/- mutasyonu taşıyan Parkinson hastası da, GBA1 mutasyonlarının PH'nin moleküler patolojisi üzerine arttırıcı etkisini inceleyebilmek için dahil edilmiştir. Çalışma grubuna dahil edilen bireylere ait hücrelerin dopaminerjik nöronlara farklılaştırılması, GBA1'in PH patolojisine olan genetik katkısını araştırmak üzere hasta kökenli bir hastalık modelinde araştırılmasına imkan sağlamıştır.

Çalışmamızda, GBA1 gen mutasyonları ile α -sinüklein patolojisi arasındaki moleküler ilişkiyi açıklayabilmek adına öne sürülen mekanizmalarının anlaşılabilmesi

için, iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda **GBA1 mutasyonlarının GCaz aktivitesi, ifadesi ve lizozoma taşınması üzerindeki etkileri** araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, hem ‘hafif’ (N370S) hem de ‘ağır’ (L444P ve D409H) **homozigot hücrelerde** kontrole kıyasla **GCaz aktivitesinin anlamlı şekilde azaldığı** tespit edilmiştir (Şekil 4.9). GBA1 mutasyonlarının GCaz enziminin substrata bağlanması, ko-aktivatörü Saposin C ile etkileşimi ve katlanmasını etkileyerek aktivite azalışına neden olduğu düşünülmektedir (30). Çalışmamızda, farklı GBA1 mutasyonları varlığında hücrelerde GCaz enzim aktivitesinin aynı anlamlılık seviyesinde azalmış olması, GBA1 mutasyonlarının ‘ağır veya hafif olması durumunun’ GCaz enzim aktivitesi üzerinde farklı bir etkisi olmadığını göstermektedir. Enzim aktivitesine ek olarak, **homozigot GBA1 mutant hücrelerde, GCaz enzim ifadeleri** analiz edildiğinde ise, özellikle ‘ağır’ (L444P ve D409H) mutasyonlarda ‘hafif’ (N370S) mutasyonlara göre daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun, ‘ağır’ GBA1 mutasyonların enzimin yapısal stabilitesini bozarak ER’de yanlış katlanması sonucunda ER aracılı yıkım mekanizmaları (ERAD) ile yıkılması sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir.

Heterozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip taşıyıcı bireylerin hücrelerinde **GCaz aktivitesi** analiz edildiğinde ise, N370S/- ve L444P/- genotipine sahip hücrelerde kontrol hücrelere göre anlamlı şekilde aktivite azalışı tespit edilmiştir. D409H/- genotipine sahip taşıyıcı bireyin hücrelerinde GCaz enzim aktivitesi açısından bir değişiklik görülmemekle birlikte, **enzim ifadesinde** anlamlı azalma tespit edilmiştir. GBA1 mutasyonlarının GCaz enziminin yapısı üzerindeki etkileri düşünüldüğünde, N370S ve L444P mutasyonlarının enzimin substrat ve ko-aktivatör bağlanma bölgelerini etkilerken, D409H mutasyonunun ise enzimin katlanmasını etkileyerek yanlış katlanmış enzimin ER’de tutulumunun arttığı ve mutasyonun enzimin yıkımı ile sonuçlanması durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir (30).

Çalışmamızda, **idyopatik PH ve N370S/- GBA1 genotipine sahip PH** hastalarının hücreleri **GCaz aktivitesi** açısından değerlendirildiğinde, GBA1 heterozigot mutasyon varlığının GCaz enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu görülürken, **enzim**

ifadesini etkilemediği tespit edilmiştir. Bu veriler, N370S/- genotipine sahip taşıyıcı bireyin hücrelerinden elde edilen verileri desteklemektedir. PH hasta hücrelerinde N370S mutasyonunun varlığının GCaz enzim aktivitesini etkileyerek PH patolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. GCaz enzim aktivitesindeki azalma sebebiyle, N370S/- heterozigot taşıyıcı bireylerin ilerde PH geliştirme riskinin arttığı düşünülebilir. Literatürde yapılan yüksek ölçekli kohort çalışmalarında, GBA1 gen mutasyonuna sahip PH hastalarının GBA1 gen mutasyonu taşımayan PH hastalarına göre daha düşük GCaz enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiş olması (226) elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

iPKH kökenli dopaminerjik nöron modellerinde, GBA1 gen mutasyonlarının GCaz enziminin lizozoma taşınımı üzerindeki etkisi araştırıldığında, GCaz enziminin lizozoma taşınımından sorumlu olan LIMP2 protein ifadesinin çalışma grubuna dahil edilen tüm hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla herhangi bir anlamlı değişiklik göstermediği saptanmıştır. Bu durumda, GCaz enziminin lizozoma taşınımında herhangi bir aksaklık olmadığı, GBA1 mutasyonlarının etkisini GCaz aktivitesi ve ifadesini etkileyerek ortaya koyduğu anlaşılmaktadır. Grubumuzun Gaucher hastalarının fibroblast hücrelerinde yaptığı bir çalışmada da, GCaz enziminin lizozoma taşınmasında sorun olmadığı fakat, lizozoma taşınan mutant GCaz enziminin lizozomal pH değerini anlamlı şekilde arttırarak lizozomal enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur (yayınlanmamış veri). Verilerimize ek olarak, literatürde PH ilişkili patolojide LIMP2 ifadesine yönelik farklı veriler mevcuttur. Thomas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, idiyopatik PH hastalarının fibroblast hücrelerinde LIMP2 protein ifadesinin kontrol fibroblast hücrelerine göre anlamlı şekilde azaldığı fakat GBA1 mutasyonu taşıyan PH hastalarının fibroblastlarında LIMP2 ifadesinin değişmediği gösterilmiştir (228). Bu bağlamda, LIMP2 ifade değişikliğinin GBA1 mutasyonlarından bağımsız olarak PH patolojisi ile ilişkili veziküler taşınım gibi mekanizmalara bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Rothaug ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, PH postmortem beyin dokularında LIMP2 protein ifadesi incelendiğinde, kontrol beyin dokularına kıyasla PH hastalarının beyin

dokularında LIMP2 ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir (229). PH'de LIMP2 seviyelerinin değişiminde saptanan bu farklı veriler GBA1 mutasyonlarının etkilerinden daha çok, hem hastalık modeli olarak farklı örneklerin kullanılmasından (fibroblast ve beyin dokusu) hem de PH patolojisindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bu durumda, özellikle hastalardan elde edilen iPKH kökenli dopaminerjik nöronların kullanılarak PH ilişkili yolların incelenmesi hastalık patolojisinin anlaşılması açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamızın hipotezinde belirtildiği üzere, hücresel yıkım mekanizmaları olan Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS), Şaperon Aracılı Otofaji (ŞAO) ve makrotofaji mekanizmalarındaki bozuklukların iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda α -sinüklein birikimini arttırabileceği düşünülmüştür. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda monomerik α -sinüklein seviyeleri araştırıldığında, N370S/- genotipine sahip Parkinson hastasının hücrelerinde kontrol hücrelere göre artmış monomerik α -sinüklein seviyeleri, PH fenotipi özelinde GBA1 mutasyonlarının bu birikime katkı sağladığını düşündürmektedir. Çalışma grubundaki Parkinson hastaları karşılaştırıldığında, monomerik α -sinüklein birikiminin idyopatik Parkinson hastasının hücrelerinde görülmeyip, N370S/- genotipine sahip Parkinson hastasının hücrelerinde görülmesi GBA1 mutasyonunun α -sinüklein birikimine olan katkısı ile açıklanabilir. Bazal koşullarda ayrıca, D409H/- GBA1 genotipine sahip taşıyıcı bireyin hücrelerinde de monomerik α -sinüklein seviyesinde artış tespit edilmiştir. GBA1 gen mutasyonu taşıyıcılarının PH geliştirme prevalansının yaklaşık %30 olduğu düşünüldüğünde (108), D409H/- genotipinde monomerik α -sinüklein birikiminin görülmesi, bu taşıyıcıların PH geliştirme riskinin yüksek olması ile ilişkili olabilir. Söz konusu mutasyonun heterozigot durumda monomerik α -sinüklein artışına sebep olurken, homozigot durumda artışa sebep olmaması, homozigot GBA1 mutasyonları durumunda hem biriken oligomerik α -sinükleinin artışı ile hem de hücre dışına α -sinüklein salınımının artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.12 ve 4.14).

Hücrelerde, monomerik α -sinükleinin yıkımından sorumlu temel mekanizmalardan biri olan UPS baskılanarak, monomerik α -sinükleinin birikimi tekrar analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, proteozom sistemi inhibe edildiğinde de, bazal koşullarda olduğu gibi N370S/- GBA1 mutasyonuna sahip PH hastasının hücrelerinde monomerik α -sinüklein birikimi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 'ağır' GBA1 mutasyonlarından D409H/D409H genotipinin hücrelerde monomerik α -sinüklein birikimini tetiklediği gösterilmiştir. Bu artışın, D409H mutasyonunun enzimin katlanmasını etkileyerek yanlış katlanmış enzimin ER'de tutulumunun arttığı ve mutasyonun enzimin ER stresi aracılı proteozomal yıkımı ile sonuçlanması durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla ilişkili olarak çalışmamızda, GCaz enzim ifade oranları değerlendirildiğinde, hem D409H/D409H hem de D409H/- genotipine sahip hücrelerde enzim ifadesinin diğer gruplara kıyasla daha fazla azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak, proteozom sistemi baskılandığında, D409H mutasyonları sonucu ER'de tutulan mutant GCaz enziminin yıkılamaması sonucunda hücresel ER stresinin daha fazla artmış olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerde D409H mutasyonundan kaynaklı ER stresine ek olarak proteozom sisteminin de baskılanması sonucu, monomerik α -sinüklein birikimi tetiklenmiş olabilir. Parkinson hastalarının hücreleri kıyaslandığında ise, N370S/- GBA1 mutasyonuna sahip PH hastasının hücrelerinde iPH hücrelerine kıyasla bazal koşullarda olduğu gibi monomerik α -sinüklein birikimi olması, UPS baskılanması gibi bir stres durumunda da, GBA1 mutasyonlarının hücrede α -sinüklein birikimini tetikleyecek bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.

iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda, yüksek moleküler ağırlıklı oligomerik α -sinüklein formlarının birikimi de analiz edilmiştir. Tüm homozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip hastaların (N370S/ N370S, L444P/ L444P ve D409H/ D409H) ve Parkinson hastalarının (iPH ve PH N370S/-) iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla anlamlı şekilde oligomerik α -sinüklein birikimi olduğu tespit edilmiştir. Bu birikimin, 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 homozigot gen mutasyonlarının olduğu hücrelerde, 'hafif' (N370S) GBA1 homozigot gen mutasyonu

olan hücrelere göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla, 'ağır' GBA1 mutasyonlarının, 'hafif' GBA1 mutasyonlarına göre oligomer yapıdaki α -sinüklein birikimi üzerinde daha belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Horowitz ve grubunun yaptığı bir çalışmada da, nöronal hücre hatlarında (N370S ve L444P) GBA1 mutantlarının aşırı ifade edilmesi durumunda da, 'ağır' L444P GBA1 mutasyonunun 'hafif' N370S mutasyonuna kıyasla daha fazla monomerik ve oligomerik α -sinüklein birikimine neden olduğu gösterilmiş olması (205) tez çalışmamızda elde edilen verileri desteklemektedir. Tüm bu veriler, Gan-Or ve arkadaşlarının ortaya koymuş olduğu 'ağır' GBA1 mutasyonu taşıyan PH hastalarının, daha erken PH başlangıç yaşı, daha ağır motor, psikiyatrik, bilişsel ve koku semptomları eşliğinde daha şiddetli bir PH fenotipi geliştirdiğini gösteren özgül linik verilerle oldukça uyumludur (5, 6, 230). Ek olarak, Parkinson hastalarının hücreleri karşılaştırıldığında, N370S/- GBA1 mutasyonu taşıyan PH hastasının hücrelerinde, iPH hücrelerine kıyasla, GBA1 mutasyonlarının hücrelerde birikime yatkın ve hastalık patolojisinden sorumlu yüksek moleküler ağırlıklı oligomerik α -sinüklein birikimine katkı yaptığı görülmüştür. Dolayısıyla, klinik olarak kanıtlanmış olan GBA1 mutasyonları ile ilişkili daha ağır PH semptomları, moleküler olarak GBA1 mutasyonlarının arttırıcı etkisiyle oluşan oligomerik α -sinüklein birikiminden kaynaklanıyor olması çok olasıdır.

PH patolojisinde, otofaji-lizozom yolağı gibi hücresel yıkım mekanizmalarındaki bozuklukların hücrelerde oluşturduğu stres durumunda, α -sinükleinin hücre dışına salınımının etkilenebileceği bilinmektedir. Bu doğrultuda tez çalışmamızda, GBA1 mutant iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde α -sinüklein salınımını analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol hücrelere kıyasla, tüm homozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip hastaların (N370S/ N370S, L444P/ L444P ve D409H/ D409H) ve Parkinson hastalarının (iPH ve PH N370S/-) iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde anlamlı şekilde α -sinüklein salınımı olduğu tespit edilmiştir. Özellikle homozigot GBA1 mutant hücreler kıyaslandığında, oligomerik α -sinüklein birikimi sonuçlarında olduğu gibi, α -sinüklein salınımının da 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 gen mutasyonlarının olduğu hücrelerde, 'hafif' (N370S) GBA1 gen mutasyonu olan

hücrelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler, 'ağır' GBA1 mutasyonları nedeniyle biriken oligomerik α -sinükleinin hücre dışına salınımının da arttığını göstermiştir. Bu durum, GBA1 mutasyonları durumunda α -sinükleinin Prion-benzeri şekilde nöronlar arasında transfer edilebileceğini göstermektedir. Kara ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, α -sinükleinin hücre dışına salınımında rol oynayan 38 gen tanımlanmıştır (231). Bu genlerin hücre-hücre sinyal iletimi, veziküler trafik ve yıkım mekanizmaları ile ilişkili yollarda görev aldığı rapor edilmiştir (231). GBA1 mutasyonları sonucunda hücresel veziküler trafik ve protein yıkım mekanizmalarının bozulduğu düşünüldüğünde GBA1 mutasyonlarının da α -sinükleinin hücre dışına salınımında önemli rol oynayabileceği öngörülmektedir. Verilerimiz ayrıca, klinik olarak 'ağır' GBA1 mutasyonuna sahip PH hastalarında görülen daha ağır ve daha hızlı ilerleme görülen motor, psikiyatrik, bilişsel kayıp ve koku semptomları ile örtüşmektedir (5, 232).

GBA1 mutasyonları nedeniyle ER'deki yanlış katlanmış GCaz enziminin, ER stresine yol açarak katlanmamış protein yanıtını ve proteozomal yıkımı indüklediği bilinmektedir. Bu doğrultuda, iPKH kökenli dopaminerjik nöron modellerinde bazal koşullarda ER stres belirteçleri (BiP, PDI) incelendiğinde D409H/D409H genotipine sahip hücrelerde kontrol hücrelere göre anlamlı artış tespit edilmiştir. ER ilişkili protein yıkım (ERAD) mekanizmasına ilişkin olarak total ubikitinlenme oranları incelendiğinde ise, 'ağır' (D409H) GBA1 homozigot mutant hücrelerde bazal koşullarda ubikitinlenmenin anlamlı şekilde arttığı ve hücrelerde ER strese karşı artan bir hassasiyet olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler, D409H mutasyonu durumunda GCaz enziminin yanlış katlanmasındaki artış sonucu tespit edilen enzim ifade oranındaki azalma ile oldukça uyumludur. Ayrıca elde edilen veriler, postmortem PH beyin dokularında daha önce rapor edilen, GBA1 mutasyonları durumunda yanlış katlanmış GCaz enziminin ER'de tutulması ile indüklenen ER'deki homeostatik ortamının bozulması, buna eşlik eden ER stres belirteçlerinin artışı ve UPR aktivasyonunu gösteren verilerle oldukça uyumludur (111). Dolayısıyla elde edilen veriler, özellikle 'ağır' GBA1 mutant hücrelerde oligomerik α -sinüklein birikimi ve hücreden

salınımında artış olduğu göz önüne alınırsa bu durumun, ER stres artışı ve proteozomal yıkıma ilişkin aksaklıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bazal koşullarda Parkinson hastalarının hücreleri karşılaştırıldığında ise, iPH hücrelerinde ER stres belirteçlerinde artış saptanmazken, N370S/- genotipine sahip PH hastasının hücrelerinde anlamlı artış saptanmıştır. Bununla birlikte, her iki PH hastasının hücrelerinde de total ubikitinlenme miktarları artmıştır.

Hücrelere proteozom inhibitörü uygulanıp ER stres belirteçleri ve total ubikitinlenme incelendiğinde ise, ER stres belirteçlerinin tüm homozigot GBA1 mutant hücrelerde arttığı fakat bu artışın, özellikle 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 mutasyonları durumunda daha fazla olduğu saptanmıştır. Hücresel total ubikitinlenme miktarlarının ise yalnızca 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 homozigot mutasyonları durumunda kontrol hücrelere göre anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu veriler, 'ağır' mutasyonların varlığında GCaz enzim aktivitesi ve ifadesindeki azalma ile α -sinüklein birikim ve salınımının daha fazla olduğunu gösteren verilerimizle oldukça uyumludur. Parkinson hastalarının hücreleri kıyaslandığında ise, proteozom inhibitörü verildiği koşullarda hücrelerde ER stres belirteçleri yalnızca N370S/- GBA1 mutant PH hücresinde anlamlı şekilde artarken, total ubikitinlenme oranı hem iPH hem de GBA1 mutant PH hücrelerinde anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu veriler de bazal koşullarda elde edilen verilerle tutarlı olup PH patolojisinin her iki hücrede de total ubikitinlenmeyi arttırırken, GBA1 mutasyonları varlığı durumunda yanlış katlanmış GCaz enziminden dolayı N370S/- GBA1 mutant PH hücrelerinde ER stres artışı görülmüş olabilir. Bu durum, PH ile ilişkili olarak hücrelerde biriken α -sinükleinin hücrede total ubikitinlenmeyi tetikleyebileceğini göstermektedir. ER stres artışının ise, α -sinüklein birikimi patolojisinden daha çok GBA1 mutasyonları varlığı durumunda yanlış katlanmış GCaz enziminden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Dopaminerjik nöronların, katlanmamış, yanlış katlanmış ve aşırı birikime yatkın proteinlere özellikle duyarlı olduğu bilimektedir. PH patolojisinde, ER stresi ve otofajik yıkım yollarındaki aksaklıkların, dopaminerjik nöron kaybına katkıda bulunan ve hücrel proteostaz dengesizliğine yol açan iki temel mekanizma (şaperon aracılı otofaji ve makrotofaji) olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, şaperon aracılı otofaji mekanizmasına ilişkin elde edilen verilerde, ŞAO belirteci olan LAMP2A lizozomal membran proteininin N370S/N370S genotipine sahip Gaucher hastasının hücrelerinde anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, aynı hücrede ŞAO aracılı yıkımda rol oynayan Hsc70 ve LAMP2A proteinlerinin eş yerleşimlerinin de anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Diğer GBA1 mutasyonuna sahip hastaların veya Parkinson hastalarının hücrelerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bu durumda, ŞAO aracılı yıkım mekanizmasında yalnızca N370S 'hafif' GBA1 mutasyonunun olduğu durumda bozukluk görüldüğü anlaşılmaktadır. Elde ettiğimiz monomerik α -sinüklein birikimi analizi sonuçlarına göre, hücrelere proteozom inhibitörü uygulandığında N370S/- genotipine sahip taşıyıcı bireylerin hücrelerinde anlamlı şekilde monomerik α -sinüklein birikimi artışı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, özellikle α -sinükleinin monomerik formunun yıkımından sorumlu olan ŞAO mekanizmasında N370S GBA1 mutasyonu durumunda aksaklıklar olması, bu mutasyonun varlığında monomerik α -sinükleinin ŞAO mekanizması ile yıkılamadığından hücrelerde birikebileceğini göstermektedir. Parkinson hastalarından elde edilen iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde ŞAO belirteçleri açısından herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Literatürde, PH hastalarının postmortem beyin dokularında, Hsc70 ve LAMP2A seviyelerinde önemli ölçüde azalma olduğu ve bu nedenle ŞAO aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (183, 184). Bu çalışmada PH hastalarının iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarında ŞAO mekanizmalarında değişiklik saptanmaması, N370S/- genotipine sahip PH hücrelerinde oligomerik α -sinüklein birikiminin daha fazla olduğu düşünüldüğünde, bu hücrelerde α -sinüklein yıkımı için makrotofaji mekanizmasının daha çok tercih edilebileceği hipoteziyle açıklanabilir.

Çalışmamızda, iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda genel olarak çözünebilir olmayan fibriller α -sinüklein formunun yıkımından sorumlu olan makrotofaji mekanizmasında, otofagozom oluşumunda görev alan LC3 proteini analiz edildiğinde, N370S/N370S ve D409H/D409H genotipine sahip Gaucher hastalarında LC3-II/LC3-I oranının kontrol hücrelere göre anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu hücrelerde, otofagozom oluşurken fosfatidietanolamine bağlanan LC3 formunun (LC3-II) azalması sebebiyle otofagozom oluşum sürecinde aksaklıklar olduğu düşünülebilir. Ayrıca, N370S/- genotipine sahip PH hastasının hücrelerinde de otofagozom oluşum aşamasında aksaklıklar tespit edilmiştir. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda ayrıca, otofagozom lizozom füzyonunun anlaşılabilmesi için otofagozom belirteci olan LC3 proteini ile lizozomal belirteç olan LAMP1 proteininin eş yerleşimi analizi sonucunda, L444P/L444P genotipine sahip Gaucher hastasının hücrelerinde eşyerleşimin kontrol hücrelere göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Ek olarak, iPH hücrelerine kıyasla, N370S/- genotipine sahip PH hücrelerinde de LC3-LAMP1 eş yerleşiminin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu hücrelerde LC3-LAMP1 eş yerleşiminin azalması, otofagozom-lizozom füzyonunda aksaklıkların olabileceğini düşündürmektedir. iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda ayrıca, otofagozom oluşumu esnasında yıkılacak olan substratların otofagozom içerisine alınmasını sağlayan p62 reseptörünün ifadesi ve hücredeki yerleşimi analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, p62 proteininin ifade ve yerleşiminde bir farklılık olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, otofajik akış sürecinde GBA1 gen mutasyonlarının lizozomal yıkımda herhangi bir aksaklığa sebep olmadığını göstermektedir. Makrotofaji mekanizması ile hücrelerde daha çoğunlukla oligomerik ve/veya agregat yapıdaki α -sinükleinin yıkıldığı göz önünde bulundurulursa, elde edilen verilere göre oligomerik α -sinüklein birikiminin saptandığı tüm hücrelerde makrotofajik akış sürecinde aksaklıklar olduğu saptanmıştır. Literatürde de, hücrelerde biriken α -sinükleinin veziküler trafik (94), hücre iskeleti (233), otofagozom-lizozom füzyonu (234) gibi aşamalarda aksaklıklara sebep olarak makrotofaji mekanizmasında bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir. Çalışma grubumuza dahil edilen PH hastalarının sonuçları kıyaslandığında da, N370S/-

genotipine sahip PH hastasının hücrelerinde iPH hücrelerine kıyasla otofagozom-lizozom füzyonu aşamasında bozukluklar olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, monomerik ve oligomerik α -sinüklein birikimin daha fazla olduğu N370S/- PH hücrelerinde makrotofajik akışın bozulması literatürdeki verilerle oldukça uyumludur. GBA1 mutasyonları durumunda anlamlı şekilde artış gösteren hücresel α -sinüklein birikimi veziküler trafikte hatalara neden olarak makrotofaji mekanizmasında aksaklıklara neden olmaktadır. Bu bağlamda, GBA1 mutasyonlarının neden olduğu α -sinüklein birikiminin de hücresel yıkım mekanizmalarını etkileyerek sinerjistik olarak PH patolojisine daha fazla katkıda bulunduğu öne sürülebilir.

Sonuç olarak çalışmamızda, GBA1 mutasyonları durumunda, proteozomal/lizozomal yıkım bozukluklarının görülmesi sonucunda, iPKH kökenli dopaminerjik nöron kültürlerinde α -sinüklein birikimine neden olduğu tespit edilmiştir. Literatürde, α -sinüklein birikimine yol açan çeşitli fonksiyon kazanımı veya fonksiyon kaybı hipotezlerine yönelik potansiyel mekanizmalar öne sürülmüştür (9, 235). Tez çalışmasında öne sürdüğümüz hipotezimize göre, GBA1 gen mutasyonlarının iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda hücresel yıkım mekanizmalarını engelleyerek α -sinükleinin birikimine ve hücre dışına salınımına yol açan fonksiyon kazanımı teorisi savunulmaktadır. Tez çalışmasında, proteozomal/lizozomal yıkım mekanizmalarındaki aksaklıklara yönelik olarak öne sürülen GBA1'in fonksiyon kazanımı hipotezine göre, mutant GCaz enziminin hücrelerde yarattığı ER stres ve otofajik yıkım mekanizmalarında oluşturduğu aksaklıklar hücre içi monomerik/oligomerik α -sinüklein birikimine neden olarak PH patolojisine katkı sağlamaktadır. GBA1 ilişkili Parkinson Hastalığı patogenezi için savunulan bir diğer hipotez olan fonksiyon kaybı hipotezine göre ise, GBA1 mutasyonları sonucu mutant GCaz enzimin aktivite kaybından dolayı substrat birikimine neden olduğu ve bu birikimden dolayı hücrede değişen lipid profili dolayısıyla α -sinüklein lipidlerle etkileşime girerek birikebileceği savunulmaktadır (205). Fakat bu teori, GBA1 gen mutasyonu taşıyıcılarının iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarında α -sinüklein birikimi görülmesi sonucunu açıklayamamaktadır.

Dolayısıyla, fonksiyon kazanımı hipotezinin öne sürdüğü şekilde GBA1 mutasyonlarının α -sinüklein yıkım mekanizmaları üzerindeki patojenik etkilerinin aydınlatılması, hem nörolojik tutulumlu Gaucher hastalığının hem de GBA1 ilişkili Parkinson hastalığının rasyonel terapötik stratejileri için önem arz etmektedir. Hipotezimizde öne sürüldüğü üzere, 'ağır' ve 'hafif' GBA1 mutasyonlarının PH ilişkili nörodejenerasyonda farklı klinik etkiler göstermesinin moleküler olarak α -sinükleinin yıkımını farklı derecelerde etkilemelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir.

Bu bağlamda, 'ağır' ve 'hafif' GBA1 mutasyonlarının moleküler etkilerinin karşılaştırılması fenotipik semptomlar arasındaki farklılıklarının ve PH patolojisinin yayılmasındaki rolünün anlaşılması açısından son derece önemlidir. Bu bağlamda elde edilen verilerin, mutasyona bağlı bireysel farklılıkların açıklanmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, GBA1 gen mutasyonu taşıyıcılarının bahsedilen moleküler mekanizmalar açısından taşıdıkları moleküler risklerin tanımlanması, bu bireylerin ilerde PH veya sinükleopatileri geliştirme risklerinin daha iyi anlaşılması konusunda yardımcı olacaktır. GBA1 mutasyon taşıyıcılarının prodromal olarak izlenmeleri ve olası hastalık biyobelirteçlerinin bu bireylerde takip edilmesi, PH hastalığına yakalanmaları konusundaki riskleri azaltmak açısından fayda sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Çalışmada, N370S/N370S, L444P/L444P ve D409H/D409H genotiplerine sahip Gaucher hastalarından, bu hastaların zorunlu heterozigot GBA1 gen mutasyonu taşıyıcı aile bireylerinden, GBA1 gen mutasyonuna (N370S/-) sahip Parkinson hastasından, herhangi bir PH ilişkili gende mutasyon saptanmamış idyopatik Parkinson hastasından ve kontrol bireylerden elde edilen fibroblast hücreleri yeniden programlanarak iPKH hücre hatları elde edilmiştir. Sonrasında iPKH'ler dopaminerjik nöronlara farklılaştırılarak fonksiyonel analizlerde kullanılmak üzere PH hastalık modelleri elde edilmiştir.
- iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda, tüm homozigot GBA1 mutant hücrelerde GCaz enzim aktivitesi ve ifadesi azalmıştır. GBA1 heterozigot taşıyıcılarda ise N370S/- ve L444P/- genotiplerinin varlığında GCaz enzim aktivitesi azalırken, D409H/- genotipi varlığında GCaz enzim ifadesi azalmıştır. iPH ve PH N370S/- hücreleri karşılaştırıldığında, mutant GBA1 allelini hücrelerde GCaz aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. GBA1 gen mutasyonlarının GCaz enziminin LIMP2 aracılığıyla lizozoma taşınımında etkisi olmadığı tespit edilmiştir.
- Bazal koşullarda hücre içi monomerik α -sinüklein birikimi D409H/- genotipine sahip taşıyıcı bireyin ve N370S/- genotipine sahip PH hastası bireyin hücrelerinde saptanmıştır. Hücrelere proteazom inhibitörü uygulandığında, hücre içi monomerik α -sinüklein birikimi D409H/D409H genotipine sahip Gaucher hastası bireyin ve N370S/- genotipine sahip PH hastası bireyin hücrelerinde saptanmıştır.
- iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda tüm GBA1 homozigot mutant hücrelerde oligomerik α -sinüklein birikimi tespit edilmiştir. Bu birikimin 'ağır' GBA1 mutasyonu olan hücrelerde 'hafif' GBA1 mutasyonu olan hücrelere göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır. iPH ile PH N370S/- hastaları kıyaslandığında, N370S/- genotipine sahip PH hastasının hücrelerinde oligomerik α -sinüklein birikiminin anlamlı şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır.
- dQCM tekniği ile iPKH kökenli dopaminerjik nöronların besiyerine salınan α -sinüklein miktarının, tüm GBA1 homozigot mutant hücrelerde anlamlı şekilde

arttığı gösterilmiştir. Bu artışın, 'ağır' GBA1 mutasyonu olan hücrelerde 'hafif' GBA1 mutasyonu olan hücrelere göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır. Heterozigot GBA1 gen mutasyonuna sahip taşıyıcılarda α -sinüklein salınımı saptanmamıştır. iPH ile PH N370S/- hastaları kıyaslandığında, iPH hücrelerinde α -sinüklein salınımının anlamlı şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır.

- iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda ER stresi incelendiğinde, D409H/D409H genotipine sahip hücrelerde kontrollere kıyasla ER stresinde anlamlı şekilde artış olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerde proteozomal yıkım inhibe edildiğinde, ER stresinin 'ağır' (L444P ve D40H) homozigot GBA1 mutasyonu olan hücrelerde anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Hücresel total ubikitinlenme miktarlarının ise yalnızca 'ağır' (L444P ve D409H) GBA1 homozigot mutasyonları durumunda kontrol hücrelere göre anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. iPH ile PH N370S/- hastaları kıyaslandığında, her iki hücre hattında da total ubikitinlenme miktarı artarken, yalnızca PH N370S/- hücresinde ER stresinin arttığı tespit edilmiştir. Ek olarak, GBA1 mutasyonu olan tüm hücrelerde ve PH hastalarının hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla proteozom aktivitelerinde anlamlı şekilde azalma tespit edilmiştir.
- Çalışma grubuna dahil edilen bireylerin iPKH kökenli dopaminerjik nöron hücrelerinde, Şaperon aracılı otofaji mekanizmasında rolü olan LAMP2A protein ifadesinin ve LAMP2A-Hsc70 eş yerleşiminin 'hafif' (N370S) homozigot GBA1 mutasyonuna sahip hücrelerde anlamlı şekilde azaldığı ve bu hücrelerde ŞAO aracılı yıkımda aksaklıklar olduğu tespit edilmiştir.
- iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda makrootofaji mekanizması incelendiğinde, N370S/N370S ve D409H/D409H genotipine sahip bireylerin hücrelerinde otofagozom oluşumunun azaldığı, L444P/L444P genotipine sahip bireyin hücrelerinde otofagozom-lizozom füzyonunda bozukluklar olduğu tespit edilmiştir. iPH ile PH N370S/- hastaları kıyaslandığında, PH N370S/- hücrelerinde hem otofagozom oluşumu hem de otofagozom-lizozom füzyonunda aksaklıklar olduğu saptanmıştır.

6.2. Öneriler

- iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda farklı GBA1 gen mutasyonları varlığında, hücrelerde GCaz enzim eksikliğine bağlı substrat birikimin anlaşılabilmesi için hücrelerdeki lipit profili analiz edilebilir. Bu kapsamda, grubumuzun yürüttüğü Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen TSA-2017-12847 nolu Ayırıcı kütle spektrometri temelli metabolomik profillemeye projesinde, çalışma grubumuza dahil edilen bireylerin dopaminerjik nöron kültürlerinde GCaz substrat birikiminin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede, hücrelerde değişen lipit profillerinin α -sinüklein çekirdeklenmesi veya hücresel veziküler trafik ve otofajik yıkım mekanizmaları üzerindeki olası etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.
- iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda otofajik yıkım mekanizmalarını veya lizozomal yıkımı baskılayarak ve indükleyerek analiz edilmesi, GBA1 gen mutasyonları durumunda hücrelerin bu kimyasal streslere karşı verdiği yanıtın anlaşılmasına olanak sağlayabilir. Bu sayede, tez çalışmasında incelenen α -sinüklein yıkım mekanizmalarına yönelik olası tedavi potansiyelleri hakkında fikir edinilebilir.
- GBA1-PH ilişkisine yönelik yapılan analizlerin, hasta kaynaklı iPKH kökenli dopaminerjik nöronların genom düzenleme yöntemleri kullanılarak GBA1 mutasyonlarının düzeltilmesiyle elde edilecek izogenik kontroller kullanılarak gerçekleştirilmesi, hasta kaynaklı genetik farklılıkların ortadan kaldırılmasıyla GBA1'in patogeneze ilişkin rolünün daha objektif bir şekilde araştırılmasına olanak sağlayabilir.
- Çalışma grubuna, farklı GBA1 mutasyonlarına sahip PH hastalarının dahil edilerek örneklem sayısının artırılması, PH patogeneze ek olarak GBA1 gen mutasyonlarının katkısının anlaşılmasına olanak sağlayabilir.
- Çalışma grubuna dahil edilen iPKH kökenli dopaminerjik nöronlarda transkriptom analizi yapılarak fenotipik 'ciddiyet' ile ilişkili diğer olası yollar belirlenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(17):1651-61.
2. Liou B, Kazimierczuk A, Zhang M, Scott CR, Hegde RS, Grabowski GA. Analyses of variant acid β -glucosidases: effects of Gaucher disease mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(7):4242-53.
3. Malek N, Weil RS, Bresner C, Lawton MA, Grosset KA, Tan M, et al. Features of GBA-associated Parkinson's disease at presentation in the UK Tracking Parkinson's study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2018;89(7):702-9.
4. Nalls MA, Duran R, Lopez G, Kurzawa-Akanbi M, McKeith IG, Chinnery PF, et al. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA neurology*. 2013;70(6):727-35.
5. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology*. 2015;84(9):880-7.
6. Thaler A, Bregman N, Gurevich T, Shiner T, Dror Y, Zmira O, et al. Parkinson's disease phenotype is influenced by the severity of the mutations in the GBA gene. *Parkinsonism & related disorders*. 2018;55:45-9.
7. Mazzulli JR, Xu Y-H, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011;146(1):37-52.
8. Sardi SP, Cheng SH, Shihabuddin LS. Gaucher-related synucleinopathies: the examination of sporadic neurodegeneration from a rare (disease) angle. *Progress in neurobiology*. 2015;125:47-62.
9. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *The Lancet Neurology*. 2012;11(11):986-98.
10. Osellame LD, Rahim AA, Hargreaves IP, Gegg ME, Richard-Londt A, Brandner S, et al. Mitochondria and quality control defects in a mouse model of Gaucher disease—links to Parkinson's disease. *Cell metabolism*. 2013;17(6):941-53.

11. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*. 1989;4(1):87-96.
12. Önal G, Gümüş E, Demir H, Yüce A, Dökmeci S. Molecular genetic analysis of Turkish Gaucher's disease patients reveals three novel variants in Glucocerebrosidase (GBA) gene. *Meta Gene*. 2020;25:100725.
13. Akiyama H, Hirabayashi Y. A novel function for glucocerebrosidase as a regulator of sterylglucoside metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2017;1861(10):2507-14.
14. Sorge J, West C, Kuhl W, Treger L, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *American journal of human genetics*. 1987;41(6):1016.
15. Toffoli M, Smith L, Schapira AH. The biochemical basis of interactions between Glucocerebrosidase and alpha-synuclein in GBA1 mutation carriers. *Journal of neurochemistry*. 2020;154(1):11-24.
16. Kacher Y, Brumshtein B, Boldin-Adamsky S, Toker L, Shainskaya A, Silman I, et al. Acid β -glucosidase: insights from structural analysis and relevance to Gaucher disease therapy. 2008.
17. Zhao H, Grabowski G. Gaucher disease: Perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2002;59(4):694-707.
18. Parkin J, Brunning R. Pathology of the Gaucher cell. *Progress in clinical and biological research*. 1982;95:151-75.
19. Knudson Jr AG, Kaplan WD. Genetics of the sphingolipidoses. *Cerebral sphingolipidoses*. 1962:395.
20. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Archives of internal medicine*. 2000;160(18):2835-43.
21. Tyłki-Szymańska A, Vellodi A, El-Beshlawy A, Cole JA, Kolodny E. Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes

Subregistry. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. 2010;33(4):339-46.

22. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Molecular genetics and metabolism*. 2004;83(1-2):6-15.

23. Goker-Alpan O, Hruska K, Orvisky E, Kishnani P, Stubblefield B, Schiffmann R, et al. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. *Journal of medical genetics*. 2005;42(6):e37-e.

24. Grabowski GA, Horowitz M. 2 Gaucher's disease: molecular, genetic and enzymological aspects. *Baillière's clinical haematology*. 1997;10(4):635-56.

25. Baris HN, Cohen IJ, Mistry PK. Gaucher disease: the metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history. *Pediatric endocrinology reviews: PER*. 2014;12(0 1):72.

26. Beutler E, Gelbart T. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1998;24(1):2-8.

27. Smith L, Mullin S, Schapira AH. Insights into the structural biology of Gaucher disease. *Experimental neurology*. 2017;298:180-90.

28. Lieberman RL, Wustman BA, Huertas P, Powe AC, Pine CW, Khanna R, et al. Structure of acid β -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nature chemical biology*. 2007;3(2):101-7.

29. Lieberman RL. A guided tour of the structural biology of Gaucher disease: Acid- β -glucosidase and saposin C. *Enzyme research*. 2011;2011.

30. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human molecular genetics*. 2005;14(16):2387-98.

31. Xia Y, Saitoh T, Uéda K, Tanaka S, Chen X, Hashimoto M, et al. Characterization of the human α -synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms 1. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2001;3(5):485-94.

32. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell biology and pathophysiology of α -synuclein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(3):a024091.

33. Baltic S, Perovic M, Mladenovic A, Raicevic N, Ruzdijic S, Rakic L, et al. α -Synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2004;22(3):199-203.
34. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(1):38-48.
35. Zhang H, Maitta RW, Bhattacharyya PK, Florea AD, Sen F, Wang Q, et al. γ -Synuclein is a promising new marker for staining reactive follicular dendritic cells, follicular dendritic cell sarcoma, Kaposi sarcoma, and benign and malignant vascular tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(12):1857-65.
36. Nakajo S, Shioda S, Nakai Y, Nakaya K. Localization of phosphonoprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Molecular brain research*. 1994;27(1):81-6.
37. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, De Silva HR, et al. The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*. 1995;14(2):467-75.
38. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of α -synuclein. *Neuron*. 2013;79(6):1044-66.
39. Baptista MJ, O'Farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller DW, Hardy J, et al. Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by α -synuclein in human neuroblastoma cell lines. *Journal of neurochemistry*. 2003;85(4):957-68.
40. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(8):3090-9.
41. Guo JT, Chen AQ, Kong Q, Zhu H, Ma CM, Qin C. Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in α -synuclein stably transfected SH-SY5Y cells. *Cellular and molecular neurobiology*. 2008;28(1):35-47.
42. Sharon R, Goldberg MS, Bar-Josef I, Betensky RA, Shen J, Selkoe DJ. α -Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and

shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(16):9110-5.

43. Ahn B-H, Rhim H, Kim SY, Sung Y-M, Lee M-Y, Choi J-Y, et al. α -Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(14):12334-42.

44. Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, et al. Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(42):32486-93.

45. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS letters*. 1994;345(1):27-32.

46. Dikiy I, Eliezer D. Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2012;1818(4):1013-8.

47. Breydo L, Wu JW, Uversky VN. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(2):261-85.

48. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(23):11282-6.

49. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2016;21.

50. Ray B, Mahalakshmi AM, Tuladhar S, Bhat A, Srinivasan A, Pellegrino C, et al. "Janus-Faced" α -synuclein: Role in Parkinson's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9.

51. Samuel F, Flavin WP, Iqbal S, Pacelli C, Renganathan SDS, Trudeau L-E, et al. Effects of serine 129 phosphorylation on α -synuclein aggregation, membrane association, and internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(9):4374-85.

52. Dzamko N, Zhou J, Huang Y, Halliday GM. Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2014;7:57.
53. Oueslati A. Implication of alpha-synuclein phosphorylation at S129 in synucleinopathies: what have we learned in the last decade? *Journal of Parkinson's disease*. 2016;6(1):39-51.
54. Tenreiro S, Reimao-Pinto MM, Antas P, Rino J, Wawrzycka D, Macedo D, et al. Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS genetics*. 2014;10(5):e1004302.
55. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011;477(7362):107-10.
56. Smaldone G, Diana D, Pollegioni L, Di Gaetano S, Fattorusso R, Pedone E. Insight into conformational modification of alpha-synuclein in the presence of neuronal whole cells and of their isolated membranes. *FEBS letters*. 2015;589(7):798-804.
57. Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LT, Liao J, et al. A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(43):17797-802.
58. Ramakrishnan M, Jensen PH, Marsh D. Association of α -synuclein and mutants with lipid membranes: spin-label ESR and polarized IR. *Biochemistry*. 2006;45(10):3386-95.
59. Ullman O, Fisher CK, Stultz CM. Explaining the structural plasticity of α -synuclein. *Journal of the american chemical society*. 2011;133(48):19536-46.
60. Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular medicine*. 2008;14(7):451-64.
61. Cox D, Carver JA, Ecroyd H. Preventing α -synuclein aggregation: the role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(9):1830-43.

62. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(3):457-87.
63. Uversky VN, Eliezer D. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of α -synuclein. *Current Protein and Peptide Science*. 2009;10(5):483-99.
64. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, et al. Full length α -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience letters*. 2000;287(1):65-7.
65. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, et al. α -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *The FASEB Journal*. 2003;17(13):1-16.
66. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by α -synuclein oligomers provides evidence for spreading of α -synuclein pathology. *Journal of neurochemistry*. 2009;111(1):192-203.
67. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*. 2012;338(6109):949-53.
68. Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(31):13010-5.
69. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(20):6838-51.
70. Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJ. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neuroscience research*. 2011;69(4):337-42.
71. Danzer KM, Ruf WP, Putcha P, Joyner D, Hashimoto T, Glabe C, et al. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *The FASEB journal*. 2011;25(1):326-36.

72. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *The FASEB Journal*. 2005;19(6):533-42.
73. Hansen C, Angot E, Bergström A-L, Steiner JA, Pieri L, Paul G, et al. α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(2):715-25.
74. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, et al. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron*. 2011;72(1):57-71.
75. Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nature cell biology*. 2009;11(3):328-36.
76. Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 2010;26:211-33.
77. Ahn KJ, Paik SR, Chung KC, Kim J. Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of α -synuclein. *Journal of neurochemistry*. 2006;97(1):265-79.
78. Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, Maguire J, Zhang H, McGeer EG, et al. α -Synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiology of aging*. 2008;29(5):739-52.
79. Reynolds AD, Glanzer JG, Kadiu I, Ricardo-Dukelow M, Chaudhuri A, Ciborowski P, et al. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2008;104(6):1504-25.
80. Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee S-J. Clearance and deposition of extracellular α -synuclein aggregates in microglia. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;372(3):423-8.

81. Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, Kirik D, Vekrellis K, Tofaris GK. How is alpha-synuclein cleared from the cell? *Journal of neurochemistry*. 2019;150(5):577-90.
82. Musgrove RE, Helwig M, Bae E-J, Aboutaleb H, Lee S-J, Ulusoy A, et al. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α -synuclein transfer. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(9):3738-53.
83. Bae E-J, Yang N-Y, Song M, Lee CS, Lee JS, Jung BC, et al. Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of α -synuclein. *Nature communications*. 2014;5(1):1-11.
84. Mahul-Mellier A-L, Bartscher J, Maharjan N, Weerens L, Croisier M, Kuttler F, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(9):4971-82.
85. Lin K-J, Lin K-L, Chen S-D, Liou C-W, Chuang Y-C, Lin H-Y, et al. The overcrowded crossroads: mitochondria, alpha-synuclein, and the endo-lysosomal system interaction in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(21):5312.
86. Nakamura K, Nemani VM, Wallender EK, Kaehlcke K, Ott M, Edwards RH. Optical reporters for the conformation of α -synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(47):12305-17.
87. Li W-W, Yang R, Guo J-C, Ren H-M, Zha X-L, Cheng J-S, et al. Localization of α -synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*. 2007;18(15):1543-6.
88. Liu G, Zhang C, Yin J, Li X, Cheng F, Li Y, et al. α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience letters*. 2009;454(3):187-92.
89. Cole NB, DiEuliis D, Leo P, Mitchell DC, Nussbaum RL. Mitochondrial translocation of α -synuclein is promoted by intracellular acidification. *Experimental cell research*. 2008;314(10):2076-89.

90. Colla E, Jensen PH, Pletnikova O, Troncoso JC, Glabe C, Lee MK. Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(10):3301-5.
91. Liu M, Qin L, Wang L, Tan J, Zhang H, Tang J, et al. α -synuclein induces apoptosis of astrocytes by causing dysfunction of the endoplasmic reticulum-Golgi compartment. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):322-32.
92. Ryu S, Baek I, Liew H. Sumoylated α -synuclein translocates into the nucleus by karyopherin α 6. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2019;15(1):103-9.
93. Ma K-L, Song L-K, Yuan Y-H, Zhang Y, Han N, Gao K, et al. The nuclear accumulation of alpha-synuclein is mediated by importin alpha and promotes neurotoxicity by accelerating the cell cycle. *Neuropharmacology*. 2014;82:132-42.
94. Winslow AR, Chen C-W, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, et al. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology*. 2010;190(6):1023-37.
95. Lei Z, Cao G, Wei G. A30P mutant α -synuclein impairs autophagic flux by inactivating JNK signaling to enhance ZKSCAN3 activity in midbrain dopaminergic neurons. *Cell death & disease*. 2019;10(2):1-14.
96. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3(1):1-21.
97. Heinzel S, Berg D, Gasser T, Chen H, Yao C, Postuma RB, et al. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2019;34(10):1464-70.
98. Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics*. 2009;18(R1):R48-R59.
99. Lunati A, Lesage S, Brice A. The genetic landscape of Parkinson's disease. *Revue neurologique*. 2018;174(9):628-43.
100. Miller J, McCLUER R, KANFER JN. Gaucher's disease: neurologic disorder in adult siblings. *Annals of Internal Medicine*. 1973;78(6):883-7.

101. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type 1 Gaucher disease. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1996;89(9):691-4.
102. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca M, Wong K, et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Molecular genetics and metabolism*. 2003;79(2):104-9.
103. Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, et al. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2004;82(3):192-207.
104. Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*. 2009;132(7):1783-94.
105. Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca M, Nussbaum R, McInerney-Leo A, Sidransky E. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *Journal of medical genetics*. 2004;41(12):937-40.
106. Halperin A, Elstein D, Zimran A. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2006;36(3):426-8.
107. Bultron G, Kacena K, Pearson D, Boxer M, Yang R, Sathe S, et al. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010;33(2):167-73.
108. McNeill A, Duran R, Hughes DA, Mehta A, Schapira AH. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2012;83(8):853-4.
109. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2014;137(3):834-48.

110. Yang J, Hertz E, Zhang X, Leinartaitė L, Lundius EG, Li J, et al. Overexpression of α -synuclein simultaneously increases glutamate NMDA receptor phosphorylation and reduces glucocerebrosidase activity. *Neuroscience letters*. 2016;611:51-8.
111. Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Annals of neurology*. 2012;72(3):455-63.
112. Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford R, et al. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-12.
113. Sun Y, Liou B, Ran H, Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV, et al. Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: viable combined selective saposin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. *Human molecular genetics*. 2010;19(6):1088-97.
114. Schöndorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, et al. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nature communications*. 2014;5(1):1-17.
115. Cleeter MW, Chau K-Y, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchen M, et al. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochemistry international*. 2013;62(1):1-7.
116. Galvagnion C, Brown JW, Ouberaï MM, Flagmeier P, Vendruscolo M, Buell AK, et al. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(26):7065-70.
117. Fink AL. The aggregation and fibrillation of α -synuclein. *Accounts of chemical research*. 2006;39(9):628-34.
118. Paul A, Jacoby G, Laor Bar-Yosef D, Beck R, Gazit E, Segal D. Glucosylceramide Associated with Gaucher Disease Forms Amyloid-like Twisted Ribbon Fibrils That Induce α -Synuclein Aggregation. *ACS nano*. 2021.

119. Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AH. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Movement Disorders*. 2015;30(8):1085-9.
120. Bendikov-Bar I, Ron I, Filocamo M, Horowitz M. Characterization of the ERAD process of the L444P mutant glucocerebrosidase variant. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2011;46(1):4-10.
121. Schmitz M, Alfalah M, Aerts JM, Naim HY, Zimmer K-P. Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(11):2310-20.
122. Zimmer KP, le Coutre P, Aerts HM, Harzer K, Fukuda M, O'Brien JS, et al. Intracellular transport of acid β -glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *The Journal of pathology*. 1999;188(4):407-14.
123. Korkotian E, Schwarz A, Pelled D, Schwarzmunn Gn, Segal M, Futerman AH. Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21673-8.
124. Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta neuropathologica*. 2010;120(5):641-9.
125. Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, Westbroek W, Goldin E, Moaven N, et al. α -Synuclein interacts with glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(32):28080-8.
126. Yap TL, Velayati A, Sidransky E, Lee JC. Membrane-bound α -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*. 2013;108(1):56-64.
127. Goedert M, Masuda-Suzukake M, Falcon B. Like prions: the propagation of aggregated tau and α -synuclein in neurodegeneration. *Brain*. 2017;140(2):266-78.

128. Lee H-J, Patel S, Lee S-J. Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(25):6016-24.
129. Stuenkel A, Kunadt M, Kruse N, Bartels C, Moebius W, Danzer KM, et al. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain*. 2016;139(2):481-94.
130. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiology of disease*. 2011;42(3):360-7.
131. Eitan E, Suire C, Zhang S, Mattson MP. Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing research reviews*. 2016;32:65-74.
132. Cerri S, Ghezzi C, Ongari G, Croce S, Avenali M, Zangaglia R, et al. GBA Mutations Influence the Release and Pathological Effects of Small Extracellular Vesicles from Fibroblasts of Patients with Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(4):2215.
133. Papadopoulos VE, Nikolopoulou G, Antoniadou I, Karachaliou A, Arianoglou G, Emmanouilidou E, et al. Modulation of β -glucocerebrosidase increases α -synuclein secretion and exosome release in mouse models of Parkinson's disease. *Human molecular genetics*. 2018;27(10):1696-710.
134. Farfel-Becker T, Vitner EB, Futerman AH. Animal models for Gaucher disease research. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(6):746-52.
135. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, et al. Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(4):1756-64.
136. Sinclair GB, Jevon G, Colobong KE, Randall DR, Choy FY, Clarke LA. Generation of a conditional knockout of murine glucocerebrosidase: utility for the study of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2007;90(2):148-56.
137. Enquist IB, Nilsson E, Ooka A, Månsson J-E, Olsson K, Ehinger M, et al. Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(37):13819-24.

138. Davis M, Trinh K, Thomas R, Whittley B, Montine T, Pallanck L. Using a *Drosophila* GBA deficiency model to understand the role of GBA in Parkinson's disease (P2. 146). AAN Enterprises; 2015.
139. Sanchez-Martinez A, Beavan M, Gegg ME, Chau K-Y, Whitworth AJ, Schapira AH. Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-12.
140. Keatinge M, Bui H, Menke A, Chen Y-C, Sokol AM, Bai Q, et al. Glucocerebrosidase 1 deficient *Danio rerio* mirror key pathological aspects of human Gaucher disease and provide evidence of early microglial activation preceding alpha-synuclein-independent neuronal cell death. *Human molecular genetics*. 2015;24(23):6640-52.
141. Kaur G, Dufour JM. *Cell lines: Valuable tools or useless artifacts*. Taylor & Francis; 2012.
142. Manning-Boğ AB, Schüle B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. *Neurotoxicology*. 2009;30(6):1127-32.
143. McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau K-Y, Hughes D, Mehta A, et al. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain*. 2014;137(5):1481-95.
144. Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AH. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Human molecular genetics*. 2016;25(16):3432-45.
145. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006;126(4):663-76.
146. Momcilovic O, Sivapatham R, Oron TR, Meyer M, Mooney S, Rao MS, et al. Derivation, characterization, and neural differentiation of integration-free induced pluripotent stem cell lines from Parkinson's disease patients carrying SNCA, LRRK2, PARK2, and GBA mutations. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154890.

147. Fernandes HJ, Hartfield EM, Christian HC, Emmanouilidou E, Zheng Y, Booth H, et al. ER stress and autophagic perturbations lead to elevated extracellular α -synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-derived dopamine neurons. *Stem cell reports*. 2016;6(3):342-56.
148. Schöndorf DC, Ivanyuk D, Baden P, Sanchez-Martinez A, De Cicco S, Yu C, et al. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside rescues mitochondrial defects and neuronal loss in iPSC and fly models of Parkinson's disease. *Cell reports*. 2018;23(10):2976-88.
149. Kim S, Yun SP, Lee S, Umanah GE, Bandaru VVR, Yin X, et al. GBA1 deficiency negatively affects physiological α -synuclein tetramers and related multimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(4):798-803.
150. Awad O, Sarkar C, Panicker LM, Miller D, Zeng X, Sgambato JA, et al. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Human molecular genetics*. 2015;24(20):5775-88.
151. Mazzulli JR, Zunke F, Isacson O, Studer L, Krainc D. α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(7):1931-6.
152. Burbulla LF, Song P, Mazzulli JR, Zampese E, Wong YC, Jeon S, et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*. 2017;357(6357):1255-61.
153. Lopes da Fonseca T, Pinho R, Outeiro TF. A familial ATP13A2 mutation enhances alpha-synuclein aggregation and promotes cell death. *Human molecular genetics*. 2016;25(14):2959-71.
154. Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: jointed by a chaperone. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(15):5414-24.
155. Shimizu S. Biological roles of alternative autophagy. *Molecules and cells*. 2018;41(1):50.

156. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology*. 2014;16(6):495-501.
157. Martins Branco D, Arduino DM, Esteves AR, Silva DF, Cardoso SM, Oliveira C. Cross-talk between mitochondria and proteasome in Parkinson's disease pathogenesis. *Frontiers in aging neuroscience*. 2010;2:17.
158. Ebrahimi-Fakhari D, McLean PJ, Unni VK. Alpha-synuclein's degradation in vivo: opening a new (cranial) window on the roles of degradation pathways in Parkinson disease. *Autophagy*. 2012;8(2):281-3.
159. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. α -Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(27):25009-13.
160. Yang F, Yang Y-p, Mao C-j, Liu L, Zheng H-f, Hu L-f, et al. Crosstalk between the proteasome system and autophagy in the clearance of α -synuclein. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013;34(5):674-80.
161. Ciechanover A, Kwon YT. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & molecular medicine*. 2015;47(3):e147-e.
162. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular neurobiology*. 2013;47(2):537-51.
163. Ghemrawi R, Khair M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(17):6127.
164. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016;529(7586):326-35.
165. Rashid H-O, Yadav RK, Kim H-R, Chae H-J. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*. 2015;11(11):1956-77.
166. Manié SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2014;307(10):C901-C7.

167. Pandey VK, Mathur A, Kakkar P. Emerging role of Unfolded Protein Response (UPR) mediated proteotoxic apoptosis in diabetes. *Life sciences*. 2019;216:246-58.
168. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *science*. 2011;334(6059):1081-6.
169. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*. 2002.
170. Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(11):634-42.
171. Layfield R, Tooth D, Landon M, Dawson S, Mayer J, Alban A. Purification of poly-ubiquitinated proteins by S5a-affinity chromatography. *PROTEOMICS: International Edition*. 2001;1(6):773-7.
172. Furukawa Y, Vigouroux S, Wong H, Guttman M, Rajput AH, Ang L, et al. Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2002;51(6):779-82.
173. Bukhatwa S, Zeng B-Y, Rose S, Jenner P. A comparison of changes in proteasomal subunit expression in the substantia nigra in Parkinson's disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Brain research*. 2010;1326:174-83.
174. McNaught KSP, Mytilineou C, JnoBaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jenner P, et al. Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *Journal of neurochemistry*. 2002;81(2):301-6.
175. Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K. Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiology of aging*. 2010;31(6):953-68.
176. Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in biochemical sciences*. 1990;15(8):305-9.

177. King FW, Wawrzynow A, Höhfeld J, Zylicz M. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *The EMBO journal*. 2001;20(22):6297-305.
178. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 1996;273(5274):501-3.
179. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research*. 2014;24(1):92-104.
180. Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, et al. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS biology*. 2019;17(5):e3000301.
181. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 2004;305(5688):1292-5.
182. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero M, Michel P, Marquez J, et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and histopathology*. 1997.
183. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of neurology*. 2010;67(12):1464-72.
184. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Spiro AS, Furuta A, Cooper A, et al. Lysosomal-associated membrane protein 2 isoforms are differentially affected in early Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2015;30(12):1639-47.
185. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type α -synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(35):23542-56.
186. Issa A-R, Sun J, Petitgas C, Mesquita A, Dulac A, Robin M, et al. The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the *Drosophila* brain. *Autophagy*. 2018;14(11):1898-910.

187. Kinghorn KJ, Asghari AM, Castillo-Quan JI. The emerging role of autophagic-lysosomal dysfunction in Gaucher disease and Parkinson's disease. *Neural regeneration research*. 2017;12(3):380.
188. Lehtonen Š, Sonninen T-M, Wojciechowski S, Goldsteins G, Koistinaho J. Dysfunction of cellular proteostasis in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:457.
189. Klucken J, Poehler A-M, Ebrahimi-Fakhari D, Schneider J, Nuber S, Rockenstein E, et al. Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy*. 2012;8(5):754-66.
190. Lee H-J, Khoshaghideh F, Patel S, Lee S-J. Clearance of α -synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(8):1888-96.
191. Shahpasandzadeh H, Popova B, Kleinknecht A, Fraser PE, Outeiro TF, Braus GH. Interplay between sumoylation and phosphorylation for protection against α -synuclein inclusions. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(45):31224-40.
192. Karabiyik C, Lee MJ, Rubinsztein DC. Autophagy impairment in Parkinson's disease. *Essays in biochemistry*. 2017;61(6):711-20.
193. Nunes-Costa D, Magalhães JD, Cardoso SM, Empadinhas N. Microbial BMAA and the pathway for Parkinson's disease neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*. 2020;12:26.
194. Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, et al. Acid β -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter α -synuclein processing. *Annals of neurology*. 2011;69(6):940-53.
195. Reinhardt P, Glatza M, Hemmer K, Tsytsyura Y, Thiel CS, Höing S, et al. Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PloS one*. 2013;8(3):e59252.
196. Valera E, Dargusch R, Maher PA, Schubert D. Modulation of 5-lipoxygenase in proteotoxicity and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(25):10512-25.

197. Kößlinger C, Drost S, Aberl F, Wolf H, Koch S, Woias P. A quartz crystal biosensor for measurement in liquids. *Biosensors and Bioelectronics*. 1992;7(6):397-404.
198. Kausaite-Minkstimiene A, Ramanaviciene A, Ramanavicius A. Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibodies against human growth hormone. *Analyst*. 2009;134(10):2051-7.
199. Kim M-G, Shin Y-B, Jung J-M, Ro H-S, Chung BH. Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray. *Journal of immunological methods*. 2005;297(1-2):125-32.
200. Noronha T, Chauffaille M. Multiple long runs of homozygosity detected by SNP array: offspring of consanguineous parents and his siblings. *Adv Cytol Pathol*. 2018;3(3):56-9.
201. Gale E, Li M. Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular brain*. 2008;1(1):1-10.
202. Woodard CM, Campos BA, Kuo S-H, Nirenberg MJ, Nestor MW, Zimmer M, et al. iPSC-derived dopamine neurons reveal differences between monozygotic twins discordant for Parkinson's disease. *Cell reports*. 2014;9(4):1173-82.
203. B White R, G Thomas M. Moving beyond tyrosine hydroxylase to define dopaminergic neurons for use in cell replacement therapies for Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2012;11(4):340-9.
204. Sardi SP, Clarke J, Kinnecom C, Tamsett TJ, Li L, Stanek LM, et al. CNS expression of glucocerebrosidase corrects α -synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(29):12101-6.
205. Maor G, Rapaport D, Horowitz M. The effect of mutant GBA1 on accumulation and aggregation of α -synuclein. *Human molecular genetics*. 2019;28(11):1768-81.

206. Gegg ME, Verona G, Schapira AH. Glucocerebrosidase deficiency promotes release of α -synuclein fibrils from cultured neurons. *Human molecular genetics*. 2020;29(10):1716-28.
207. Migdalska-Richards A, Wegrzynowicz M, Harrison IF, Verona G, Bellotti V, Spillantini MG, et al. L444P Gba1 mutation increases formation and spread of α -synuclein deposits in mice injected with mouse α -synuclein pre-formed fibrils. *Plos one*. 2020;15(8):e0238075.
208. Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ, Samali A. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(10):2025-39.
209. Lu J, Chiang J, Iyer RR, Thompson E, Kaneski CR, Xu DS, et al. Decreased glucocerebrosidase activity in Gaucher disease parallels quantitative enzyme loss due to abnormal interaction with TCP1 and c-Cbl. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(50):21665-70.
210. Kilpatrick BS, Magalhaes J, Beavan MS, McNeill A, Gegg ME, Cleeter MW, et al. Endoplasmic reticulum and lysosomal Ca^{2+} stores are remodelled in GBA1-linked Parkinson disease patient fibroblasts. *Cell Calcium*. 2016;59(1):12-20.
211. Deger JM, Gerson JE, Kaye R. The interrelationship of proteasome impairment and oligomeric intermediates in neurodegeneration. *Aging cell*. 2015;14(5):715-24.
212. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *autophagy*. 2021;17(1):1-382.
213. Ke M, Chong C-M, Su H. Using induced pluripotent stem cells for modeling Parkinson's disease. *World journal of stem cells*. 2019;11(9):634.
214. Sternecker JL, Reinhardt P, Schöler HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(9):625-39.
215. Vermilyea SC, Babinski A, Tran N, To S, Guthrie S, Kluss JH, et al. In vitro CRISPR/Cas9-directed gene editing to model LRRK2 G2019S Parkinson's disease in common marmosets. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-15.

216. Barbuti P, Antony P, Santos B, Massart F, Cruciani G, Dording C, et al. Using high-content screening to generate single-cell gene-corrected patient-derived iPS clones reveals excess alpha-synuclein with familial Parkinson's disease point mutation A30P. *Cells*. 2020;9(9):2065.
217. Freije JM, López-Otín C. Reprogramming aging and progeria. *Current opinion in cell biology*. 2012;24(6):757-64.
218. Mahmoudi S, Brunet A. Aging and reprogramming: a two-way street. *Current opinion in cell biology*. 2012;24(6):744-56.
219. Soria-Valles C, López-Otín C. iPSCs: on the road to reprogramming aging. *Trends in Molecular Medicine*. 2016;22(8):713-24.
220. Studer L, Vera E, Cornacchia D. Programming and reprogramming cellular age in the era of induced pluripotency. *Cell stem cell*. 2015;16(6):591-600.
221. Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell stem cell*. 2013;13(6):691-705.
222. Mazzulli JR, Zunke F, Tsunemi T, Toker NJ, Jeon S, Burbulla LF, et al. Activation of β -glucocerebrosidase reduces pathological α -synuclein and restores lysosomal function in Parkinson's patient midbrain neurons. *Journal of Neuroscience*. 2016;36(29):7693-706.
223. Strässler ET, Aalto-Setälä K, Kiamehr M, Landmesser U, Kränkel N. Age is relative—Impact of donor age on induced pluripotent stem cell-derived cell functionality. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:4.
224. Chang C-J, Mitra K, Koya M, Velho M, Desprat R, Lenz J, et al. Production of embryonic and fetal-like red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *PloS one*. 2011;6(10):e25761.
225. Wen Y, Wani P, Zhou L, Baer T, Phadnis SM, Reijo Pera RA, et al. Reprogramming of fibroblasts from older women with pelvic floor disorders alters cellular behavior associated with donor age. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013;2(2):118-28.

226. Prigione A, Hossini AM, Lichtner B, Serin A, Fauler B, Megges M, et al. Mitochondrial-associated cell death mechanisms are reset to an embryonic-like state in aged donor-derived iPS cells harboring chromosomal aberrations. *PloS one*. 2011;6(11):e27352.
227. Do J, McKinney C, Sharma P, Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Molecular neurodegeneration*. 2019;14(1):1-16.
228. Thomas R, Moloney EB, Macbain ZK, Hallett PJ, Isacson O. Fibroblasts from idiopathic Parkinson's disease exhibit deficiency of lysosomal glucocerebrosidase activity associated with reduced levels of the trafficking receptor LIMP2. *Molecular brain*. 2021;14(1):1-12.
229. Rothaug M, Zunke F, Mazzulli JR, Schweizer M, Altmeyden H, Lüllmann-Rauch R, et al. LIMP-2 expression is critical for β -glucocerebrosidase activity and α -synuclein clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(43):15573-8.
230. Gan-Or Z, Giladi N, Orr-Urtreger A. Differential phenotype in Parkinson's disease patients with severe versus mild GBA mutations. *Brain*. 2009;132(10):e125-e.
231. Kara E, Crimi A, Wiedmer A, Emmenegger M, Manzoni C, Bandres-Ciga S, et al. An integrated genomic approach to dissect the genetic landscape regulating the cell-to-cell transfer of α -synuclein. *Cell Reports*. 2021;35(10):109189.
232. Cilia R, Tunesi S, Marotta G, Cereda E, Siri C, Tesei S, et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters. *Annals of neurology*. 2016;80(5):662-73.
233. Sarkar S, Olsen AL, Sygnecka K, Lohr KM, Feany MB. α -synuclein impairs autophagosome maturation through abnormal actin stabilization. *PLoS genetics*. 2021;17(2):e1009359.
234. Stykel MG, Humphries KM, Kamski-Hennekam E, Buchner-Duby B, Portet-Trachsel N, Ryan T, et al. α -Synuclein mutation impairs processing of endomembrane compartments and promotes exocytosis and seeding of α -synuclein pathology. *Cell Reports*. 2021;35(6):109099.

235. Yang N-Y, Lee Y-N, Lee H-J, Kim YS, Lee S-J. Glucocerebrosidase, a new player changing the old rules in Lewy body diseases. *Biological chemistry*. 2013;394(7):807-18.



8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1138

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24 AĞUSTOS 2017 PERŞEMBE
Toplantı No : 2017/19
Proje No : GO 17/673 (Değerlendirme Tarihi: 24.08.2017)
Karar No : GO 17/673- 33

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Serap DÖKMECİ' nin sorumlu araştırmacı olduğu ve Arş. Gör. Gizem ÖNAL' ın doktora tezi olan, GO 17/673 kayıt numaralı, "*Glukozilseramidaz-Beta Gen Mutasyonlarının Dopaminerjik Nöronlarda α -Sinüklein Yıkım Mekanizmaları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	Başkan)	10. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	
İZİNLİ			
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	11. Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım S	(Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
4. Prof. Dr. N	(Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
İZİNLİ			
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU	(Üye)	14. Doç. Dr. Can Ebru KURT	
İZİNLİ			
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR	
İZİNLİ			
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN	(Üye)	17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜL	(Üye)	18. Av. Meltem ONU	(Üye)

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

GLUKOZİL SERAMİDAZ-BETA GEN MUTASYONLARININ
DOPAMİNERJİK NÖRONLARDA α -SİNÜKLEİN YIKIM
MEKANİZMALARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Inonu University

Öğrenci Ödevi

%**2**

2

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

3

avesis.hacettepe.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

5

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

www.mdpi.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

<%**1**

8

Submitted to liberty

Öğrenci Ödevi

<%**1**

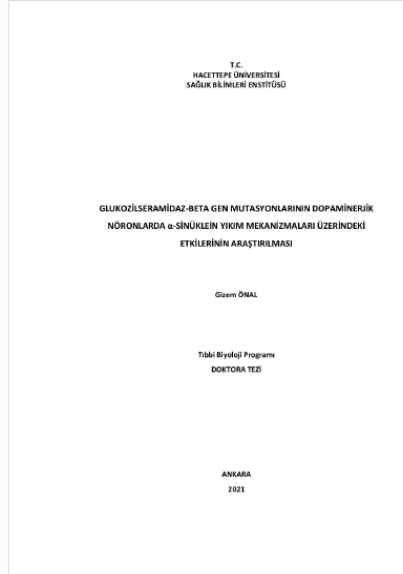
eprints.hud.ac.uk

EK-3: Tez Çalışması Dijital Makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Gizem Önal
Assignment title: GLUKOZİLSERAMİDAZ-BETA GEN MUTASYONLARININ DOPA...
Submission title: GLUKOZİLSERAMİDAZ-BETA GEN MUTASYONLARININ DOPA...
File name: Gizem_nal_Doktora_tez_c_kt.pdf
File size: 5.3M
Page count: 148
Word count: 32,005
Character count: 221,938
Submission date: 20-Sep-2021 02:48PM (UTC+0300)
Submission ID: 1652871316



9. ÖZGEÇMİŞ

