



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REKOMBİNANT İNSAN MYELOİD TÜREVLİ
BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN *İN VİTRO* PARKİNSON
MODELİNDEKİ TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**

TANSU GÖVER

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL– 2021

BEYAN

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

TANSU GÖVER

TEŞEKKÜR

Öncelikle hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ'a her zaman destek olduğu, sabırla yol gösterdiği ve bu tezi yazabilmeme olanak sağladığı için en içten teşekkürlerimi ifade etmek istiyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tez çalışmasının yürütülmesinde kıymetli bilgi birikimini ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Dr. Öğr. Üye. BERRAK ÇAĞLAYAN'a teşekkür ve saygılarımı sunarım. Laboratuvarında bana öğrettiği her şey için ve bana karşı her zaman çok anlayışlı olduğu için ona teşekkürü bir borç bilirim. Her zaman yol gösteren ve yeni metotlar öğrenmemi sağlayan sayın hocalarım Dr. Öğr. Üye. AHMET BURAK ÇAĞLAYAN, Dr. Öğr. Üye. MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER ve Dr. Öğr. Üye. TAHA KELEŞTEMUR'a teşekkür ederim.

Bana öğrettiği pek çok şey için ve her zaman yanımda olduğu için sayın hocam AYSUN ÇAĞLAYAN'a çok teşekkür ederim. Laboratuvarında birlikte çalışmak belki de en çok onunla güzel...

Tez sürecimde desteklerini esirgemeyen, değerli laboratuvar üyelerine; Nilay ATEŞ, Elif SERTEL, İrem ÇULHA TAŞKIN, Serdar ALTUNAY, Mehmet Özgen ALTINTAŞ, Elif ÖZBAY, Zeynep BALÇIKANLI, Beril Gül HELVACI ve Cansu Sena YAT'a teşekkür ederim.

Canım arkadaşım, İlayda KAYA'ya her şey için teşekkür ederim.

Son olarak, bana her zaman destek olan babam TAHSİN GÖVER ve annem NURŞEN GÖVER'e minnettar olduğumu belirtmek isterim. Hayatımın gerçek kahramanları olan canım kardeşlerime; TAHA YASİN GÖVER ve AHMET SELÇUK GÖVER'e teşekkür ederim.

TANSU GÖVER

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLERİN VE TABLOLARIN LİSTESİ.....	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Parkinson Hastalığı.....	6
4.1.1. Parkinson Hastalığı Mekanizması	8
4.2. Parkinson Hastalığı Modelleri.....	11
4.2.1. Hücresel Modeller.....	12
4.2.2. Hayvan Modelleri	13
4.3. Parkinson Hastalığı Tedavi Yöntemleri	14
4.3.1. Levodopa	15
4.3.2. Dopamin Agonistleri.....	15
4.3.3. Diğer Tedavi Edici Yöntemler.....	15
4.3.4. Nörotrofik Faktörler.....	16
4.4. Myeloid Türevli Büyüme Faktörü (MYDGF).....	17
5. MATERYAL VE METOT.....	19
5.1. Kimyasallar	19
5.2. Hücre Kültürü.....	21

5.2.1. Hücre Sayımı	22
5.2.2. Hücre Ekimi	22
5.2.3. Hücre Canlılığı Testi.....	23
5.3. Plazmid Hazırlama	23
5.3.1.PZR ve PZR Ürününün Jelden Geri Kazanımı	23
5.3.2. Vektör Plazmidin ve PZR Ürününün Kesim Enzimleriyle Kesilmesi.....	25
5.3.3. Ligasyon, Kompetent Bakteri Hazırlanması ve Transformasyon.....	27
5.3.4. Koloni ve Plazmid Doğrulaması.....	29
5.4. Kromatografi.....	32
5.4.1. Afinite Kromatografisi.....	32
5.4.2. Jel Fitrasyon Kromatografisi	33
5.5. Western Blot.....	34
5.5.1. Hücreden Protein İzolasyonu.....	34
5.5.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü	35
5.5.4. Jelden PVDF Membrana Transfer ve Antikor Eklenmesi	36
5.5.5. Western Blot Görüntüleme	37
5.6. <i>In vitro</i> Parkinson Modeli ve MYDGF'nin Tedavi Edici Etkisi	38
5.7. İstatistiksel Analiz.....	39
6. BULGULAR.....	40
6.1. Uygun PZR Koşullarının Bulunması	40
6.1.1. Gradient PZR Sonucu	40
6.1.2. Uygun Polimeraz Enziminin Belirlenmesi	41
6.2. Plazmid Hazırlanması için Oluşturulan PZR Sonucu.....	42
6.3. Plazmid Doğrulaması Sonuçları	43
6.3.1. Koloni PZR Sonucu	43
6.3.2. Yeniden Kesim Enzimlerinin Kullanılması ile Yapılan Plazmid Doğrulama Sonucu	44
6.4. Transfeksiyon Doğrulaması için Yapılan Western Blot Sonucu	45
6.4.1. Western Blot Görüntüsü	45

6.4.2. Kullanılan Belirteç ile Birleştirilmiş Western Blot Sonucu.....	46
6.5. MYDGF Proteinin Saflaştırılması.....	47
6.5.1. Afinite Kromatografisi.....	47
6.5.1.1. Normal Besiyeri Kullanımında Elde Edilen Sonuç	47
6.5.1.2. Serum İçermeyen Besiyeri Kullanıldığında Elde Edilen Sonuç	49
6.5.2. Tampon Çözelti Değişimi.....	51
6.5.3. Boyut Dışlama (Jel Filtrasyon) Kromatografisi.....	52
6.6. MYDGF Protein Üretiminin Doğrulanması.....	55
6.6.1. Protein Örneklerindeki MYDGF Varlığının Gösterilmesi	55
6.6.2. SEC sonrası MYDGF Varlığının Gösterilmesi	56
6.7. <i>In vitro</i> Parkinson Modeli ve MYDGF'nin Tedavi Edici Etkisi.....	57
6.7.1. Kullanılan 6-OHDA Dozunun Belirlenmesi.....	57
6.7.2. 50 µM 6-OHDA ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Parkinson Modelinde MYDGF etkisi.....	59
6.7.3. 100 µM 6-OHDA ile Oluşturulan <i>in vitro</i> Parkinson Modelinde MYDGF etkisi.....	61
7. TARTIŞMA.....	63
8. SONUÇ	71
9. KAYNAKLAR	72
10. ÖZGEÇMİŞ	92

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

°C	Santigrat Derece
6-OHDA	6-Hidroksidopamin
AAV	Adeno- İlişkili Virüs
ALP	Otofaji-Lizozom Yolağı
ARTN	Artemin
BMC	Otolog Kemik İliğı Hücrelerinin
bp	Baz Çifti
C19orf10	Kromozom 19 Açık Okuma Çerçevesi 10
C ₃ H ₄ N ₂	İmidazol
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CBS	Kortikobazal Sendrom
CDNF	Serebral Dopaminerjik Nörotrofik Faktör
cm	Santimetre
CO ²	Karbondioksit
COMT	Katekol-O-Metiltransferaz
DA	Dopamin
DAT	Dopamin Taşıyıcısı
DBS	Derin Beyin Uyarımı Yöntemi
ddH ₂ O	Çift Distile Su (Otoklanlanmış)

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
dNTP	Deoksiribonükleotit
dk	Dakika
ER	Endoplazmik Retikulum
GCase	Glukoserebrosidaz
GDF	Büyüme/ Farklılaşma Faktörü
GDNF	Glial Hücre Hattı Kaynaklı Nörotrofik Faktör
His	Histidin
İPH	İdiyopatik Parkinson Hastalığı
iPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
kb	Kilobaz
KOMT	Katekol-O-Metiltransferaz
L-DOPA	Levodopa ya da 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin)
LB	Lewy Cisimcikleri
LCD	Lewy Cisimcikli Demans
LV	Lentivirüs
MANF	Mezensefalik Astrosit Kaynaklı Nörotrofik Faktör
MAO	Monoamin Oksidaz
MAO-B	Monoamino-Oksidaz-B
MI	Miyokard Enfarktüsü
ml	Mililitre

mM	Milimolar
MPP+	1-metil -4 -fenilpiridinyum
MPTP	1-metil -4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSA	Multisistem Atrofi
MYDGF	Myeloid Türevli Büyüme Faktörü
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ HPO ₄	Sodyum Fosfat
NRTN	Neurturin
NTF	Neurotrophic Factors
NTF	Nörotrofik Faktörler
PD	Parkinson's Disease
PH	Parkinson Hastalığı
PSP	Progresif Supranükleer Felç
PSPN	Persephin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Revolutions Per Minute (Dakikada Devir Sayısı)
RrF	Retrorubral Alan
SN	Substansiya Nigra
sn	Saniye
SNc	Substansiya Nigra Pars Kompakta
SNpc	Substansiya Nigra Pars Kompakta

SNr Substansiya Nigra Pars Retikula

TH Tirozin Hidroksilaz

UPR Katlanmamış Protein Mekanizması

UPS Ubikitin-Proteozom Yolağı

VTA Ventral Tegmental Alan

xg Relative Centrifugal Force (RCF)

α -syn α -sinüklein (Alfa-sinüklein)

μ g Mikrogram

μ M Mikromolar

μ m Mikrometre

ŞEKİLLERİN VE TABLOLARIN LİSTESİ

Şekil 3.1. MYDGF makale sayılarının yıllara göre dağılımı.....	5
Şekil 4.2.1. 6-OHDA yapısı ve etki mekanizması.....	13
Şekil 5.2.1. Hemositometrenin (kan sayma lamı) mikroskop altındaki görüntüsü.....	22
Şekil 5.3.2. Kullanılan vektör plazmid pcDNA3.1(+)’ nin haritası.....	26
Şekil 5.3.3. NEBioCalculator® programının gösterimi.....	28
Şekil 5.3.5. Transfeksiyon işleminin gerçekleştirilmesi.....	31
Şekil 5.4. Kromatografi işlemi.....	32
Şekil 5.6. Deney dizaynı.....	38
Şekil 6.1.1. Histidin etiketli C19 geninin gradient PCR sonucu.....	40
Şekil 6.1.2. Farklı polimeraz enzimlerinden elde edilen PZR sonucu	41
Şekil 6.2. Plazmid hazırlanması için uygulanan PZR sonucu.....	42
Şekil 6.3.1. Koloni PZR sonucu.....	43
Şekil 6.3.2. Yeniden kesim enzimlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuç.....	44
Şekil 6.4.1. Transfeksiyon sonrası yapılan Western Blot sonucu.....	45
Şekil 6.4.2. Transfeksiyon sonrası belirteç içeren Western Blot sonucu.....	46
Şekil 6.5.1.1. Normal besiyerinin saflaştırılması.....	47
Şekil 6.5.1.2. Serumsuz besiyerinin saflaştırılması.....	49
Şekil 6.5.2. Elde edilen fraksiyonlardan iyonların arındırılması.....	51
Şekil 6.5.3.1. Boyut dışlama kromatografisi (<i>size exclusion chromatography, SEC</i>) sonuçları.....	52
Şekil 6.5.3.2. Boyut dışlama kromatografisi (<i>size exclusion chromatography, SEC</i>) sonuçlarının karşılaştırılması.....	54
Şekil 6.6.1. Histrap kolon önce ve sonrası SDS-PAGE gösterimi.....	55
Şekil 6.6.2. Boyut dışlama kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonların Western Blot sonucu.....	56

Şekil 6.7.1. Farklı dozlarda 6-OHDA uygulandığında hücre sayısının yüzdelik değişimi.....	57
Şekil 6.7.2. <i>In vitro</i> Parkinson modelinde (50 µM 6-OHDA ile oluşturulan) farklı konsantrasyonlarda MYDGF uygulandığında hücre canlılığı sonucu.....	59
Şekil 6.7.3. <i>In vitro</i> Parkinson modelinde (100 µM 6-OHDA ile oluşturulan) farklı konsantrasyonlarda MYDGF uygulandığında hücre canlılığı sonucu.....	61
Tablo 1. C terminali histidin aminoasidi ile işaretli primerler.....	23
Tablo 2. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	24
Tablo 3. PZR koşulları.....	24
Tablo 4. Kullanılan kesim enzimleri.....	25
Tablo 5. Kesim enzimleriyle oluşturulan reaksiyon.....	26
Tablo 6. Ligasyon reaksiyonu.....	27
Tablo 7. Koloni PZR reaksiyonu.....	30
Tablo 8. Transfeksiyon karışımı.....	31

1. ÖZET

REKOMBİNANT İNSAN MYELOİD TÜREVLİ BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN *İN VİTRO* PARKİNSON MODELİNDEKİ TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ

Parkinson hastalığı (PH) en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinsonun etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin hastalığa etki ettiği ortaya konulmuştur. PH temel motor semptomları tremor, rijidite, bradikinezi ve duruş bozukluğudur. Patolojik belirtileri ise substansiya nigra pars kompaktada (SNpc'de) bulunan dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimcikleri ile karakterize edilmektedir. Lewy cisimciklerinin büyük bir kısmını yanlış katlanma sonucu biriken alfa-sinüklein (α -syn) oluşturmaktadır. Günümüzde geçerli olan tedavi yöntemleri yan etkileri olmasına rağmen PH sonrası ortaya çıkan motor semptomların kontrol edilmesini sağlayabilmektedir. Fakat hiçbir tedavi yöntemi hastalığın ilerleyici seyrini değiştirememektedir. Nöronal sağkalımda görev alan nörotrofik faktörler (NTF) PH gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilir yeni ajanlar olarak görülmektedirler. Son yıllarda varlığı gösterilen myeloid türevli büyüme faktörünün (MYDGF) rejeneratif etkilerinin olmasından dolayı PH tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmüş ve bu tez çalışması yapılmıştır. Rekombinant insan MYDGF proteini afinite ve jel kromatografi yöntemleri kullanılarak üretilmiş ve 6-OHDA (6-hidroksidopamin) kullanılarak oluşturulmuş *in vitro* PH modelindeki tedavi edici etkisi araştırılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine 6-OHDA doz denemesi uygulaması yapıldıktan sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde ($p<0,01$) hücre sayısını azaltan dozlardan 50 μ M ve 100 μ M kullanılarak *in vitro* PH modeli oluşturulmuştur. 50 μ M 6-OHDA ile oluşturulan modelde 50 ng/ml ve 100 ng/ml MYDGF uygulanan gruptaki hücre sayısında 0 ng/ml MYDGF uygulanan gruba kıyasla anlamlı ($p<0,05$) bir artış görülmüştür. 100 μ M 6-OHDA ile oluşturulan modelde ise yine 0 ng/ml MYDGF uygulanan gruba kıyaslandığında 50 ng/ml ve 100 ng/ml MYDGF uygulaması sonrası hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bir artış 0 ng/ml MYDGF uygulanan gruba kıyaslandığında gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak MYDGF'nin PH tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Afinite Kromatografisi, Boyut Dışlama Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi, MYDGF, Parkinson Hastalığı

2.ABSTRACT

THE TREATMENT EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN MYELOID DERIVED GROWTH FACTOR ON PARKINSON'S DISEASE IN VITRO MODEL

Parkinson disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. Nevertheless the etiology of the disease is not well understood, the contribution of various genetic and environmental factors have been found previously. Tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability are the cardinal motor symptoms of Parkinson's disease. The pathological hallmarks of PD are characterized by the loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNpc) and Lewy bodies (LB). Accumulation and misfolding of alpha-synuclein (α -syn) compose the majority of Lewy bodies. Although, currently available treatment methods have side effects, they are able to control and reduce the severity of motor symptoms. However none of these methods can modify the progressive feature of the disease. Neurotrophic factors (NTF), involved in neuronal survival, are considered as new treatment agents for neurodegenerative disorders such as PD. The idea behind this thesis came from the regenerative effects myeloid derived growth factor (MYDGF), which is presence has been found in recent years, and the potential use in PD treatment. Recombinant human MYDGF protein produced by using affinity and gel filtration chromatography methods and the treatment effect of MYDGF was investigated on 6-OHDA (6-hydroxydopamine) induced *in vitro* PD model. This model was generated using 50 μ M ve 100 μ M from doses that significantly ($p < 0.01$) reduced the cell viability compared to control group. As a result of 50 ng/ml and 100 ng/ml MYDGF treatments, both 50 μ M 6-OHDA and 100 μ M 6-OHDA induced PD model groups showed a significant (respectively $p < 0.05$ and $p < 0.01$) increase in the number of cells compared to the group of 0 ng/ml MYDGF. Based on these results, it was thought that MYDGF could be a potential treatment agent in PD.

Keywords: Affinity Chromatography, Gel Filtration Chromatography, MYDGF, Parkinson's Disease, Size Exclusion Chromatography

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH) dünyada yaklaşık 10 milyon insanda görülen ve çoğunlukla 60 yaş ve üstünü etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır (Ascherio ve Schwarzschild,2016). Genç başlangıçlı Parkinson hastalığı, 20 yaşından 40 yaşına kadar olan kişileri kapsamaktadır. Genç başlangıçlı Parkinson hastalığına sahip olan insanlar, PH'larının %5'ini oluşturmaktadır (M.T. Hayes, 2019). Karmaşık, çok faktörlü ve ilerleyici olan Parkinson hastalığının erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan 1,5 kat daha fazladır (Amro ve ark., 2018). James Parkinson'un ilk olarak titrek felç adıyla bu hastalığı tanımlamasının üzerinden yaklaşık 200 yıl geçmiş olmasına rağmen patogenezinin mekanizmaları tamamen açıklanamamıştır (Rodríguez-Violente ve ark., 2017). Tremor, rijidite ve bradikinezi başlıca motor belirtileri olmaktadır (Mcgregor ve Nelson, 2019). Farklı potansiyel patojenik risk faktörleri (toksinler, ilaçlar, pestisitler, beyin mikrotravması, fokal serebrovasküler hasar ve genomik bozukluklar) PH ile ilişkilendirilmiştir (Pushmann, 2017). Genomik (SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, LRRK2, BST1, MAPT genlerindeki mutasyonlar), epigenetik ve çevresel faktörler, ubiquitin- proteazom sistemindeki anormallikler, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve oksidatif strese bağlı olarak bazı önemli proteinlerin yapısal bozukluklarına ve birikimine yol açmaktadır (Mastrangelo, 2017). Nöropatolojik işaretleri ise substansiya nigra pars compacta dopaminerjik nöronlarının ilerleyici bir şekilde nörodejenerasyonu, dopamin eksikliği ve çoğunluğunu α -sinüklein (α -syn)'in oluşturduğu Lewy cisimciklerinin oluşumudur (Schapira ve ark., 2017).

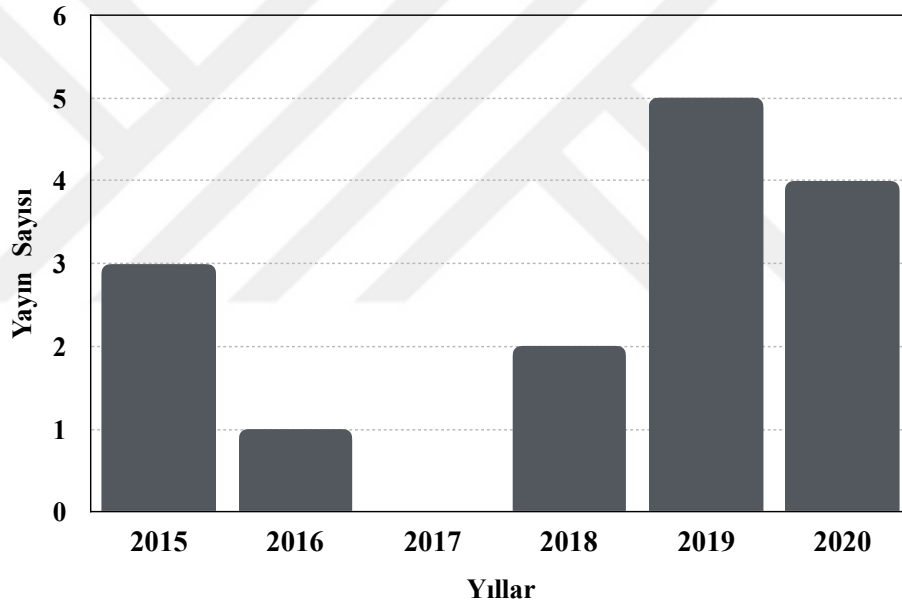
Günümüzde Parkinson hastalığı kesin tedavisi mümkün olmamakla birlikte uygulanmakta olan tedavi yöntemleri yalnızca dopamin eksikliğini gidererek motor semptomları kontrol altında tutmayı hedeflemektedir (O'Connor ve Boulis, 2015). Dolayısıyla mevcut olan en iyi tedavi dopamin prekürsörü L-3,4 dihidroksifenilalanin (L-DOPA) kullanılarak uygulanmaktadır (Suppa ve ark., 2017). PH tedavisinde, 1960 yıllarında ilk olarak önerilmiş olan L-DOPA (levodopa) motor yan etkiler oluşturarak hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir (Hornykiewicz, 2017). Derin beyin uyarımı yöntemi (DBS), L-DOPA kaynaklı diskinezinin azaltılmasına yardımcı olurken PH kaynaklı diğer motor yan etkilerin ve kognitif bozuklukların düzeltilmesinde etkili

değildir (Houghton ve ark., 2019). Diğer semptomatik tedavilerde dopamin agonistleri (amandatin, apomorfın, bromokriptin, kabergolin, lisurid, pergolid, pramipeksol, ropinirol ve rotigotin), monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri (selegilin, rasajilin) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) inhibitörleri (entakapon, tolkapon) özellikle levodopa ile birlikte kullanılmaktadır (Gazawood ve ark., 2013). Küçük yapıya sahip, kendilerine özgü reseptörlerine bağlanan, salgılanan ve nöronların hayatta kalmaları, gelişimlerini destekleyen proteinler olan nörotrofik faktörlerin (NTF) PH tedavisinde yeni bir yöntem olarak geliştirilebileceğine yönelik araştırmalar bulunmaktadır (N. P.Rocha ve ark., 2018). Mevcut tedavi yöntemlerinin sadece semptomatik iyileşme sağlamasından kaynaklanan sorunu, NTF'lerin PH'nin ilerleyiciliğini durdurabilmesi potansiyeline sahip olması ile yeni bir tedavi yöntemi olarak araştırılmasının gerekliliğini gösterilmiştir (Voutilainen ve ark., 2015).

Myeloid türevli büyüme faktörü (MYDGF), kromozom 19 açık okuma çerçevesi 10 (C19orf10) tarafından kodlanan kardiyak miyositlerin hayatta kalmasını ve anjiyogenezi sağlayan yeni bir protein olarak bulunmuş ve adlandırılmıştır. Kemik iliği türevli monosit ve makrofajlar tarafından üretilen ve salgılanan bir protein olduğu da gösterilen MYDGF'nin miyokard enfarktüsü (MI) sonrası koruyucu ve rejeneratif etkiye sahip olan bir protein olduğu da gösterilerek MYDGF'nin biyolojik fonksiyonunu ortaya koyan ilk çalışma yapılmıştır (Korf-Klingebiel ve ark., 2015).

Varlığı ve rejeneratif etkileri son zamanlarda ortaya konan MYDGF'nin (**Şekil 3.1**) protein temelli tedavide bir ajan olarak kullanılabilmesi ve faydalı sonuçlar ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir. PH için oluşan klinik komplikasyonları azaltabilen, hastalığın ilerlemesini durdurabilme potansiyeline sahip, dopaminerjik nöronların korunmasını ve erken nörodejenerasyonun azaltılmasını hedefleyen yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması gerekmektedir. MYDGF'nin nörotrofik faktörlere benzer etkilerinin olması nedeniyle Parkinson hastalığında yeni bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bu amaçla rekombinant insan MYDGF proteininin üretilmesi ve saflaştırılması hedeflenmiştir. Bunun yanında bu tez çalışması kapsamında *in vitro* Parkinson hastalığı modeli kullanılarak MYDGF'nin tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Rekombinant insan MYDGF proteininin üretilmesi amacıyla uygun plazmid hazırlanması, transfeksiyon yöntemi uygulandıktan sonra sıvı besi yerine salgılanan proteinlere afinite kromatografisi ile ön saflaştırma yapılması ve sonra jel filtrasyon kromatografisi ile üretilen proteinlerin saflaştırılması hedeflenmiştir. Saflaştırılan MYDGF'nin Western Blot yöntemiyle doğrulaması yapıldıktan sonra *in vitro* Parkinson modelinin 6-OHDA kullanılarak SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerinde oluşturulması amaçlanmıştır. Elde edilen saflaştırılmış rekombinant insan MYDGF proteini farklı konsantrasyonda bu hücrelere verilerek rekombinant insan myeloid türevli büyüme faktörünün *in vitro* Parkinson modelindeki tedavi edici etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.



Şekil 3.1. MYDGF makale sayılarının yıllara göre dağılımı. Yayın sayıları, çevrimiçi veri tabanı PubMed üzerindeki MYDGF anahtar kelimesini içeren başlık ve özetler araştırılarak elde edilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve 65 yaş üstü insanların %2-3'ünü bu hastalığa sahip olan kişiler oluşturmaktadır (Reich, 2018; Poewe ve ark., 2017). Bu hastalık ilk olarak James Parkinson tarafından 1817 yılında 'titrek felç' olarak tanımlanmıştır (Tysnes & Storstein, 2017). Parkinson hastalığı motor ve motor olmayan bulgular ile karakterize edilmiştir (Schneider ve ark., 2017). Hastalığın tanımlanmasından bu yana bradikinezi (hareketlerde yavaşlama), rijidite (kol, bacak veya gövdede katılık) ve tremor (titreme) belirti olarak kabul gören primer motor semptomlar olarak kabul edilmektedir. Postural instabilite yani denge ile ilgili yaşanan problemler ise dördüncü primer motor belirti olarak bu hastalığın tanısında kullanılmaktadır (Gelb ve ark., 1999). Parkinson hastalığı, tamamiyle motor bir rahatsızlık olarak tanımlanmasına rağmen hastalığın motor olmayan belirtileri nöropsikiyatrik, duysal, otonom ve uyku ile ilişkili olacak şekilde geniş başlıklar altında sınıflandırılmıştır (Reich, 2018).

Motor semptomların başlıca nedeni, beyin sapının bir bölgesi olan substansiya nigra (SN) alanındaki dopaminerjik nöronların dejenerasyonudur. Diğer nörotransmitter sistemleri (glutamaterjik, kolinerjik, serotonerjik, adrenarjik gibi) de motor bulgulara rastlanmasında rol oynamaktadır (Antony ve ark., 2013). Günümüzde Parkinson hastalığı için kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan yöntemler ise sadece motor ve motor olmayan bulguların rahatlatılmasında kullanılmaktadır (M. W. Hayes ve ark., 2019).

4.1. Parkinson Hastalığı

Parkinsonizm bradikinezi, rijidite, dinlenme durumundaki tremor ve denge instabilitesi ile belirtilmiş klinik sendromun genel adıdır (Keener ve Bordelon, 2016). İdiyopatik Parkinson hastalığı (İPH) bu sendromun en yaygın olanıdır (Braak ve ark., 2003). Multisistem atrofi (MSA), Lewy cisimcikli demans (LCD), progresif supranükleer felç (PSP), kortikobazal sendrom (CBS), kalıtsal hastalıklarla birlikte ortaya çıkan parkinsonizm ve sekonder parkinsonizm bu sendromun diğer çeşitlerini oluşturmaktadır (Trojanowski ve Revesz, 2007; Brigo ve ark., 2014; Schustrin ve Chandra, 2017). Sendromun çeşitlilik göstermesi dolayısıyla temel klinik bulgulara

göre Parkinson hastalığı ve diğer parkinsonizm sendromu çeşitleri ayırt edilebilmektedir (Jellinger, 2019). Temel klinik bulgular hastalığın tanı tedavi ve prognozu için önemli olmaktadır (Lin ve ark., 2019). İdiyopatik Parkinson hastalığına dopamin üreten sinir hücrelerinin tahribatı neden olmaktadır. Buna bağlı olarak oluşan dopamin eksikliğinin giderilmesine yönelik tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Levin ve ark., 2016).

Nörotransmitterler sinir sisteminin hücreler arası iletişimi sağlamak için kullandığı kimyasal maddelerdir (H. Wang ve ark., 2018). Dopamin (DA), pek çok psikiyatrik ve nörolojik hastalığın temelinde rol oynaması nedeniyle beyin araştırmalarında en çok çalışılmış nörotransmitterlerdendir (Sharples ve ark., 2014). Merkezi sinir sisteminin başlıca elemanı olan beyin üç kısma ayrılabilir; ön beyin, orta beyin ve arka beyin. Dopaminin memeli merkezi sinir sistemindeki temel kaynağını beyin sapının kısımlarından biri olan orta beyinde (mezensefalon) bulunan dopaminerjik (DA) nöronlar oluşturmaktadır (Chinta ve Andersen, 2005). Mezensefalon beyindeki dopaminerjik nöronların %90'ını bulundurmaktadır (Arenas ve ark., 2015). DA nöronlar özellikle orta beyindeki üç çekirdekte; retrorubral alan (RrF, ya da A8), substansiya nigra pars kompakta (SNc, ya da A9) ve ventral tegmental alanda (VTA, ya da A10) bulunur (Luo ve Huang, 2016). Bazal gangliyon ise beyin korteks bölgesiyle birlikte motor, bilişsel ve limbik devreleri kapsayan planlanmış ve motive edilmiş davranışların ortaya çıkmasında görev almaktadır (Sarkar ve ark., 2016). Bazal gangliyon; kaudat nükleus, putamen, globus pallidus, subtalamik nükleus ve substansiya nigra olarak adlandırılmış 5 çift çekirdekten oluşur (Prensa ve ark., 2009). Substansiya nigra (SN) mezensefalonun küçük bir bölgesinde yer almakta ve motor hareketlerin kontrol ve seçilmesinde görevli olan bazal ganglion çekirdeklerinden birisini oluşturmaktadır (Jagadeesan ve ark., 2017). SN; substansiya nigra pars kompakta (SNc) ve substansiya nigra pars retikula (SNr) olmak üzere iki bölgeden oluşmaktadır (Albin ve ark., 1989; Y. Zhang ve ark., 2017). Substansiya nigra pars kompakta nöromelanin üreten katekolaminerjik nöronlardan oluşan ve bazal gangliyon dopaminerjik projeksiyonları sağlayan beyin bölgesidir (Langley et al., 2020). Striatum bazal gangliyonun korteks ve talamus ile projeksiyon yapan alanıdır (Misgeld, 2004). Nigrostriatal dopaminerjik sistem striatum ve substansiya nigradan oluşmaktadır (Gelders ve ark., 2018).

SN dopaminerjik nöronlarla striatumu inerve etmektedir ve bazal gangliyonun organizasyonunda önemli bir role sahiptir (Vivekanantham ve ark., 2015). Öğrenme, işler bellek ve motor kontrol gibi pek çok davranışın oluşturulmasında görevlidirler (Friedman ve Galazka-Friedman, 2012). PH motor fonksiyonlardaki bozukluklar ve SNC' deki nöronal dejenerasyon ile karakterize olmaktadır (Tan ve ark., 2020). Parkinson hastalığı veya idiyopatik Parkinson hastalığı adıyla bilinen en yaygın parkinsonizm sendromu, SNC'de bulunan dopaminerjik nöronların hasarı ve kaybı ile ilişkilendirilmiş ilerleyici nörodejeneratif hastalıktır (**Şekil 4.3**) (Kim ve ark., 2018). Yavaşlayan hareket, titreyen uzuvlar, kas sertliği postural bozukluklar gibi klinik bulguların dışında alfa-sinüklein protein kümelerinden oluşan Lewy cisimcikleri PH'nın nöropatolojik belirteci olarak kullanılmaktadır (Wakabayashi ve ark., 2013).

4.1.1. Parkinson Hastalığı Mekanizması

Lewy cisimcikleri (LB) ilk olarak 1912 yılında Friedrich Lewy tarafından Parkinson hastalarında bulunmuştur (Spillantini ve ark., 1998). Parkinson hastalığında Lewy cisimcikleri birincil olarak substansiya nigra ve beyin sapı çekirdeklerinde bulunmaktadır (Dorsey et al., 2018). Bir teoriye göre Lewy cisimciklerinin oluşumu orijinal hücre iskeleti proteinlerinin değişime uğraması sonucu olağandışı nörofilament transportundan kaynaklanmaktadır (Mayo ve Bordelon, 2014). Lewy cisimciklerini 90'dan fazla proteinin yapısını oluşturmasına karşın en büyük çoğunluğu fibriler yapıdaki α -sinüklein (α -syn) oligomerleri oluşturmaktadır (Wakabayashi ve ark., 2007). 1988 yılında ilk olarak tanımlanan intraselüler bir protein olan α -sinükleinin akümüle olması ve α -sinükleinin yanlış katlanması nedeniyle Lewy cisimciklerine bağlı hastalıklar meydana gelmektedir (Luk ve ark., 2012). Bu proteinin 140 aminoasitten oluşan küçük bir yapısı bulunmaktadır ve *SNCA* geninin bir ürünü olarak oluşmaktadır (Villar-Piqué et al., 2016). Lewy cisimciklerinin meydana gelmesinde pek çok farklı mekanizma etkili olmaktadır. SN'de bulunan dopaminerjik nöron kaybı, endoplazmik retikulum (ER) stres kaynaklı katlanmamış proteinler ve nöroinflamasyon Lewy cisimciklerinin oluşmasında en önemli sebeplerdendir (Cabral-Miranda ve Hetz, 2018).

SNCA geni α -sinükleini kodlar ve Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiş ilk gendir (Lau ve ark., 2020). A53T ise bu genin tanımlanmış ilk patojenik

mutasyonudur. Son zamanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre α -syn *SNCA* genine ait olan tüm mutasyonlar ve gen duplikasyonları ile gen tripkasyonları Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Pavlou ve Outeiro, n.d.; Spillantini ve Goedert, 2018). Bu mutasyon ve diğer tüm patojenik mutasyonlarda α -syn'in yanlış katlanma ve agregat oluşturma eğilimi yabanıl tip *SNCA* geninin ürünü olan α -syn'den daha fazladır (Puschmann, 2017). Bu gende bulunan polimorfizmlerin ise Parkinson hastalığının gelişmesinde artan risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Lashuel ve ark., 2013). Hastalığın mekanizması mitokondri fonksiyonundaki bozukluklar ile de ilişkilendirilir (Simon ve ark., 2020). Serin/treonin kinazı olan PINK1, hasarlı mitokondrilerin işaretlenmesinde görev almakta ve E3 ubiquitin ligazı olan Parkin'in ortamda bulunmasına yardımcı olmaktadır (P. L. Zhang ve ark., 2018). DJ-1 mitokondri kalsiyum akısının düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Hücreyi, dopamin toksisitesi ve dopaminerjik nöronların *pacemaker* (önder odak) aktivitelerinden kaynaklanan oksidatif strese korur (Bandres-Ciga ve ark., 2020). Muhtemelen somatik kökenli olan mitokondriyal DNA mutasyonlarına PH'na sahip olan kişilerin SNpc'sında rastlandığına dair bulgular mevcuttur (Fahn, 2003). *GBA1* geninde bulunan ve yaygın olarak görülen mutasyonlar PH için şimdiye dek bilinen en önemli risk faktörüdür. *GBA1* glukoserebrosidaz (GCCase) enzimini kodlar (Weissbach ve ark., 2019). Lizozomal bir enzim olan bu enzimin görevi glikozilseramid metabolizmasında görev yapmaktır (Stojkowska ve ark., 2018). GBA'nın PH patogeneze katkısı oldukça karmaşıktır. Endoplazmik retikulum (ER) stresi, mitokondri fonksiyonunun bozukluğu ve α -syn akümüasyonu gibi farklı yollarla hastalığın seyri ve oluşumu üzerinde etkisi vardır (Ryan ve ark., 2019). LRP10 proteini trans-Golgi ağı, endozomlar ve hücre membranı arasında gidip gelmektedir (Y. Chen ve ark., 2019). Bu ağa katılan VPS35 gibi proteinler de önceden Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (E. T. Williams ve ark., 2017). SNpc'da bulunan dopaminerjik nöronların özellikle nörodejenere olmasının nedeni henüz netleştirilemiştir. Bu alandaki dopaminerjik nöronların otonom pacemaker olmaları ve kalsiyum homeostazının önemli bir yere sahip olması nedenleri üzerinde durulmaktadır (Jankovic, 2008).

Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin ER'de birikmesiyle, adaptif bir stres yolağı olan katlanmamış protein mekanizması (UPR) aktiflenmiş olur (Cai ve

ark., 2016). ER strese ait olan üç ayrı yolağın işaretlerine hem sporadik Parkinson hastalığına ait kişilerin postmortem dokularında hem de bu hastalığın hayvan modellerinde rastlanılmıştır (Mercado ve ark., 2016). Fakat UPR'ın Parkinson hastalığının ilerleyişindeki rolü ve dopaminerjik nöronların hayatta kalmasına nasıl etki ettiği net bir şekilde açıklanamamıştır (Fernandes ve ark., 2016). Pek çok nörotoksin temelli PH *in vivo* modelleri ile yapılan araştırmalarda UPR sisteminin aktive edildiği ve ATF6, XBP1 ve CHOP' un fonksiyonel olduğu gösterilmiştir (Sprenkle ve ark., 2017). ER stres, dopaminerjik nöronların hayatta kalması ve fizyolojisi üzerinde, dolayısıyla da hastalığa müdahale edilmesinde önemli bir role sahip olan ilginç bir hedeftir (Ganguly ve ark., 2018). ER stres cevabını düzenleyici moleküller Parkinson hastalığı için geliştirilecek olan ilaç için potansiyel aday olmaktadır (B. Wang ve ark., 2018).

Otofaji-lizozom yolağı (ALP) ve ubiquitin-proteozom yolağı (UPS) ökaryotlarda bulunan ana protein yıkım mekanizmalarıdır ve her iki yolağın da Parkinson hastalığında etkili olduğu düşünülmektedir (J. K. Williams ve ark., 2018). PH'dan etkilenmiş olan beyinlerde lizozom ve lizozomal belirteçlerin (LAMP1, cathepsin D ve heat-shock protein 73 gibi) az miktarda oluşu özellikle α -syn inklüzyonları oluşan nigral hücrelerde gösterilmiştir (Walden ve Muqit, 2017). Proteozomların enzimatik aktivitelerinde azalma ve yapısal proteozomal bozukluklar da Parkinson hastalığında bulunmaktadır (Pickrell ve Youle, 2015). Normalde ubiquitin ve proteozomlar yoluyla α -sinüklein yıkımı sağlanırken ubiquitin'in inhibisyonuna sebep olan nedenler de Lewy cisimciklerinin oluşmasına ve ona bağlı hastalıkların meydana gelmesinde etkili olmaktadır (Dauer ve Przedborski, 2003). Alfa-sinüklein patolojisinin proteozomal fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunabileceği yönünde olan çalışmalar da mevcuttur (Betarbet ve ark., 2005). Bu çalışmalardan bazılarında hücrel modellerde α -syn'in overeksprese edilmesiyle proteozomların aktivitesinde azalma ve nihayetinde de ubiquitin içeren inklüzyonlarının akümüle olduğu, dopamin salınımının ve hücrel dejenerasyonun azaldığı gösterilmiştir (Senkevich ve Gan-Or, 2020). Mutant LRRK2 geninin ise otofajiyi engellediği ve yavaş α -sinüklein yıkımına sebep olarak α -sinüklein akümülyasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Cherian ve Divya, 2020). ATP132A mutasyonları lizozomal fonksiyon bozukluklarını belirlerken, genç yaşta ortaya çıkan parkinsonizmlerin nedeni olabilmektedir.

İdiyopatik Parkinson hastalığında ise hayatta kalan dopaminerjik nöronlar tarafından miktarının arttırıldığı ve nöroprotektif etkisinin olduğu bilinmektedir (Weissbach ve ark., 2019). UPS fonksiyonundaki bozuklukların nörodejenerasyonun bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu ise hala tartışılmakta olan bir konudur (Sjödın ve ark., 2019). Dopaminin kendisi de α -sinükleine bağlanıp protofibriller ve sonucunda da Lewy cisimciklerini oluşturmaktadır (E. M. Rocha ve ark., 2018). Lewy cisimciklerinin Parkinson hastalığının seyri üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemesine rağmen nörotoksik oldukları düşünülmektedir (Shults, 2006). Ayrıca, yeni çalışmalara göre, mikrobiyomun da Parkinson hastalığı patogeneğinde etkili olduğu üzerine odaklanılmıştır. Dopamin sentezi ve metabolizması, immün sistem disregülasyonu ve inflamasyonu ve enteral mukoza geçirgenliğinde oluşan değişiklikler patogenetik mekanizmayı oluşturmaktadır (Sampson ve ark., 2016).

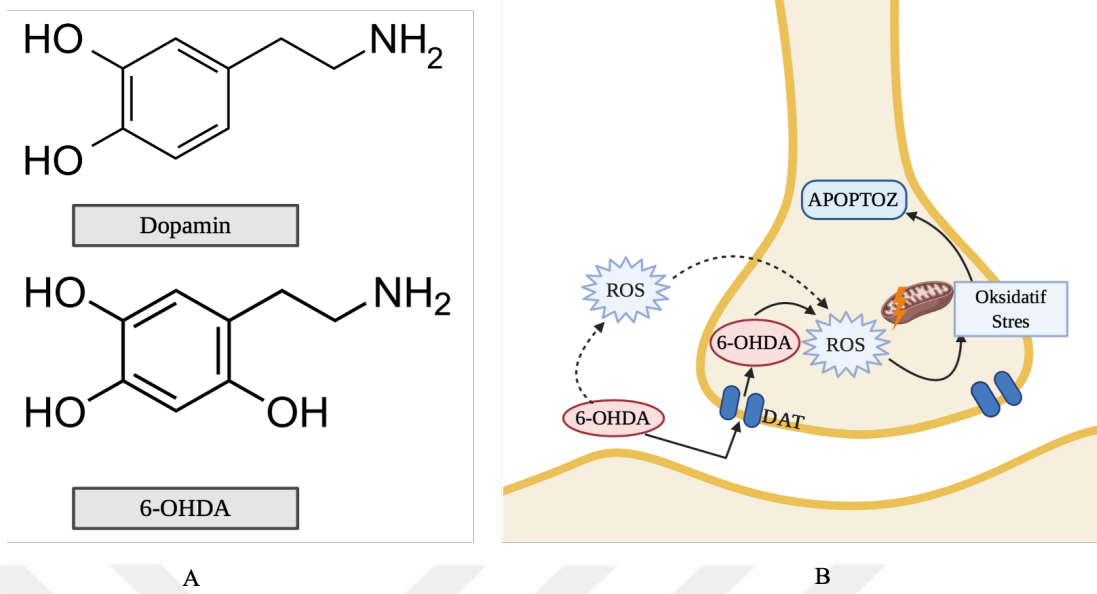
4.2. Parkinson Hastalığı Modelleri

Günümüzde tartışılmaz bilimsel gelişmelerin olmasına rağmen Parkinson hastalığı patogenezinin moleküler ve hücrel biyolojisinin tam olarak anlaşılması konusunda boşluklar bulunmaktadır (Johnson ve Bobrovskaya, 2015). İnsan hastalıklarına ait mevcut hücrel modeller ve hayvan modelleri araştırmacılara yeni tedavi stratejisi geliştirmek üzere olanak sağlamaktadır (Nagoshi, 2018). Her bir PH modeli hastalığın farklı bir semptom ve aşamasını göstermesine rağmen farklı PH modellerinin kullanımı, temel olarak araştırmalara yarar sağlamaktadır (Bakshi ve ark., 2019). Bu modeller içerisinde Parkinson hastalığının tüm fenotipik ve patolojik özelliklerini gösteren bir model bulunmamaktadır (Bezard ve Przedborski, 2011). Parkinson hastalığının spesifik etiyojisi heterojen ve tam olarak bilinmeyen olduğundan bazı vakalarda genetik faktörler bazılarında ise çevresel faktörler baskındır. Bu nedenlerle genetik temelli, toksin temelli olmak üzere ve çeşitli hayvanlar (*Drosophila melanogaster*, kemirgenler ve insan olmayan primatlar) kullanılarak farklı Parkinson modelleri geliştirilmiştir (Grandi ve ark., 2018). Bir araştırma yapılırken çalışmanın amacına uygun olan modelin güçlü yanları ve sınırlayıcı faktörleri göz önünde bulundurularak PH modeli seçimi yapılmaktadır (Polinski ve ark., 2018).

4.2.1. Hücresel Modeller

İnsan ve fare nöronal hücre hatlarından birçoğu *in vitro* PH modelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültür hücrelerinin PH'nın model hayvanlarında kullanılabilmesi gibi pek çok avantajı da bulunmaktadır (Lázaro ve ark., 2017). Sekonder hücre hatları hayvan modelleri ile kıyaslandıklarında patolojiyi daha çabuk geliştirmeleri, daha az maliyet gerektirmeleri ve deney hayvanı kullanımı gerektirmedikleri için tercih edilmektedirler. Hücresel modellerde genetik ve farmakolojik manipülasyonlar daha kolay ve güvenilirdir (Slanzi ve ark., 2020; Lopes ve ark., 2017). SH-SY5Y, PC12 ve Lund insan mezensefalik hücreleri bu hücre hatlarının başında gelmektedir (Falkenburger ve ark., 2016). Dopaminerjik primer hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) de sıklıkla kullanılmaktadır (Delenclos ve ark., 2019).

SH-SY5Y nöroblastoma ve PC12 feokromositoma hücre hatları PH'dan etkilenen nöronal popülasyon ile pek çok benzerlik bulundurmaktadır ve nörodejeneratif mekanizmaların aydınlatılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Salari ve Bagheri, 2019). Özellikle retinoik asit ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörler etkisiyle morfolojilerinde ve fonksiyonlarında görülen değişiklikler ile nöron benzeri uzantılar oluşturur ve katekolamin üretimi ve salınımı gösterirler (Cheung ve ark., 2009). Ayrıca Lund insan mezensefalik hücreleri de eskiden beri kullanılan insan dopaminerjik nöron modeli hücreleridir (Harischandra ve ark., 2020). Bu hücre hattı α -sinüklein toksisitesine bağlı nörodejenerasyon çalışmaları için tercih edilmektedirler (X. M. Zhang ve ark., 2014). Mezensefalon kaynaklı primer hücrelerden daha kolay ve fazla miktarda elde edilebilmektedirler (Shulman ve ark., 2011). Yabanıl tip veya mutant α -syn overekspresyonunun SH-SY5Y ve PC12 hücrelerinin hayatta kalmasını etkilediği gösterilmiştir. Ekstraselüler ortama PH beyin lizatlarından elde edilen α -syn eklenmesi SH-SY5Y hücrelerinde α -syn agregatlarının oluşmasına neden olmuştur (Ko ve Bezdard, 2017).



Şekil 4.2.1. 6-OHDA yapısı ve etki mekanizması. Dopamin ve 6-OHDA kimyasal yapısı birbirine benzemektedir (A). 6-OHDA hücre içine dopamin taşıyıcıları (DAT) ile alındıktan sonra reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna bağlı olarak oksidatif strese neden olmaktadır. 6-OHDA hücre dışında da ROS oluşumuna neden olarak oksidatif strese ve sonrasında programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) neden olmaktadır (B).

SH-SY5Y hücreleri 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile birlikte *in vitro* Parkinson modeli olarak kullanılmaktadır. 6-OHDA Parkinson hastalığının deneysel modellerinde en çok kullanılan nörotoksindir (Avagliano ve ark., 2016). Bu kimyasalın yapısı dopamin ile büyük benzerlik göstermesinden dolayı dopamin taşıyıcısına (DAT) karşı da yüksek afinite göstermektedir. Bu nedenle seçici olarak dopaminerjik/katekoleminerjik nöronları yok etmektedir (Şekil 4.2.1). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, PH *in vitro* modelinde dopaminerjik nöron benzeri hücre hatlarının kullanışlılığı açık bir şekilde görülmektedir (Gu ve ark., 2016).

4.2.2. Hayvan Modelleri

Pek çok farklı memeli hayvanın (kedi ve köpek gibi) PH modellemesinde kullanılabilmesine karşın en çok maymunlar, sıçanlar ve fareler tercih edilmektedir (Blesa ve ark., 2018). Nigrostriatal dopaminerjik liflerde toksin kaynaklı lezyonların oluşturulmasıyla elde edilen, PH erken evrelerinin modellenmesi 1960 yılından bu yana kullanılmaktadır (Zeng ve ark., 2018). En çok bilinen modeller MPTP (1-metil-4-

fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin), 6-OHDA ve rotenon kullanılması ile oluşturulmaktadır (Kin ve ark., 2019).

Hayvan modellerinde 6-OHDA intranigral olarak uygulandığında seçici olarak SN ve striatumdaki tirozin hidroksilaz (TH) immünoreaktif nöronların ölümüne yol açar (Simola ve Morelli, 2007). Dopaminin kısmi azalmasına neden olan bu kimyasal erken evre PH modeli oluşturulmasında kullanılmaktadır (Lima ve ark., 2017). Hem motor hem de motor olmayan belirtiler bu molekül ile oluşturulabilmektedir (Hadadianpour ve ark., 2017). MPTP ise kan-beyin bariyerini geçebilir ve uygulandıktan sonra nigral ve striatal astrositler tarafından toksik olan MPP+ katyon formuna dönüştürülür ve burada bulunan dopaminerjik nöronlar tarafından DA taşıyıcısı (DAT) vasıtasıyla hücreye alınmaktadır (Shimohama ve ark., 2003). Dopaminerjik nöronlarda MPP+ akümüle edilmesiyle oksidatif stres artar ve böylece nörotoksik etki göstermiş olur (Xicoy ve ark., 2017). Rotenon ise doğada bulunan bir pestisitir ve hayvanlarda kullanıldığında PH'nın anatomik ve davranışsal nöropatolojik özelliklerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Le ve ark., 2014). Rezerpin, haloperidol ve tetrodotoksin geridönüşümsüz dopamin azalmasını taklit ederek PH modellemesinde kullanılan diğer toksinlerdir (Doty, 2012). Bazı modeller ise genetik modeller olarak ayrılmaktadır ve bu modeller en çok bilinen mutasyonlardan temel alınarak hazırlanmaktadır (Trigo-Damas ve ark., 2018). Alfa-syn, Parkin, PINK1, DJ-1 genlerini etkileyen genetik PH modelleri bulunmaktadır. Ayrıca adeno- ilişkili virüs (AAV) tekniği kullanılarak da yüksek miktarda α -syn'in hücrede bulundurulması sağlanarak genetik temelli PH hayvan modelleri de oluşturulmaktadır (Gubellini ve Kachidian, 2015).

4.3. Parkinson Hastalığı Tedavi Yöntemleri

Parkinson hastalığının mevcut tedavi yöntemleri sadece semptomların iyileştirilmesine yöneliktir. Günümüzde hastalığın seyrini değiştiren bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte, mevcut tedavi yöntemleri dopaminerjik yolağa odaklanacak şekilde geliştirilmiştir (Tarakad ve Jankovic, 2017).

4.3.1. Levodopa

Levodopa (L-DOPA ya da 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin) PH motor semptomlarının tedavi edilmesinde kullanılan en etkili ilaçtır (Lewitt, 2015). Levodopa kan-beyin bariyerini geçebilen bir yapıya sahiptir ve SNpc'da geriye kalan dopaminerjik nöronlar tarafından dopamine çevrilmektedir (Axelsen ve Woldbye, 2018). Mide bulantısı, hipotansiyon, uyku hali, halüsinasyon ve dürtü kontrol bozuklukları gibi yan etkilerinin de bulunmasına karşın distoni, diskinezi gibi oluşan motor komplikasyonlar daha önemli sınırlayıcı faktörleridir. Bu komplikasyonlar striatal dopamin reseptörlerinin kesintili bir şekilde uyarılmasından kaynaklanmaktadır (Lane, 2019).

4.3.2. Dopamin Agonistleri

Dopamin agonistleri postsinaptik D1-3 dopamin reseptörlerini dopaminerjik nöronların metabolik aktivitelerine ihtiyaç duymadan uyarabilmektedir (Fahn, 2008). Bu agonistler motor semptomları düzeltmekte levodopa kadar başarılı değildir. Fakat diskinezi için oluşan riski azalttıkları görülmüştür. Özellikle hastalığın erken evrelerinde levodopa ile birlikte kullanıldıklarında diskinezi riski azalmaktadır (Berthet ve Bezard, 2009). Ropinirol, pramipeksol, rotigotin ve apomorfin yaygın olarak kullanılan dopamin agonistleridir (Horowski ve Löschmann, 2019).

4.3.3. Diğer Tedavi Edici Yöntemler

Katekol-o-metiltransferaz (KOMT) enzimi inhibitörleri ve Monoamino-oksidad-B (MAO-B) enzimi inhibitörleri levodopanın etkisini arttırmaktadır (Ghamgosha ve ark., 2018). KOMT enzimi inhibitörleri levodopanın periferik metabolizmasını bloklayarak daha uzun süre vücutta kalmasını sağlamaktadır (Connolly ve Lang, 2014). MAO-B enzimi inhibitörleri ise striatal dopaminerjik aktiviteyi artırır ve dopaminin metabolizmasını etkiler (Armstrong ve Okun, 2020). Amantadin, PH'na bağlı gelişen tremor ve bradikinezinin düzeltilmesinde kullanılsa da en çok levodopa kaynaklı diskinezinin tedavisinde tercih edilmektedir (Müller ve ark., 2019). Metilfenidat ve atomoksetin gibi uyarıcı maddelerin ise yürürken donma belirtisini tedavi etmeye yönelik olduğu düşünülmektedir (Revuelta ve ark., 2015; L.-

L. Zhang ve ark., 2016). Derin beyin uyarımı (DBS) sistemi de bir diğer tedavi yöntemidir. Subtalamik nukleus, globus pallidus veya talamusa yerleştirilen elektrotlarla elektrik akımı uygulanması ve dopamin yerine elektriğin uyarıcı olarak kullanılmasını temel alan tedavi biçimidir (Okun, 2012). Talamus veya globus pallidusa uygulanan cerrahi yöntemlerle bu bölgelerdeki hücrelerin lezyona uğratılmasıyla PH semptomlarında iyileşmeye yönelik belirtiler gözlemlenebilmektedir (Kulisevsky ve ark., 2018). Kök hücre kullanılarak tedavi uygulama, AAV veya lentivirüs (LV) kullanılarak gen tedavisi seçenekleri de halen sürdürülmekte olan tedavi yöntemleri araştırmaları arasında bulunmaktadır (Niethammer ve ark., 2018; Lang ve ark., 2019).

4.3.4. Nörotrofik Faktörler

PH'da kullanılan tedavilerden hiçbiri uzun süreli etkiye sahip ve güvenli olmamakla birlikte devam etmekte olan nörodejenerasyonun durdurulmasını da sağlayamamaktadır (Staudt ve ark., 2016). Yeni tedavi yöntemleri geliştirme amacındaki araştırmalar sadece semptomları iyileştirmek yerine nörodejenerasyon aşamasını durduran veya tersine çeviren metodları geliştirmeyi hedeflemektedir (Sullivan ve Toulouse, 2011). Bu amaç doğrultusunda antioksidanlar, anti-apoptotik ajanlar, hücre temelli tedaviler ve nöroprotektif etkiye sahip olan nörotrofik faktörler (NTF)'in kullanılması üzerine araştırmalar yapılmaktadır (Torres-Ortega ve ark., 2019).

Yetişkin ve gelişmekte olan beyinlerde nöronların hayatlarına uygun bir şekilde devam edebilmeleri, olgunlaşmaları ve korunmaları için kritik olan protein yapıda nörotrofik faktörler bulunmaktadır (Paul ve Sullivan, 2019). Şimdiye dek pek çok nörotrofik faktörün dopaminerjik nöronlar üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Machado ve ark., 2016). Özellikle dopaminerjik nöronlarda seçici etkiye sahip olduğu bilinen NTF'ler bu yaklaşımın hedefi olmuştur (Nasrolahi ve ark., 2018). Glial hücre hattı kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), neurturin (NRTN), artemin (ARTN), persephin (PSPN), büyüme/ farklılaşma faktörü (GDF) 5, mezensefalik astrosit kaynaklı nörotrofik faktör (MANF) ve serebral dopaminerjik nörotrofik faktör (CDNF) PH'nın tedavi yöntemlerinden birisi olmak üzere çalışılmış NTF'lerden başlıca olanlarıdır (Huttunen ve Saarna, 2019). 6-OHDA ve MPTP

temelli PH modelleri kullanılarak, GDNF ile yapılan araştırmalarda motor semptomlar ve nigrostriatal bütünlük üzerinde sağlam nörorestoratif etkiler gösterilmiştir. Ayrıca daha sonrasında yapılan klinik çalışmalarda, GDNF'in belirli aralıklarla ve düzenli bir şekilde hastalara uygulanmasıyla Parkinson hastalığının ilerleyişinde duraklamalar kaydedilmiştir (Allen ve ark., 2013). Bu araştırmalar da göz önüne alındığında, büyüme faktörlerinin Parkinson hastalığını da içine alan nörodejeneratif hastalıklarda yeni bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği görülmüştür (Conese ve ark., 2019).

4.4. Myeloid Türevli Büyüme Faktörü (MYDGF)

Otolog kemik iliği hücrelerinin (BMC) intrakoroner infüzyon yöntemiyle uygulandığında, miyokard enfarktüsü (MI) sonrası kalp fonksiyonlarını tedavi edici etkisinin olabileceği düşünölmektedir. Ancak, bu hücrelerin etkinliğinin oldukça değişken olduğu ve klinik olarak yapılan çalışmalarda BMC tedavisinin sonuçlarının çok karışık olduğu görülmüştür (An ve ark., 2018). Kemik iliği hücrelerinden salgılanan proteinlerle yapılacak bir tedavinin kemik iliği hücrelerinin infüzyonu ile uygulanan proteinlerden temel alan tedavi bir yönteminden daha etkili ve güvenilir olabileceği düşüncesiyle ile Korf-Klingebier ve ark. tarafından 2015 yılında Nature Medicine dergisinde yayınlanan bir araştırmada myeloid türevli büyüme faktörü (MYDGF) olarak adlandırılan yeni bir proteinin BMC temelli tedavilerdeki iyileştirici etkiyi sağlamaktan sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Korf-Klingebiel ve ark., 2015). Bu çalışmada MYDGF'nin kemik iliği kaynaklı monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan bir protein olduğu ve MI sonrası kardiyak iyileşmeyi teşvik ettikleri ortaya konulmuştur. Mydgf bulundurmeyen mutant fareler ve yabani tip farelere verilen rekombinant Mydgf'nin kardiyak miyosit apoptozunu inhibe edilmesi ve infarkt boyutunun azalması için gerekli olduğu da bulgular arasında yer almaktadır. Bu protein ilk olarak SF20/IL25 olarak adlandırılmış ve ilk kez bulunmuş olmasına karşın çalışmadaki proliferatif etkinin tekrarlanamaması nedeniyle yayın geri çekilmiştir (Tulin ve ark., 2001). MYDGF proteini kromozom 19 üzerindeki açık okuma çerçevesi (ORF) 10 (C19orf10)'da kodlanmaktadır (Zhao ve ark., 2020). MYDGF; endoplazmik retikulum (ER), Golgi ve ekstraselöler olarak bulunmaktadır. Birincil aminoasit yapısına bakıldığında MYDGF'nin bilinen hiçbir sitokin ve büyüme faktörü ailesine ait olmadığı da görülmüştür. İnsan MYDGF proteini 142 aminoasitten (aa)

oluşmakta ve C-terminalinde onun ER'da bulunan protein olduğuna işaret eden KDEL benzeri aminoasit sekansı taşımaktadır (Bortnov ve ark., 2018). Klinik çalışmalara öncülük etmesi amacıyla kristal yapısı da bulunmuş olan MYDGF; evrimsel olarak korunmuş, salgılanan ve biyolojik fonksiyonlarının tamamı henüz bilinmeyen bir proteindir (Polten ve ark., 2019; Ebenhoch ve ark., 2019).



5.MATERYAL VE METOT

Tüm deneyler İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) yapılmıştır. Çalışma HEK-293T ve SH-SY5Y (ATCC®) hücre hatları ile *in vitro* olarak gerçekleştirildiği için etik kurul onayı alınmamıştır.

5.1. Kimyasallar

0,5M Na₂HPO₄: 35,5 gram sodyum fosfat (Na₂HPO₄) (567550, Calbiochem®) tartıldıktan sonra 400 ml çift distile su ile çözülmeye bırakılmıştır. Son hacim 500 ml'e tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

1M CaCl₂: 22,196 gram CaCl₂ (C1016-2,5KG, Sigma-Aldrich) hassas terazi (Explorer®, OHAUS) ile tartılmış ve 200 mililitre (ml) distile su içerisinde çözüldükten sonra 50 ml hacimli enjektör yardımıyla 0,22 µM filtre (16534, Minisart, Sartorius Stedim Biotech) kullanılarak filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan solüsyon otoklavlandıktan sonra 1/10 oranında otoklanlanmış çift distile su ile 100 mM' a seyreltilmiştir.

20X TBS-T: 1 litre 20X TBS-T için 160 gram sodyum klorür (NaCl; Sodium chloride, 31434-1KG-R, Sigma- Aldrich), 43,4 gram Trizma Base (T1503-1KG, Sigma) ve 20 ml Tween-20 (P1379-500ML, Sigma) 750 ml distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır. Sonrasında solüsyon pH metre yardımıyla pH 7,6' ya (edge^{pH}, Hanna Instruments) ayarlanmış ve distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 1X TBS-T ise 20X TBS-T' nin distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

2M C₃H₄N₂: 68,08 gram imidazol (C₃H₄N₂) (56750-500G, Sigma Aldrich) tartıldıktan sonra 400 ml çift distile su içerisinde çözüldükten sonra pH: 7,4'e ayarlanır ve çift distile su ile 500 ml'e tamamlanır.

5M NaCl: 146,1 gram sodyum klorür (NaCl) (31434-1KG-R, Sigma Aldrich) 400 ml çift distile su ile çözülmüş ve hacmi 500 ml'e tamamlanıp ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

6- OHDA: 5 mg olarak satın alınmış olan madde 2 ml DPBS (P04-36500, PAN BIOTECH) içerisinde çözülmüş, 10 mM 6-OHDA (H116-5mg, Sigma) ve %0.01 askorbik asit içeren alikotlar halinde -20 °C’de ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir. Bu çalışma için belirlenen konsantrasyonlar (0, 10, 25, 50, 100, 200, 250 ve 500 µM) uygun miktarda madde besi yeri içerisinde çözülerek hazırlanmış ve kullanılmıştır.

ÄKTA Avant 150 Bağlanma Solüsyonu (*Binding Buffer*): 20 ml 0,5M sodyum fosfat solüsyonu ve 50 ml 5M sodyum klorür solüsyonu 400 ml çift distile su ile hazırlanmış ve pH: 7,4’e ayarlandıktan sonra hacim 500 ml’e tamamlanmıştır. Solüsyon 0,20 µm filtreden (Ministart®, 16534, sartorius stedim biotech) geçirildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

ÄKTA Avant 150 Tampon Çözelti Değişirme (*Desalting*) Kolon Solüsyonu: 50 ml 0,5M sodyum fosfat ve 15 ml 5M sodyum klorür 400 ml çift distile su içerisinde çözüldükten sonra pH: 7,00’a ayarlanmıştır. 500 ml’e tamamlanan solüsyon 0,20 µm filtreden geçirilmiştir. Solüsyon oda sıcaklığında saklanmıştır.

ÄKTA Avant 150 Elüsyon Solüsyonu (*Elution Buffer*): 20 ml 0,5M sodyum fosfat çözeltisi, 50 ml 5M sodyum klorür çözeltisi ve 125 ml 2M imidazol yaklaşık 400 ml çift distile su içerisinde hazırlanmış ve pH:7,4’e ayarlanıp hacim 500 ml olacak şekilde solüsyon hazırlanmıştır. Filtrelendikten (0,20 µm filtre, Ministart®, 16534, sartorius stedim biotech) sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

ÄKTA Avant 150 Yıkama Solüsyonu (*Wash Buffer*): 20 ml 0,5M sodyum fosfat solüsyonu, 50 ml 0,5M sodyum klorür solüsyonu ve 5 ml 2M imidazol solüsyonu 400 ml olacak şekilde çift distile su içinde karıştırılmış sonra pH 7,4’e ayarlanıp ve 500 ml’e tamamlanmıştır. 0,20 µm filtre (Ministart®, 16534, sartorius stedim biotech) kullanılarak solüsyon filtreden geçirilmiştir. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

LB AGAR: Katı bakteri besi yeri hazırlamak için toz halindeki LB Agar (A8523, BIOMATIK) kullanılacak miktar kadar çift distile su içinde konsantrasyonu 35 gram/litre olacak şekilde çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Doğru plazmidi içeren bakterilerin seçilimi için ampisilin kullanılmıştır.

LB BROTH: Sıvı bakteri besi yeri hazırlamak için toz halinde bulunan LB Broth (A8521, BIOMATİK) 20 gram/litre konsantrasyonunda olacak şekilde ihtiyaç duyulan miktar kadar tartılıp çift distile su ile çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Bakteri seçiliminde ampisilin antibiyotiği ile yapılmıştır.

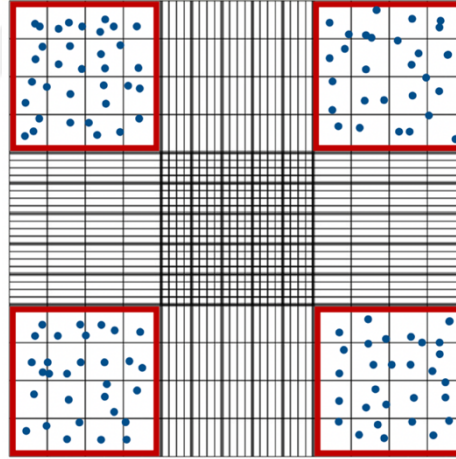
5.2. Hücre Kültürü

HEK-293T (insan embriyonik böbrek hücresi hattı, ATCC®) hücrelerinin kültür ortamı %10 fetal sığır serumu (FBS; P30-1985, Pan Biotech), 1X esansiyel olmayan amino asitler (P08-32100, Pan Biotech) ve %1 oranında stabil glutamin (Glutamax-I;35050, gibco) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, P04-01158, PAN BIOTECH) kullanılarak hazırlanmıştır. Hücreler steril hücre kültürü şişelerinde (T75, 90075, TPP®), %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) çoğaltılmış ve yaklaşık olarak 3 gün aralıklarla alt kültürleri yapılmıştır. Alt kültürlerin elde edilmesi esnasında, hücrelerin yıkanması için 4 ml DPBS (P04-36500, PAN BIOTECH), hücrelerin birbirlerinden ve steril hücre kültürü şişelerinden ayrılmasını sağlamak için ise 1,5 ml %0.25 Trypsin/EDTA (1X) (25200-056, gibco) kullanılmıştır.

SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre hattı, ATCC®) hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS Standard, P30-193306, Sigma) ve 1X GlutaMax-I (GlutaMAX™-I (100X), 35050-038, gibco) ile güçlendirilmiş DMEM/F12 (Pan Biotech, P04-41450) kültür ortamında ve %5 CO₂ ile 37 °C'de inkübatör (Heracell 150i, Thermo Fisher) içerisinde çoğaltılmıştır. Hücrelerin alt kültürleri her 3 günde bir olacak şekilde yapılmıştır. Alt kültür yapılırken eski sıvı besi yeri atılmamış ve besi yerinde yüzer halde bulunan hücreler santrifüjle çöktürüldükten sonra hücre şişelerine yapışık halde olan hücreler ile birleştirilmiştir. Hücre şişelerinin tabanında olan hücreler DPBS (P04-36500, PAN BIOTECH) ile yıkandıktan sonra tripsin ile muamele edilmiştir. Tripsinin etkinliği besi yeri eklenerek durdurulmuştur. Ortamdan ayrılan besi yeri içerisindeki hücreler 50 ml hacimli santrifüj tüpüne (602002, NEST) toplanmıştır. Hücreler 1200 rpm ve 4 °C'de 4 dakika boyunca santrifüj (SL 16R, Thermo Scientific) edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti taze besi yeri içerisinde çözüldükten sonra yeni T75 hücre kültürü şişelerine (90075, TPP®) aktarılmıştır.

5.2.1. Hücre Sayımı

Belirli sayıda hücre kullanılacağı zaman hücreler T75 hücre kültürü şişelerinden kaldırıldıktan sonra 15 ml hacimli santrifüj tüpüne (601002, NEST) alınmıştır. Hücreler 1200 rpm 4 °C’de 4 dakika santrifüj (SL 16R, Thermo Scientific) edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, elde edilen pellet 5 ml taze besi yeri içerisinde çözülmüştür. Taze besi yeri içerisinde bulunan hücrelerden 10 µl hacimde alınarak hemositometre (Neubauer Improved, 075.03.001, Isolab) yardımıyla ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılmıştır. Hemositometreye mikroskop kullanılarak bakıldığında lam üzerindeki büyük artı (+) işareti (**Şekil 5.2.1**) önce 4X objektif kullanılarak bulunmuştur. Daha sonra 10X objektif kullanılarak + işaretinin köşelerinde yer alan 16’şar kareden oluşan 4 ayrı alandaki hücreler sayılmış ve bu 4 alandaki hücrelerin ortalaması hesaplanmıştır. Bulunan sayı 10^4 ile çarpıldıktan sonra 1 ml’deki hücre sayısı bulunmuştur.



Şekil 5.2.1. Hemositometrenin (kan sayma lamı) mikroskop altındaki görüntüsü. Kırmızı renk ile çerçevelenen kısımlarda yer alan hücreler sayılmıştır. Bu alan + işaretinin köşelerini oluşturmaktadır. Mavi renkteki yuvarlaklar ise hücreleri temsil etmektedir.

5.2.2. Hücre Ekimi

Hemositometre kullanılarak hesaplanan hücre sayısından yola çıkılarak 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının (24 Well Cell Culture Cluster, 3526, costar®) her kuyucuğuna toplam hacim 0,5 ml taze besi yeri içerisinde 10×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Eşit yayılımı sağlamak amacıyla hücreler kuyucuklara damla

damla, çiçek şeklinde eklenmiş ve hücre ekimi yapılan plaka hem kabin hem de inkübatör içerisinde artı işareti çizilerek sallanmıştır. Daha sonra hücreler inkübatöre yaşam koşullarını sürdürmeleri için kaldırılmıştır.

Benzer şekilde hücre ekimi 10 cm'lik hücre kültürü plakalarına (430167, CORNING®) da yapılmıştır. Her plakaya $1,2 \times 10^6$ hücre 9 ml medium içerisinde ekilmiştir. Hücreler 37 °C'de inkübe edilmiştir.

5.2.3. Hücre Canlılığı Testi

Hücre canlılık testi için hücre kültürü plakalarına ekilmiş olan hücreler ışık mikroskobu (Primovert, ZEISS) altında 20X objektif ile görüntülenmiş ve ZEN Blue programı ve Primovert HDcam kamerası kullanılarak fotoğraflanmıştır. Sonrasında elde edilen fotoğraflardaki hücreler yine ZEN Blue programı kullanılarak sayılmış ve değerlendirilmiştir.

5.3. Plazmid Hazırlama

5.3.1. PZR ve PZR Ürününün Jelden Geri Kazanımı

Polimeraz zincir reaksiyonu çalışması öncesinde His-tag'li primer dizaynı (**Tablo 1**) yapılmıştır. Bu primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile His-tag'li C19 geni çoğaltılmıştır.

Tablo 1. C terminali histidin aminoasidi ile işaretli olan ve bu çalışmada kullanılmış olan primerler. Bu primerler His- tag'li hMYDGF geninin çoğaltılması için kullanılmıştır.

Primer	Primerin baz dizilimi	Baz sayısı
C19 -Forward	AGTCA AAGCTT AAC ATG GCG GCG CCC AGC – 3'	29
C19-Reverse	CCG CTCGAG TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CAG CTC AGT GCG CGA TGCC – 3'	49

C19 geninin histidin işaretli bir şekilde oluşturulması için uygun PZR reaksiyonu kırık buz üzerinde oluşturulmuş ve uygun koşullar Thermal Cycler cihazında (T100™, BIO-RAD) sağlanarak gen çoğaltılmıştır (**Tablo 2 ve Tablo 3**). Q5 polimeraz enzimi (Q5® High- Fidelity DNA polymerase, M0491S, BioLabs) ve 5X Q5 reaksiyon tamponu (*buffer*) (B9027S, BioLabs) kullanılarak reaksiyon oluşturulmuştur.

Tablo 2. Polimeraz zincir reaksiyonu.

	0,2 µM Primer	0,5 µM Primer
cDNA	1 µl	1 µl
10 mM dNTP	1 µl	1 µl
C19 -Forward Primer	1 µl	2,5 µl
C19 -Reverse Primer	1 µl	2,5 µl
DNA Polimeraz	0,5 µl	0,5 µl
5X Tampon	10 µl	10 µl
ddH ₂ O	35,5 µl	32,5 µl
Toplam	50 µl	50 µl

PZR reaksiyonu sonrasında elde edilen örnekler %1 oranında RedSafe (21141, Intron) içeren %1'lik agaroz (UltraPure™ Agarose, 16500-500, Invitrogen) jelle yüklenmiş ve 120 Volt'da (PowerPac Universal™, BIO-RAD) yürütülmüştür. Örneklerin agaroz jel kuyucuklarına yüklenilmesi esnasında 6X Orange Dye (R0631, Thermo Scientific) kullanılmıştır. PZR reaksiyonu sonrasında jel Chemidoc MP görüntüleme sistemi (Chemidoc™ MP Imaging System, 1708280, BIORAD) yardımıyla görüntülenmiştir.

Tablo 3. PZR koşulları.

98°C	1 dk	X 35 döngü Kapak:105°C Hacim: 50 µl
98°C	10 sn	
62-65°C (Gradient)	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	5 dk	
+4°C	∞	

İlgili baz çiftine denk gelen bant Chemidoc MP görüntüleme sisteminde bulunan UV lambası yardımıyla jelden kesilmiştir. Kesilen jel parçası 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Jelden DNA izolasyonu yapmayı sağlayan ticari bir kit (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit D4007, Zymo Research) kullanılarak ve üreticinin protokolü esas alınarak agaroz jelden DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kısaca bu işlem için, 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne kesilen jel alınmış ve tartılmıştır. Tartım sonrası mg cinsinden bulunan değerün üç katı kadar hacimde (μ l cinsinde) agaroz çözücü tampon (agarose dissolving buffer, ADB) eklenmiştir. Örnek 50 °C'ye önceden ayarlanmış blok ısıtıcıda (Dry Bath, MK200-2, Allsheng) 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra eriyen agaroz Zymo-Spin™ kolona alınmış, 11000 xg'de 60 saniye boyunca santrifüj (MICROCL 21 centrifuge, Thermo Scientific) edilmiştir. Sonrasında sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. İki kez 200 μ l DNA yıkama tamponu (DNA Wash Buffer) ile kolon yıkanmıştır. Son olarak önceden 50 °C'ye ısıtılmış otoklavlanmış çift distile su kullanılarak 26 μ l hacminde elüsyon sağlanmıştır.

5.3.2. Vektör Plazmidin ve PZR Ürününün Kesim Enzimleriyle Kesilmesi

Klonlama için pcDNA3.1(+) plazmid vektörü kullanılmıştır (**Şekil 5.3.2**). Agaroz jelden PZR ürününün saflaştırılması sonrasında elde edilen DNA örneği ve klonlamanın yapılacağı pcDNA3.1(+) plazmid vektörüne restriksiyon enzimleri (**Tablo 4**) ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR ürünü ve plazmid vektörü ayrı tüplerde 10X FastDigest tamponu (B72, 10X FastDigest Green Buffer, Thermo Scientific), kesim enzimleri (HindIII (FD0504/5, Thermo Scientific) ve XhoI (FD0694/5, Thermo Scientific)) ve çift distile su kullanılarak (**Tablo 5**) 37 °C'de su banyosunda (Water Bath, BM 30, nüve) 30 dk inkübe edilmiştir.

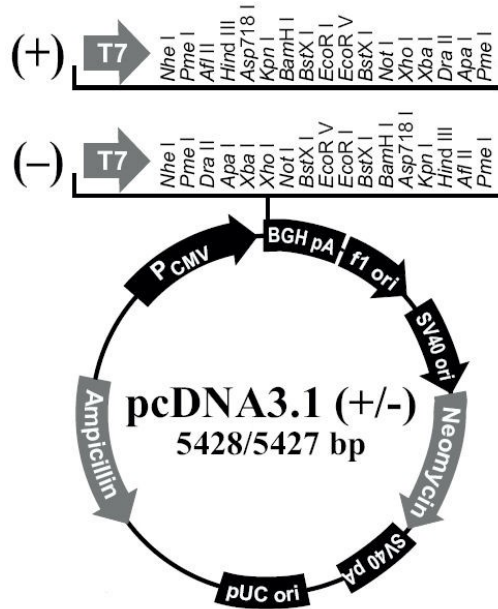
Tablo 4. Kullanılan kesim enzimleri.

Kesim Enzimi	Reaksiyon Sıcaklığı	Enzim İnaktivasyonu
HindIII	37°C	80°C, 10 dk
XhoI	37°C	80°C, 5 dk

Plazmid vektörü tüpüne kesim reaksiyonunu sonlandırmaya 15 dakika kala 1 µl FastAP alkalın fosfataz enzimi eklenerek inkübasyona devam edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 80 °C’de 10 dakika boyunca inkübe edilmiş ve böylece kesim enzimlerinin inaktivasyonu sağlanmıştır.

Tablo 5. Kesim enzimleriyle oluşturulan reaksiyon.

	PZR Ürünü	Vektör Plazmid
PZR Ürünü	26 µl	5 µl
10X FastDigest Tamponu	3 µl	2 µl
HindIII	0,5 µl	0,5 µl
XhoI	0,5 µl	0,5 µl
ddH ₂ O	-	12 µl
Toplam	30 µl	20 µl



Şekil 5.3.2. Kullanılan vektör plazmid pcDNA3.1(+)' nin haritası. Vektör çoklu klonlama bölgesinde HindIII ve XhoI kesim enzimlerinin reaksiyon bölgelerini içermektedir. Aynı zamanda vektörde ampisilin antibiyotigine direnç gösteren gen bölgesi de bulunmaktadır.

Kesim işlemleri gerçekleştirildikten sonra örnekler kesim işleminin artıklarından uzaklaştırılmış ve DNA saflaştırılmıştır. Bu amaç için ticari bir kit olan Zymo DNA Clean and Concentrator kiti (D4003T, Zymo Research) üreticinin protokolde belirttiği şekilde kullanılmıştır. Kısaca, kit içerisinde yer alan DNA bağlanma tamponu (DNA binding buffer) plazmid vektörü içeren tüpe hacminin iki katı kadar; PZR ürünü içeren tüpe de hacminin beş katı kadar eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Pipetleme sonrası örnekler farklı Zymo-Spin™ kolonlara alınmıştır. Kolonlara alınan örnekler 30 saniye boyunca 11000 xg’de santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde DNA’nın kolona bağlanması sağlanmıştır. Kolonlara 200 µl DNA yıkama solüsyonu (*wash buffer*) eklenmiş, sonrasında 60 saniye boyunca 11000 xg’de santrifüj yapılmıştır. Yıkama işlemi iki sefer tekrar edilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında önceden 50 °C’de ısıtılmış otoklavlanmış çift distile su kullanılarak DNA elüsyonu yapılmıştır. Örneklerin DNA konsantrasyonu nanofotometre (P330, IMPLLEN) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

5.3.3. Ligasyon, Kompetent Bakteri Hazırlanması ve Transformasyon

Ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmeden önce NEBioCalculator® kullanılarak vektör DNA ve PZR ürünleri için kullanılacak miktar belirlenmiştir (**Şekil 5.3.3**). Ligasyon reaksiyonu için kit (Rapid Ligation Kit; 4K1422, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Uygun kesim enzimleri ile kesilmiş olan PZR ürünlerinin yine uygun kesim enzimleri ile kesilmiş olan plazmide ligasyonu T4 DNA ligaz (EL0014, Thermo Fisher) enzimi, tampon (5X Rapid Ligation Buffer) ve çift distile su aracılığıyla sağlanmıştır (**Tablo 6**). Bu işlem 22 °C’de gece boyunca Thermal Cycler cihazında (T100™, BIO-RAD) inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6. Ligasyon reaksiyonu. 1:3 ve 1:5 oranlarındaki PZR ürün miktarı Şekil 5.3.3’ teki hesaplama kullanılarak yapılmıştır.

	1:3	1:5
PZR ürünü (29 ng/µl)	2 µl	1,2 µl
Vektör plazmid (50 ng/µl)	1 µl	1 µl
5X tampon	2 µl	2 µl
T4 DNA ligaz	0,5 µl	0,5 µl
ddH ₂ O	4,5 µl	5,3 µl
Toplam	10 µl	10 µl

NEBioCalculator®

version 1.12.0

Ligation Calculator

This tool will calculate the mass of insert required at several molar insert:vector ratios in the range needed for typical ligation reactions.

Insert DNA length

537 bp

Vector DNA length

5428 bp

Vector DNA mass

50 ng

Required insert DNA mass

4.947 ng (1:1)

9.893 ng (2:1)

14.84 ng (3:1)

24.73 ng (5:1)

34.63 ng (7:1)

Şekil 5.3.3. NEBioCalculator® programının gösterimi. Vektör plazmid ve PZR ürünün konsantrasyonları ölçüldükten sonra vektör plazmid ve PZR ürününün boyut verileri kullanılarak ligasyon hesaplama işlemi yapılmıştır. Program tarafından kullanılan hesaplama: Gereken PZR ürünü kütlesi (g)= istenilen PZR ürünü/ vektör plazmid molar oranı x vektör plazmid kütlesi (g) x PZR ürününün vektör plazmid uzunluğuna oranı.

Kompetent hücre elde edilmesi için, önceden LB katı besi yerine çizilmiş ve çoğaltılarak koloni oluşturduğu gözlemlenmiş, 4 °C’de muhafaza edilen DH5α bakterisi suşu kullanılmıştır. Katı besi yerinde gözlemlenen kolonilerden seçilen bir tanesi 200 µl’lik mikropipet yardımıyla alınmış ve 5 ml LB sıvı besi yeri içerisine 16 saat boyunca 225 rpm’de çalkalanarak 37 °C’de inokülasyona bırakılmıştır. 16 saat sonra elde edilen bakteri karışımından 1 ml alınarak 100 ml LB sıvı besi yeri içerisine eklenip 3 saat 225 rpm’de çalkalanarak 37 °C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra elde edilen bakteriler 50 ml hacimli santrifüj tüplerine bölünmüştür. Bakteri içeren tüpler 3000 rpm’de, 10 dakika boyunca, 4 °C’de santrifüj (SORVALL BIOFUGE STRATOS Centrifuge, Thermo Scientific) edilmiştir. Bakteri pelletleri LB sıvı besi yerinden

ayrılmıştır. Pelletler önce 1 ml soğuk (4 °C) 100 mM CaCl₂ içinde çözülmüş ve iki ayrı santrifüj tüpündeki pelletler birleştirilmiştir. Daha sonra üzerine 24 ml daha soğuk (4 °C) 100 mM CaCl₂ eklenmiştir. 100 mM CaCl₂ ile muamele edilmiş bakteriler kırık buz üzerinde 1 saat inkübe edildikten sonra 3000 rpm'de, 10 dakika boyunca, 4 °C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet 2 ml 4°C sıcaklıktaki 100 mM CaCl₂ ile çözülmüş ve kompetent bakteriler elde edilmiştir.

Ligasyon işleminden sonra 1 µl ligasyon ürünü 50 µl kompetent hale getirilmiş (100 mM CaCl₂ yardımıyla) DH5α bakteri karışımının üzerine eklenmiş ve ısı şoku yöntemi kullanılarak klonlama ürünlerinin kompetent bakterilerin içine girmesi sağlanmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan her ligasyon ürünü için ayrı tüplerde bu işlem tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol için vektör plazmidin kendisi ve negatif kontrol için ise çift distile su ligasyon ürünü yerine kullanılmıştır. Isı şoku için ligasyon ürünü ve kompetent bakteri karışımı 30 dakikalık kırık buz inkübasyonu sonrasında 60 saniye önceden 42 °C'ye getirilmiş su banyosunda inkübe edilmiş ve hemen ardından buz üzerine tekrar alınarak 5 dakika boyunca bekletilmiştir ve tüplere 200 µl LB sıvı besi yeri eklenerek 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde (MAX Q 6000, Thermo Scientific) 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bakteriler, ampisilin antibiyotiği (Invitrogen) içeren LB agar (A8523, BIOMATİK) içeren petri kaplarının üzerine yayılmıştır. Yayılan bakteriler 16 saat süresince 37 °C'deki bakteri inkübatöründe inkübe edilmiştir ve plazmid içeren bakterilerden tek tek kolonilerin seçilmesi sağlanmıştır.

5.3.4. Koloni ve Plazmid Doğrulaması

Seçilen kolonilere koloni PZR işlemi yapılmıştır. 200 µl hacimli mikropipet ucu yardımıyla seçilen koloni 50 µl otoklavlanmış çift distile su içerisine bırakılmış ve çözülmesi için iyice pipetleme yapılmıştır. Sonrasında çözülen bakteri kırık buz üzerinde bekletilmiştir. Koloni içeren su PZR işlemi için DNA kalıbını oluşturmuştur. Koloni PZR; 2,5 µl koloni içeren su karışımı, 2 µl 5X buffer, 0,5 µl'şer ileri ve geri C19 geni primerler, 0,1 µl DNA polimeraz enzimi (iProof™ High Fidelity DNA Polymerase; 172-5330, BIORAD), 0,2 µl 10 mM dNTP (dNTP Mix, R0191, Thermo Scientific) içerecek şekilde toplam hacim 10 µl'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (**Tablo 7**). PZR sonrası örnekler %1 RedSafe içeren %1'lik agaroz jele yüklenerek

yürütülmüş ve Chemidoc MP görüntüleme sistemi kullanılarak istenilen bantların olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Tablo 7. Koloni PZR reaksiyonu.

DNA	2,5 µl
10 mM dNTP	0,2 µl
C19 -Forward Primer	0,5 µl
C19 -Reverse Primer	0,5 µl
DNA Polimeraz	0,1 µl
5X Tampon	2 µl
ddH ₂ O	4,2 µl
Toplam	10 µl

Plazmidlerin doğrulanmasının yapılması amacıyla; ampisilinli LB Agar petri kaplarında çoğalan koloniler tek tek alınarak ampisilin içeren LB sıvı besiyerine içerisinde 16 saat süresince 37 °C’de çalkalayıcı inkübatör içerisinde çalkalanarak inkübe edilmiştir ve plazmid izolasyonu işlemi (ZymoPURE™ Plazmid Miniprep Kit,D4210, Zymo Research) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmidlere PCR ampliconlarının istenilen şekilde yerleştiğinin kontrolü için, izole edilen plazmidler kesim enzimleri ile Tablo X’te gösterildiği gibi tekrar kesilerek doğrulanmıştır. Elde edilen ürünler %1 RedSafe içeren %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Sonrasında Chemidoc MP görüntüleme sistemi kullanılarak istenilen bantların olup olmadığı doğrulanmıştır. Plazmid bandına ek olarak PZR ampliconuna ait bant görünen örneklerden DNA sekanslama yapılmıştır.

5.3.5. Transfeksiyon

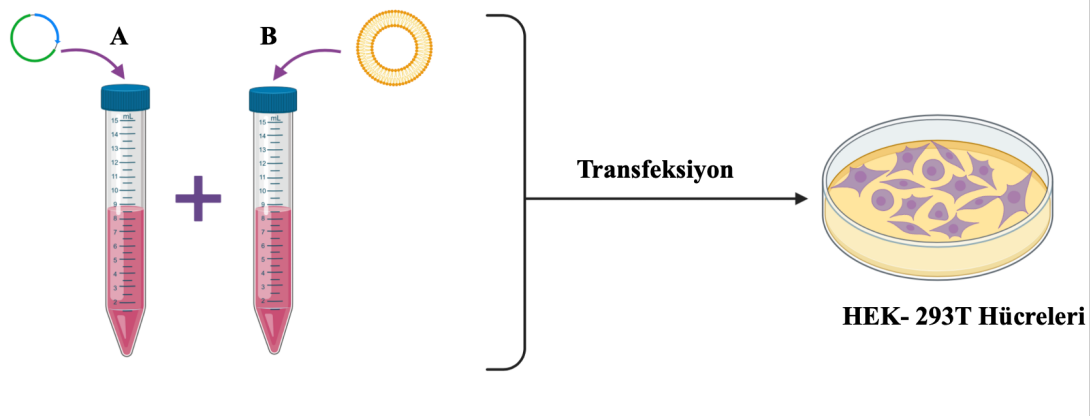
Transfeksiyon için HEK293T hücre hattı ve Lipofectamine 2000 reaktifi (Lipofectamine® 2000 Reagent, 11668-019, Invitrogen) kullanılmıştır. Hücreler ekildikten sonraki gün B ve A solüsyonu olmak üzere paketleme işlemi için iki ayrı solüsyon hazırlanmıştır. B ve A solüsyonları Opti-MEM besiyeri (91985-034, gibco) içerisinde hazırlanmıştır. B solüsyonu için 15ml’lik santrifüj tüpüne 2,5 ml Opti-MEM

besiyeri ve 15 µl Lipofectamine 2000 eklenmiştir. A solüsyonu için ise 15 ml'lik santrifüj tüpüne 2,5 ml Opti-MEM ve 1 µg/µl konsantrasyonundaki C19 genini içeren pcDNA3.1(+) plazmid vektöründen 10 µl eklenmiştir. Plazmid ve Lipofectamine 2000 Opti-MEM içerisine santrifüj tüp duvarlarına değmeyecek ve köpük oluşturulmayacak şekilde verilmiştir. Her iki solüsyon da ayrı ayrı iyice pipetleme yapıldıktan sonra B solüsyonu A solüsyonuna eklenmiş ve tekrar pipetleme yapılmıştır. Solüsyonların karışımı 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (**Tablo 8**).

Tablo 8. Transfeksiyon karışımı.

A Tüpü İçeriği	B Tüpü İçeriği
2,5 ml Opti-MEM	2,5 ml Opti-MEM
10 µg C19 Plazmid	15 µl Lipofectamine 2000

Önceki gün 10 cm'lik hücre kültürü plakalarına ekilen HEK-293T hücrelerinin 5 ml eski besiyeri çekilmiş ve Lipofectamine 2000 ile oluşturulmuş olan DNA-lipit kompleksi (5 ml) hücrelerin üzerine damla damla eklenmiştir (**Şekil 5.3.5**).



Şekil 5.3.5. Transfeksiyon işleminin gerçekleştirilmesi. Opti-MEM ve C19 genini içeren pcDNA3.1(+) plazmid vektörünü içeren tüp (A) Opti-MEM ve Lipofectamine 2000 içeren tüp (B). A tüpü içerisindeki B tüpü içerisindeki karışıma eklendikten sonra hücrelere verilmiştir.

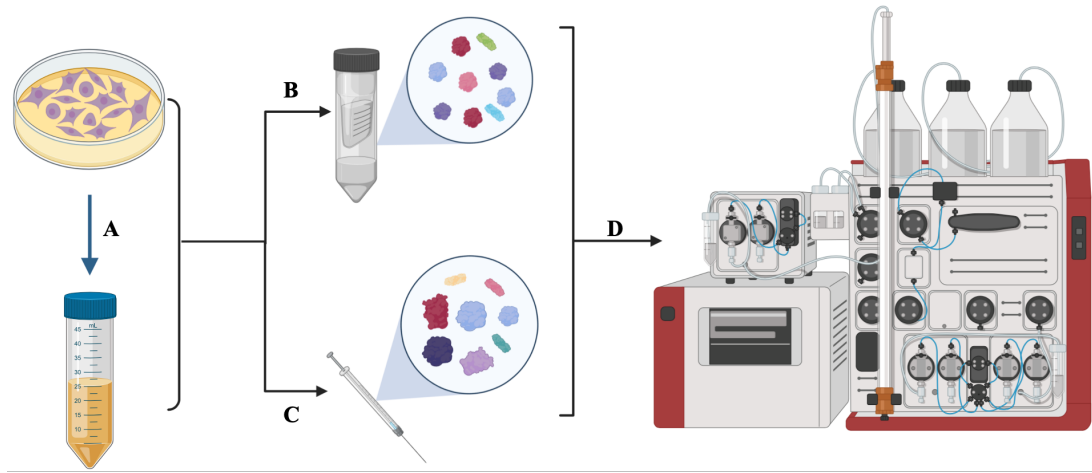
Hücreler 6 saat boyunca bu karışımı içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra tüm besi yeri taze besi yeri olacak şekilde değiştirilmiştir. Hücreler 48 saat süresince

%5 CO₂, 37 °C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) inkübasyona alınmıştır. Serum içeren ve serum içermeyen besi yerinde üretilen MYDGF miktarının karşılaştırılması için bazı gruplarda transfeksiyonun 24. saatinde serum içermeyen taze besiyeri (DMEM, 01-053-1A, Biological Industries) eski besiyeri ile değiştirilmiştir.

Uygun konfirmasyona sahip plazmidlerin (hücre kültürü ortamında protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttıran) işlevsel olduğunu göstermek üzere Materyal ve Metot kısmı 5.5'te detaylı olarak verilen yöntemle göre Western Blot analizi yapılmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra elde edilen besiyerleri toplanarak kromatografi yapılmak üzere hazırlanmıştır.

5.4. Kromatografi

Kromatografi için ÄKTA avant 150 cihazı kullanılmıştır. Cihaz kullanılan kolonların özelliğine bağlı olarak farklı kromatografi metotlarının uygulanmasını sağlamıştır. Örnekler cihazda kullanıma uygun hale getirildikten sonra cihaz çalıştırılmıştır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Kromatografi işlemi. Transfeksiyon işleminden sonraki 48 saatin sonunda toplanan besiyeri (A) ultrafiltrasyon ünitesi olan Amicon Ultra-4 10K (Centrifugal Filter Devices UFC80100, Millipore) ile konsantre hale getirildikten sonra (B) enjektör yardımıyla (c) konsantre haldeki proteinler ÄKTA avant 150 cihazına aktarılmıştır(D). Uygulanacak işleme bağlı olarak kolon seçimi yapılmıştır.

5.4.1. Afinite Kromatografisi

MYDGF'nin ön saflaştırması için afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemi sonrası toplanan besiyeri IMAC (immobilize

metal afinite kromatografisi) kolona (GE17-5248-01, HisTrap™ High Performance, GE Healthcare) yüklenmiştir.

HisTrap™ kolon ÄKTA avant 150 cihazına uygun şekilde bağlanarak sistem çalıştırılmıştır. Cihazın tüm sisteminden (kolon hariç) çift distile su geçirilerek kullanıma hazır hale getirildikten sonra *binding buffer* (bağlanma solüsyonu) ile *equilibration* (dengeleme) aşaması gerçekleştirilmiştir. Tüm sistem *binding buffer* (bağlanma solüsyonu) geçirilmiş haldeyken 10 ml'lik enjektör yardımıyla protein örneği sisteme yüklenmiştir. Cihaza aktarılan örneğin yine cihaza bağlı halde olan *sample loop*'a (örnek spiriline) aktarılması gerçekleştirilmiştir. Örnek hacmine göre seçilen *sample loop* istenilen hız ile örneğin sistem içerisinden geçmesine olanak sağlamıştır. Örnekler *binding buffer* içerisinde kolondan geçmiştir. His etiketli MYDGF'nin, IMAC kolonda bulunan nikel bazlı rezinlere bağlanması sağlandıktan sonra herhangi bir metal iyon bazlı rezin afinitesi göstermeyen proteinler *column wash* (kolon yıkaması) metoduna geçilerek sistemden uzaklaştırılmıştır. Kolon yıkama aşaması tamamlandıktan sonra imidazol içeren solüsyon kullanılarak IMAC kolona bağlanmış halde bulunan tüm proteinler elüe edilmiştir. Elüsyondan elde edilen tüm örnekler 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplanmıştır. Cihazdan geçen tüm örneklerin absorbans değerleri UV dedektörü tarafından ölçülmüştür. Absorbans değerleri okunurken çok yüksek değerlere çıkan ve tepe noktası görülen yerlere denk gelen santrifüj tüpleri alınmıştır ve MYDGF olup olmadıkları Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. Sistem kapatılmadan ÄKTA avant 150 cihazı çift distile su geçirilerek temizlenmiştir. Kullanılan kolon %20 etanol solüsyonu ile muhafaza edilmek üzere sistem çalıştırılmıştır ve %20 etanol solüsyonu sistemden geçirilmiştir.

5.4.2. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Boyut dışlama (*size-exclusion*) kromatografisi veya diğer adıyla jel filtrasyon kromatografisi yüksek saflıkta MYDGF üretilmesi için kullanılmıştır. Superdex® 75 Increase 10/300 kolonu (GE29-1487-21, GE Healthcare) jel filtrasyon için ÄKTA avant 150 cihazı ile birlikte kullanılmıştır.

Jel filtrasyon kromatografisine geçilmeden önce, afinite kromatografisinden elde edilen örnekler *desalting* kolonu (GE17-1408-01, HiTrap™ Desalting, GE

Healthcare) ile imidazolden uzaklaştırılmıştır. Jel filtrasyon için kullanılacak olan örneğin hacminin azaltılması amacıyla ultrafiltrasyon ünitesi olan Amicon Ultra-4 10K (Centrifugal Filter Devices UFC80100, Millipore) kullanılmıştır. Bu ultrafiltrasyon üniteleri 4000 xg oda sıcaklığında 10'ar dakikalık santrifüjler yapılarak kullanılmıştır. Örneklerin tamamı ünitelerden geçirildikten sonra DPBS kullanılarak tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen konsantre haldeki örnek jel filtrasyon kromatografisi uygulanacak hale gelmiştir ve enjektör yardımıyla sisteme yüklendikten sonra kolondan geçirilmesi sağlanmıştır. MYDGF doğrulaması için Western Blot analizi yapıldıktan sonra saflaştırılan MYDGF Parkinson modellemesi yapılan hücrelere verilmiş ve tedavi edici etkisi incelenmiştir.

5.5. Western Blot

5.5.1. Hücreden Protein İzolasyonu

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. Bu plakaların her kuyucuğunda bulunan hücreler 1 ml, 4 °C DPBS (P04-36500, PAN BIOTECH) ile iki kez dikkatlice yıkanmıştır. Bu yıkamalar ile sıvı besi yeri içerisinde bulunan FBS (FBS Standard, P30-193306, Sigma) proteinlerinden hücreler arındırılmıştır. Yıkamadan sonra 1 ml DPBS ve 1000 µl'lik pipet ve hücre kazıyıcıları yardımıyla (Cell Scraper, 3010, costar®) plaka tabanından kaldırılmıştır. Plakadan ayrılan ve DPBS içinde olan hücreler önceden 4°C'ye soğutulmuş 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Örnekler 3000 xg kuvvetinde 10 dakika boyunca 4 °C' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde atılmış ve elde edilen pellet daha iyi hücre lizisinin sağlanması için -80 °C'ye kaldırılmıştır.

Hücre lizatları Western blot yöntemine başlanılmadan önce -80 °C'den alınmıştır ve üzerlerine 1X proteaz fosfotaz inhibitör kokteyli (Protease/ Phosphatase Inhibitor (100X), 5872S, Cell Signaling) içeren hücre lizis solüsyonu (Pierce® IP Lysis Buffer, 87788, Thermo Scientific) eklenmiştir. Örnekler vorteks (REAX top, Heidolph) edildikten sonra yarım saat süresince kırık buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır ve her 5 dakikada bir tekrar vorteksleme işlemi yapılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde 1,5 ml hacimli mikrosantrifüj tüpü içerisinde bulunan örnekler 14.000 xg'de 15 dakika boyunca 4 °C' de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar her örneğe ait

farklı mikrosantrifüj tüplerine toplanmıştır ve Qubit® protein konsantrasyon ölçüm kiti ve cihazı kullanılarak protein konsantrasyon ölçümü yapılmıştır.

5.5.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü

Protein örnekleri 1/10 oranında otoklavlanmış çift distile su kullanılarak seyreltikten sonra Qubit solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon için kit (Qubit™ Protein Assay, Q33212, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) içerisinde yer alan tampon (Qubit™ protein buffer) ve reaktif (Qubit™ protein reagent) kullanılmıştır. Qubit™ protein reaktifi 1:200 oranında Qubit™ protein tamponu ile seyreltilmiştir. Qubit solüsyonu örnek sayısı ve 3 standardın her biri için yeterli olacak şekilde hesaplanmıştır. Konsantrasyon ölçümü için özel yapıda ince duvarlı 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri kullanılmıştır (PCR® tubes, PCR-05-C, Axygen). Hazırlanan Qubit solüsyonundan standartlar için her tüpe 190 µl; protein örnekleri için ise her örneğe ait olan tüpe 198 µl olacak şekilde eklenmiştir. Standartlar 10 µl ve 1:10 seyreltilmiş protein örneklerinden ikişer µl ilgili tüpe alınmış ve her tüp 2-3 saniye vorteks edilmiştir. 15 dakika boyunca örnekler ve standartlar oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiş ve inkübasyon bitiminde protein konsantrasyonları Qubit™ 3 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) cihazı ile örnek hacmi 2 µl'ye ayarlanarak ölçülmüştür. Bulunan değerler, örnekler 1/10 oranında seyreltilmiş olduğundan 10 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

5.5.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması ve SDS-PAGE

Kuyucuklara yüklemek için örnekler 4X aktif laemmlili tampon ve otoklavlanmış çift distile su ile hazırlanmıştır. Aktif laemmlinin elde edilebilmesi için %10 oranında β-merkaptotanol (M3148, Sigma) 4X laemmlili tampona (161-0747, BIO-RAD) eklenmiştir. Her bir örnek için ayrı ayrı tüplere Qubit ölçümünde bulunan değerlere göre hesaplanmış 20 µg protein, 2,5 µl aktif laemmlili solüsyonu ve toplam hacmi 10 µl'ye tamamlayacak miktarda çift distile su eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 95 °C'de 5 dakika boyunca kuyucuklu blok ısıtıcıda (Dry Bath, MK200-2, Allsheng) inkübe edildikten hemen sonra kırık buz üzerine alınmıştır. Buzda yaklaşık 3 dakika bekletildikten sonra jele yüklemeye hazır olan örnekler spindown (MINO-10K, INOVIA Technology) edilmiştir.

Protein örneklerinin elektrik akımı kullanılarak jel üzerinde yürütülmesi için Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIORAD) sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde bulunan tank içerisine 1X running buffer (10X Tris/Glycine/ SDS Buffer, 1610772, BIORAD) 4 °C'ye soğutulmuş çift distile su ile hazırlanmıştır. Mini-PROTEAN Tetra Cell sisteminde bulunan uygun aparatlar yardımıyla 4 °C'de muhafaza edilen %4-20 gradiyent jel (Mini-Protean TGX Stain- Free, 4568096, BIO-RAD) yerleştirilmiştir. Şeffaf bir kaset ile birlikte satın alınmış olan jel tanka yerleştirilmeden önce jelin üzerindeki yeşil bant ayrılmış ve jelde bulunan tarak kuyucuklara zarar verilmeden dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Jel kuyucukları *running buffer* ve 200 µl'lik mikropipet ile yıkanmış ve örnekler 3 µl belirteç (Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder, Biolegend) kullanılarak ilgili kuyucuklara sırayla yüklenmiştir. Örnekler kuyucuklara belirlenen sıralarda yüklenmiştir ve Mini-PROTEAN Tetra Cell sistemi güç kaynağına (PowerPac Universal™, BIORAD) bağlanmıştır. Örnekler ilk 5 dakika boyunca 50 Volt; sonra yaklaşık bir saat boyunca 150 Volt güç uygulanarak yürütülmüştür. Örneklerin yürütülme süresi sonunda Mini-PROTEAN Tetra Cell sistemi güç kaynağından ayrılmış ve jel kaseti de tank sisteminden ayrılmıştır.

Jel kasetinden oklarla işaretli olan yerlerinden kırılarak çıkartılmıştır. SDS-PAGE, yani poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülen tüm proteinlerin görüntüsü, stain-free jel kullanılmasına bağlı olarak Chemidoc MP görüntüleme sistemi yardımıyla direkt olarak görüntülenmiştir. SDS-PAGE'de yürütülen fraksiyonlardaki protein miktarları InstantBlue™ (ISB1L, expedeon) SDS-PAGE boyaması ile de ayrıca protein doğrulamasının gerçekleştirilmesi amacıyla gösterilmiştir. InstantBlue™ boyaması, jel bir kaba alındıktan sonra üzerini kaplayacak şekilde, yaklaşık 20 ml eklenmiştir. Yaklaşık 15 dakika sonra jelde yürütülen proteinler görünür hale gelmiştir fakat daha iyi görüntü elde etmek amacıyla bir gece shaker üzerinde bekletilmiştir.

5.5.4. Jelden PVDF Membrana Transfer ve Antikor Eklenmesi

Trans-Blot® Turbo™ Transfer sistemi ve Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit, PVDF (1704272, BIO-RAD) kullanılarak jelde bulunan proteinlerin kit içerisinde yer alan PVDF membrana (Trans-Blot® Turbo™ Mini-size PVDF Membrane)

aktarılması sağlanmıştır. Membran metanolde (10967209832, Millipore) 3 dakika bekletilerek aktive edilmiştir. Transfer buffer hazırlanırken Trans-Blot® Turbo™ 5X Transfer Buffer ve ona eşit miktarda etanol (K50322183825, Millipore) çift distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan aktarma tamponunda 2 adet filtre kağıdı (Trans-Blot® Turbo Mini-size Transfer Stacks) 2-3 dakika boyunca kit içerisindeki kaplarda bekletilmiştir. Trans-Blot® Turbo™ Transfer sisteminde 2 kaset bulunmaktadır. Kasetlerden birisi alınarak aktarma tamponu ile ıslanmış olan filtre kağıtlarından ilki kasetin taban kısmına yerleştirilmiştir. Sırasıyla membran, jel ve en üst kısma diğer filtre kağıdı eklenerek sandviç hazırlanmış ve kasetin kapağı kapatılmıştır. Filtre kağıtları, membran ve jel koyulan her kat üzerinden rulo ile geçilmiştir. Transfer sistemi cihazda kayıtlı olan protokol uygulanarak (1 mini jel, Low molecular weight, 5 dk) çalıştırılmıştır. Süre sona erdiğinde membran 1x TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20, pH:7.6) solüsyonu içerisinde alınmıştır.

Bloklama işlemi için %5 oranında yağsız süt tozu (Blotto non-fat dry milk, sc-2325, Santa Cruz Biotechnology) içeren 1x TBS-T hazırlanmış ve membranın üzerini kaplayacak şekilde eklendikten sonra 1 saat oda sıcaklığında shaker (Duomax 1030, Heidolph) üzerinde sallandırılarak inkübe edilmiştir. Bloklama işleminden sonra primer antikolar eklenmiş ve gece boyunca 4 °C’ de ve shaker üzerinde inkübasyonları sağlanmıştır. Ertesi gün primer antikolar toplanmış ve 3 kez 10’ar dakikalık 1x TBS-T yıkaması yapılmıştır. Yıkama sonrasında membranlara sekonder antikolar eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında shaker kullanılarak inkübasyon sağlanmış, hemen ardından da 3 defa tekrarlanacak şekilde 10 dakika 1x TBS-T ile yıkanmıştır. PVDF membrana transfer edilen MYDGF-His-tag’in varlığı MYDGF primer antikoru (Purified anti-MYDGF, 695802, BioLegend) 1:5000 oranında kullanılarak gösterilmiştir. Sekonder antikor (HRP Goat anti-rat IgG, 405405, BioLegend)1:5000 oranında kullanılmıştır.

5.5.5. Western Blot Görüntüleme

Görüntüleme Clarity™ Western ECL Substrate (170-5061, BIORAD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HRP-konjuge sekonder antikolar kullanıldığı için Clarity™ Western ECL Substrate içerisinde bulunan 1:1 oranında Clarity Western Peroxide Reagent ve Clarity Western Luminol/Enhancer Reagent solüsyonu

hazırlandıktan sonra kullanılmıştır. Solüsyon, 1x TBS-T içerisinde alınan membran üzerine eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta shaker üzerinde bekletilmiştir. Chemidoc MP görüntüleme sisteminde ImageLab4.1 programı kullanılarak görüntülemeleri yapılmıştır. Görüntüleme yapıldıktan sonra membranlar 1x TBS-T içerisine alınmıştır ve 4°C’ de muhafaza edilmiştir.

5.6. *In vitro* Parkinson Modeli ve MYDGF’nin Tedavi Edici Etkisi



Şekil 5.6. Deney dizaynı.

Parkinson hastalığının *in vitro* modellenmesi SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı ve 6-OHDA (H116-5mg, Sigma) kullanılarak yapılmıştır. SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattında 6-OHDA konsantrasyon gradienti yapılmak üzere hücreler 24 kuyucuklu plakalar üzerine her kuyucukta 10×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat boyunca 6-OHDA ile inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda %50 ölüm oranı (LD50) gösteren doz seçilmiştir. Belirlenen doz ile birlikte saflaştırılmış MYDGF SH- SY5Y hücrelerine uygulandığında oluşan etkisine hücre canlılığı testi yapılmıştır.

Saflaştırılan MYDGF proteinin belirlenen konsantrasyonlarda (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) bir gün önceden ekilmiş hücrelere uygulanmıştır. MYDGF hücrelere taze besiyeri içerisinde verilmiştir. MYDGF eklendikten tam bir saat sonra belirlenen dozda 6-OHDA hücrelere verilmiştir. 6-OHDA verildikten tam 24 saat sonra deneyler sonlandırılmıştır. Her kuyucuktan 5'er adet görüntü ışık mikroskobu kullanarak alınmış ve hücre canlılık testi yapılarak hücre sayıları belirlenmiştir (Şekil 5.6).

5.7. İstatistiksel Analiz

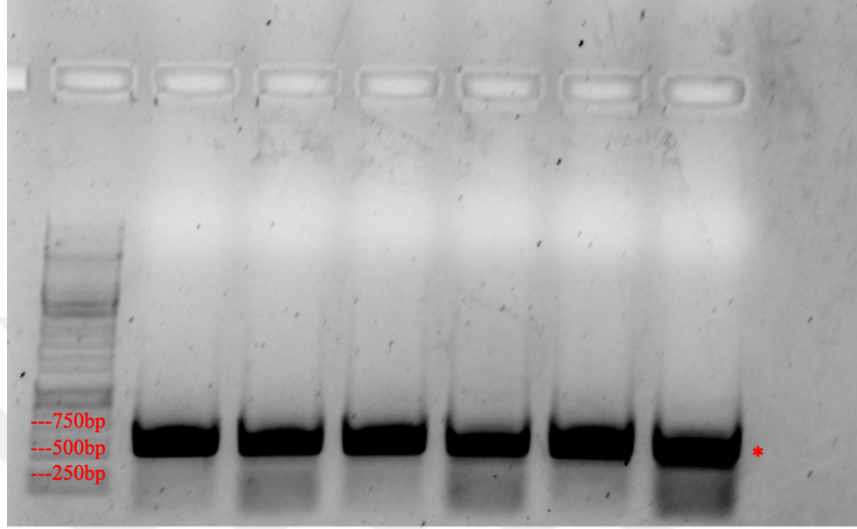
Farklı 6-OHDA dozlarının kullanıldığı hücre canlılığı oranlarının değerlendirilebilmesi için IBM SPSS programı kullanılmıştır. Sonuçların analizinde tek yönlü (*one-way*) ANOVA (analysis of variance), LSD testleri kullanılmıştır. Sonuçlar ± 1 standart sapma ile ifade edilmiştir ve $*p < 0,05$ ve $**p < 0.01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Farklı dozlarda kullanılan saflaştırılmış MYDGF proteinin *in vitro* Parkinson modelindeki hücre canlılık oranının analizi için IBM SPSS programı kullanılmıştır. Sonuçların analizinde tek yönlü (*one-way*) ANOVA (analysis of variance), LSD testleri kullanılmıştır. Sonuçlar ± 1 standart sapma ile ifade edilmiştir ve $*p < 0,05$ ve $**p < 0.01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Uygun PZR Koşullarının Bulunması

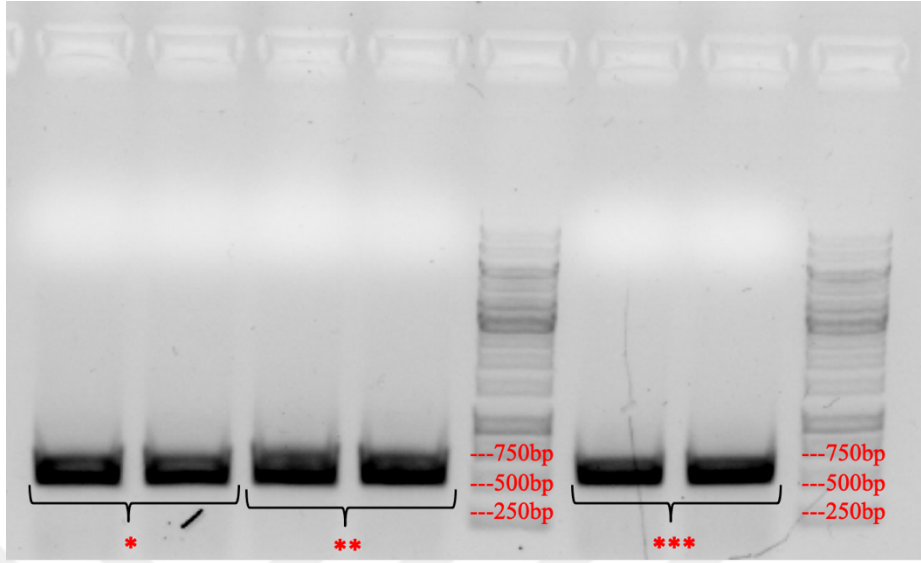
6.1.1. Gradient PZR Sonucu



Şekil 6.1.1. Histidin etiketli C19 geninin gradient PCR sonucu. Kırmızı renkli * işareti ise PZR sonucu elde edilen bantların yerini göstermektedir.

C terminal ucu 6x histidin (His) aminoasidi ile etiketlenmiş MYDGF proteinin üretilmesi için bu etiketi ve Kozak sekansı içeren C19 genine ait primer çiftinin çalıştığı en uygun sıcaklığın bulunması gerekmektedir. Bu amaçla gradient PCR ve farklı polimeraz enzimlerinin denemesi yapılmıştır. İnsan MYDGF geninin kodlama bölgesi, insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) cDNA havuzundan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. Sonuçlar %1 oranında RedSafe (21141, Intron) içeren %1'lik agaroz (UltraPure™ Agarose, 16500-500, Invitrogen) jele yüklenmiş ve 120 Volt'da (PowerPac Universal™, BIO-RAD) yürütülerek elde edilmiştir. Farklı sıcaklıkların denemesi amacıyla oluşturulan PZR sonucunda primer çiftinin tüm sıcaklıklarda istenilen bölgeyi çoğaltabildiği görülmüştür. Belirteç olarak GeneRuler 1 kb DNA ladder (SM0311, Thermo Scientific) kullanılmış ve bantlar 750 ve 500 bp arasında beklenen bölgede bulunmuştur.

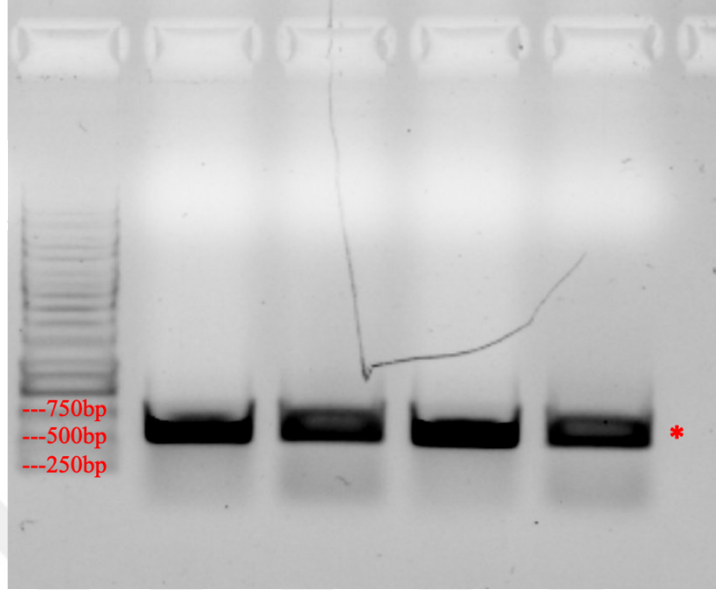
6.1.2. Uygun Polimeraz Enziminin Belirlenmesi



Şekil 6.1.2. Histidin etiketli C19 geninin çoğaltılmasında kullanılan farklı polimeraz enzimlerinden elde edilen PZR sonucu. Kırmızı renkli * işareti Q5 enzimini (Q5® High- Fidelity DNA polymerase, M0491S, BioLabs), ** işareti Q5 enzimi ve GC hızlandırıcının birlikte kullanımı (Q5® High GC Enhancer, Biolabs) ve *** işareti ise Phusion® High- Fidelity DNA Polymerase, M0530S, BioLabs) enzimini temsil etmektedir.

PZR ürünleri 750bp ve 500bp'lik belirteç (SM0311, Thermo Scientific) bantlarının arasında bulunmuştur. Tüm enzimler iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Enzimlerin benzer verimlilikte çalıştıkları görülmüştür.

6.2. Plazmid Hazırlanması için Oluşturulan PZR Sonucu

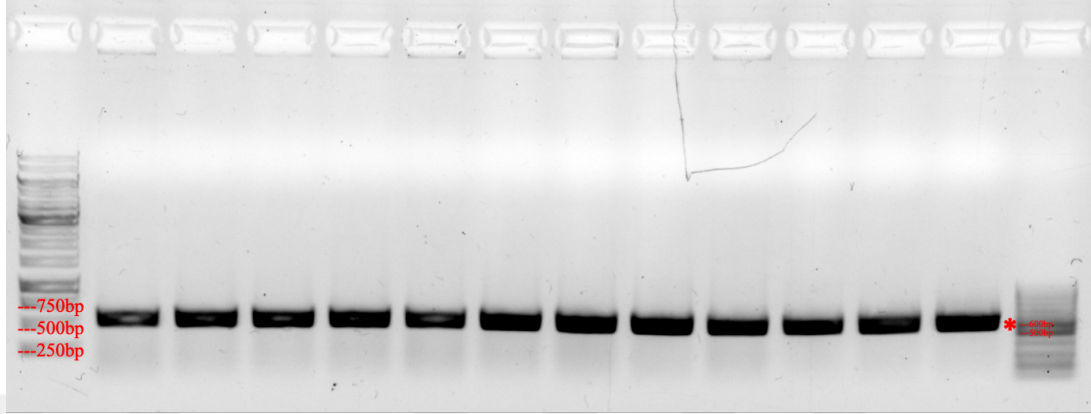


Şekil 6.2. Histidin etiketli C19 genini içeren plazmid hazırlanması için uygulanan PZR sonucu. Kırmızı * işareti ilgili bantların yerini göstermektedir.

750bp ve 500bp'lik belirteç (SM0311, Thermo Scientific) bantlarının arasında bulunan PZR ürünleri beklenen aralıkta (537 bp) bulunmuştur. Buradan elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelden Chemidoc MP görüntüleme sisteminde bulunan UV lambası altında kesilerek alınmıştır. Bu DNA örneği His etiketli C19 genini içeren plazmid hazırlanmasında kullanılmıştır.

6.3. Plazmid Doğrulaması Sonuçları

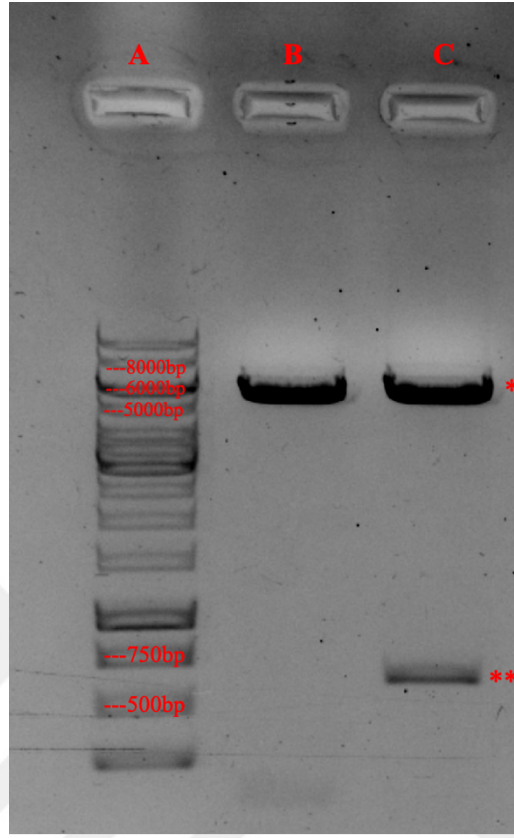
6.3.1. Koloni PZR Sonucu



Şekil 6.3.1. Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden oluşturulan koloni PZR sonucu. Kırmızı * bantların bulunduğu bölgeyi işaret etmektedir.

Koloniler kullanılarak oluşturulan PZR sonucunda 12 koloninin His etiketli C19 genini içerdiği görülmüştür. Belirteç olarak 1kb'lık (SM0311, Thermo Scientific) ve 100bp'lik (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, SM0321, Thermo Scientific) kullanılmış ve her ikisinde de PZR ürününün doğru yerde (537 bp) olduğu görülmüştür.

6.3.2. Yeniden Kesim Enzimlerinin Kullanılması ile Yapılan Plazmid Doğrulama Sonucu

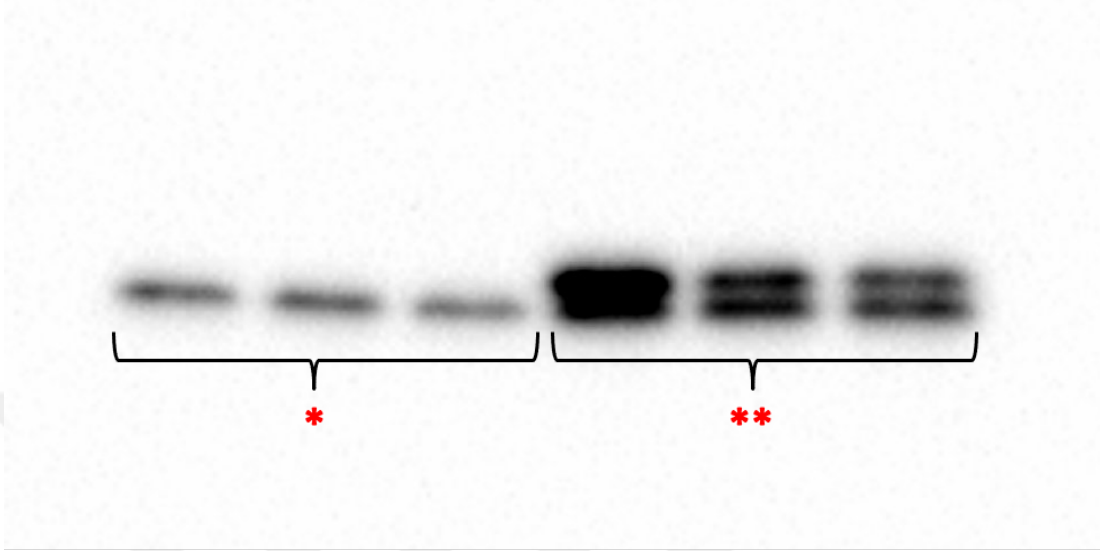


Şekil 6.3.2. Plazmid doğrulaması için yapılan yeniden kesim enzimlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuç. Tek kırmızı * vektör plazmidin bulunduğu yeri, çift kırmızı ** ise His etiketli C19 genini (537 bp) göstermektedir. Belirteç görüntüsü (1kb, SM0311, Thermo Scientific) (A). Vektör plazmid pcDNA3.1(+)'nın (5428 bp) HindIII ve XhoI kesim enzimleri ile kesildikten sonraki jel görüntüsü(B). Hedef geni (His etiketli C19) içeren plazmidin kesim enzimleriyle kesildikten sonra elde edilen jel görüntüsü (C).

Koloni PZR sonucunda His etiketli C19 genini içerdiği gösterilen kolonilerin antibiyotik içeren sıvı besi yerinde çoğaltılması ile elde edilen plazmidler, plazmid izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Plazmid izolasyonundan elde edilmiş olan plazmidlere kesim enzimleri tekrar uygulanarak His etiketli C19 geninin plazmidin içine istenilen şekilde yerleştirildiği gösterilmiştir.

6.4. Transfeksiyon Doğrulaması için Yapılan Western Blot Sonucu

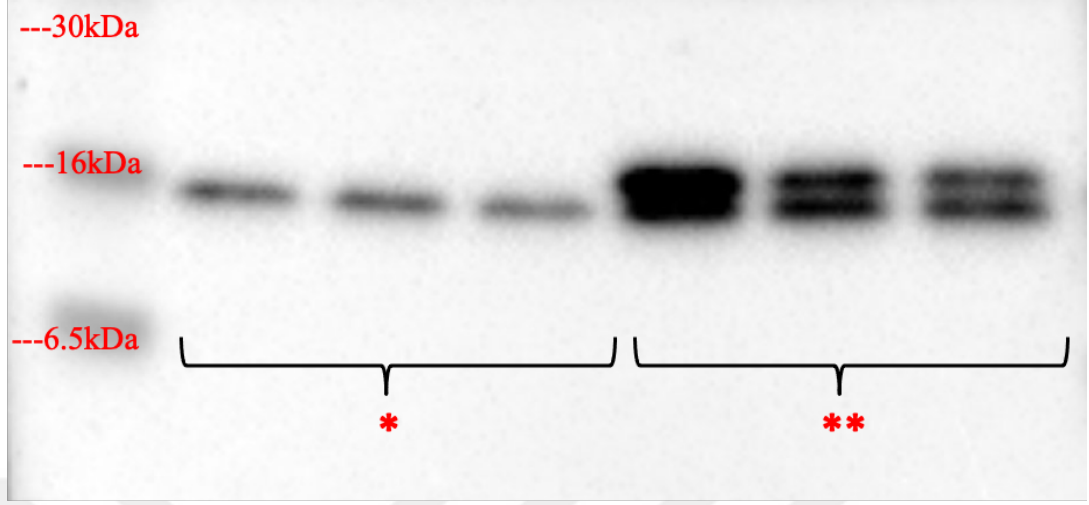
6.4.1. Western Blot Görüntüsü



Şekil 6.4.1. Transfeksiyon sonrası hücrelerden elde edilen protein örneklerinden yapılan Western Blot sonucu. Kırmızı *; boş plazmid ile uygulanan transfeksiyondan, kırmızı ** işaretleri ise His etiketli C19 genini içerecek şekilde hazırlanmış olan plazmid ile yapılan transfeksiyondan elde edilen protein örnekleri ile yapılmış western blot sonrası görüntülenen bantları göstermektedir.

His etiketli C19 genini içermeyen boş plazmid kullanılarak transfeksiyon yapıldığında endojen olarak HEK293-T hücrelerinde bulunan MYDGF miktarı gösterilmiştir. His etiketli C19 gen bölgesini içere plazmid ile yapılan transfeksiyonda ise MYDGF protein miktarının anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

6.4.2. Kullanılan Belirteç ile Birleştirilmiş Western Blot Sonucu



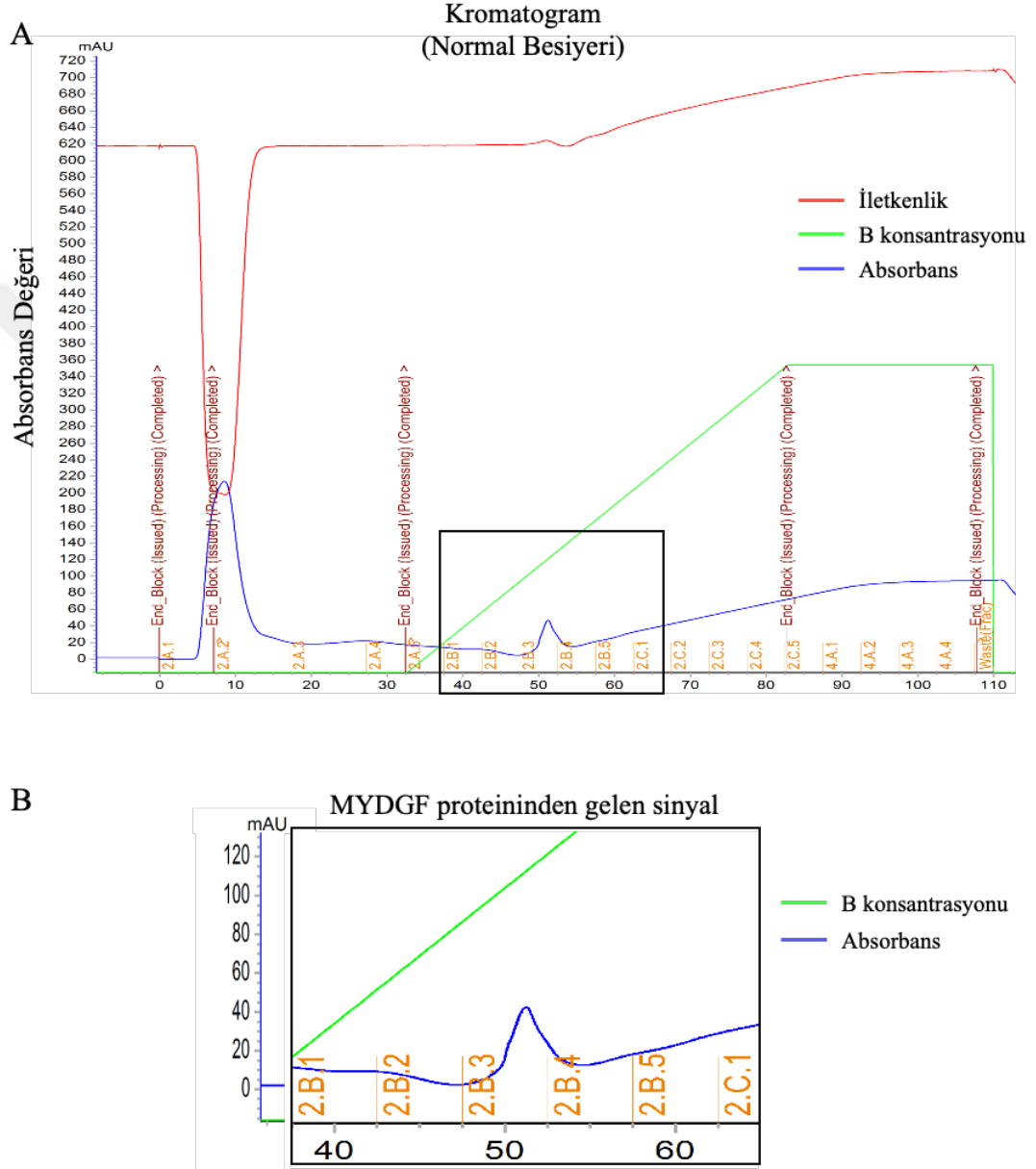
Şekil 6.4.2. Transfeksiyon sonrası hücrelerden elde edilen protein örneklerinden yapılan Western Blot sonucu. Western Blot sonucu belirteç görüntüsü ile birleştirilmiştir. Kırmızı *; boş plazmid ile uygulanan transfeksiyondan, kırmızı ** işareti ise His etiketli C19 genini içerecek şekilde hazırlanmış olan plazmid ile yapılan transfeksiyondan elde edilen protein örnekleri ile yapılmıştır.

His etiketli C19 genini içermeyen boş plazmid kullanılarak transfeksiyon yapıldığında endojen olarak HEK293-T hücrelerinde bulunan MYDGF miktarı gösterilmiştir. His etiketli C19 gen bölgesini içeren plazmid ile yapılan transfeksiyonda ise MYDGF protein miktarının boş plazmid kullanılarak yapılmış transfeksiyon sonrası ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Yaklaşık 16kDa boyutunda olan MYDGF, belirteçte bulunan 16kDa bandının olduğu hizada olması gereken yerde gözlemlenmiştir. Belirteç olarak Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder (BioLegend) kullanılmıştır.

6.5. MYDGF Proteinin Saflaştırılması

6.5.1. Afinite Kromatografisi

6.5.1.1. Normal Besiyeri Kullanımında Elde Edilen Sonuç

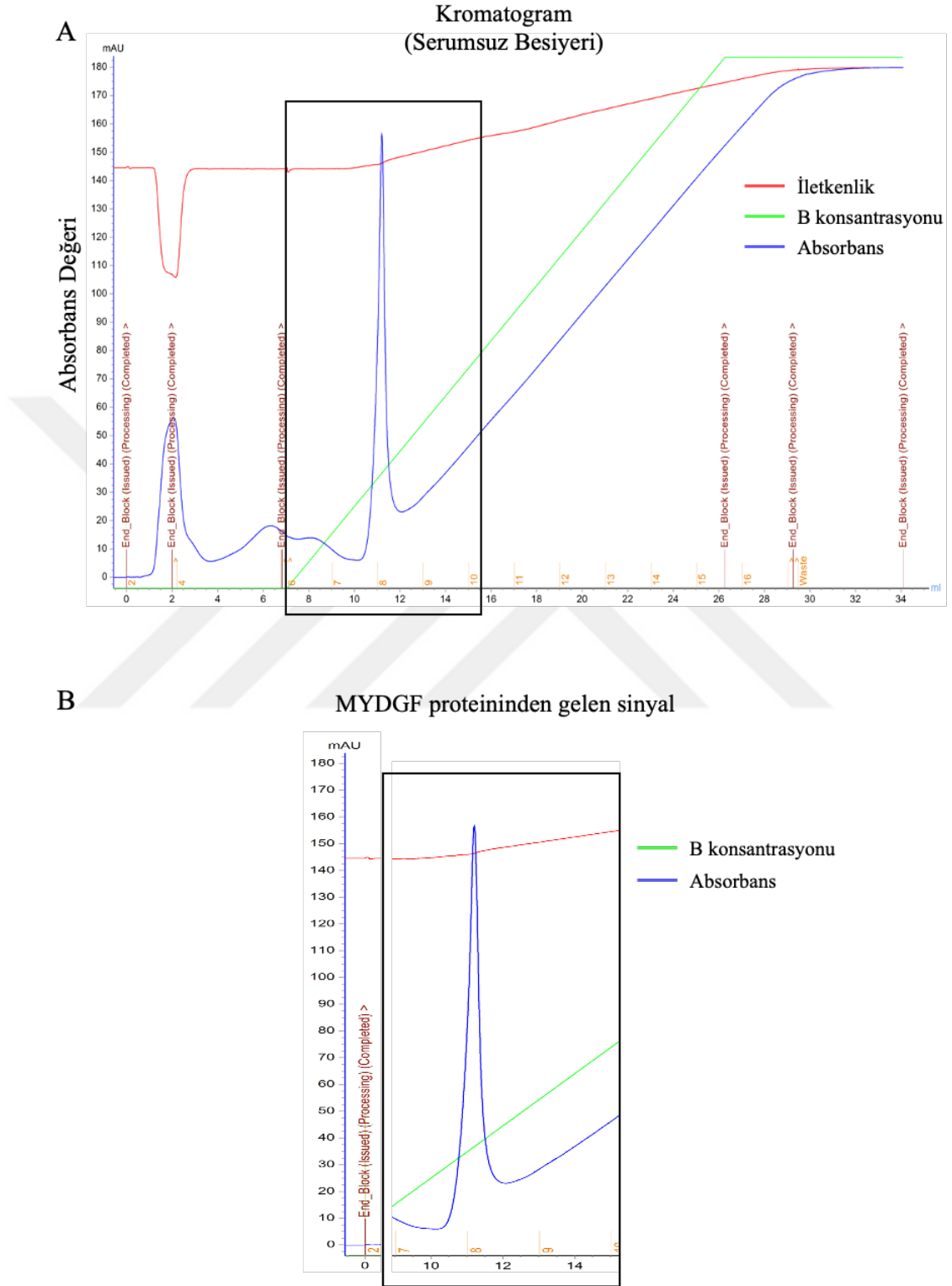


Şekil 6.5.1.1. Normal besiyerinin saflaştırılması. ÄKTA Avant 150 cihazı ve Histrap kolonu kullanılarak normal besiyerinin saflaştırılması sonrası elde edilen kromatogram (A). Aynı kromatogramda MYDGF proteininden gelen sinyalin daha yüksek büyütmede gösterimi (B).

MYDGF proteininin histidin ile etiketli olmasından yararlanılarak afinite kromatografisi uygulanmıştır. ÄKTA Avant 150 cihazı ve HisTrap™ kolonu (GE17-5248-01, HisTrap™ High Performance, GE Healthcare) kullanılmıştır. HEK-293T hücre hattının normal besiyeri kullanıldığında sinyal görölmüştür. İmidazol gradienti oluşturularak MYDGF'ye ait olduğu düşünölen bu sinyal elüe edilmiştir. Aynı sinyalin büyütilerek gösterimi de (B) bulunmaktadır.



6.5.1.2. Serum İçermeyen Besiyeri Kullanıldığında Elde Edilen Sonuç

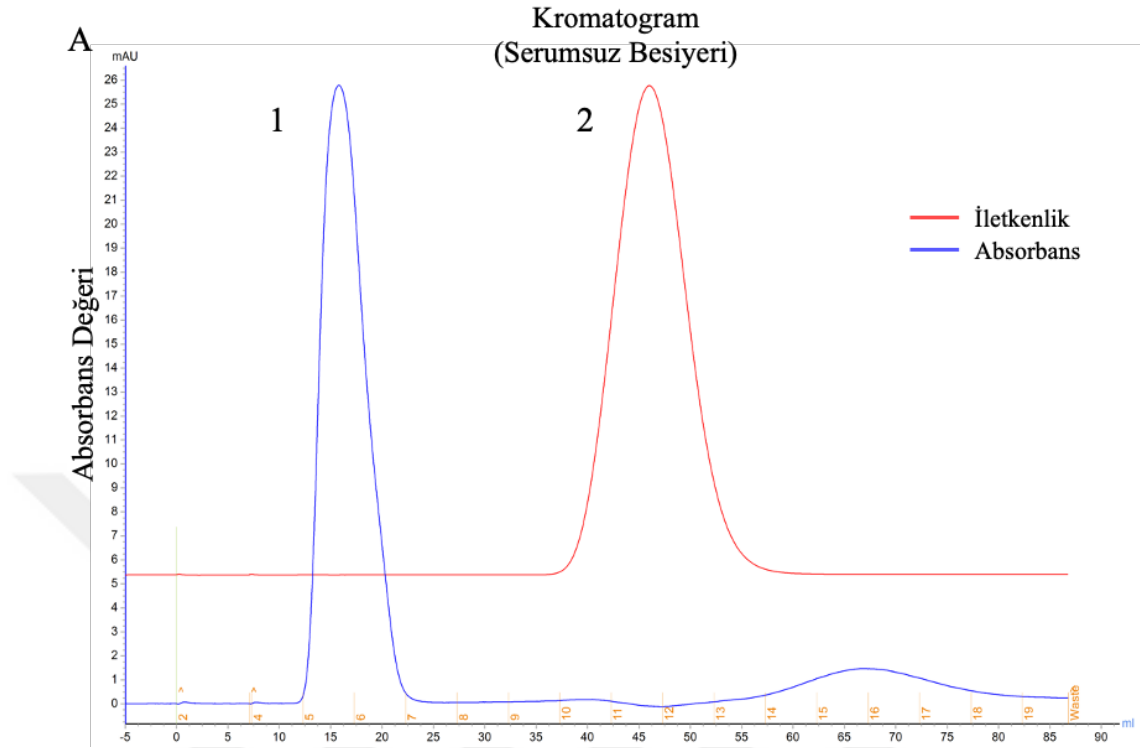


Şekil 6.5.1.2. Serumsuz besiyerinin saflaştırılması. ÄKTA Avant 150 cihazı ve *Histrap* kolonu kullanılarak serumsuz besiyerinin saflaştırılması sonrası elde edilen kromatogram (A). Aynı kromatogramda MYDGF proteininden gelen sinyalin daha yüksek büyütmede gösterimi (B).

MYDGF proteininin histidin ile etiketli olmasından yararlanılarak afinite kromatografisi serumsuz besiyeri kullanılarak da yapılmıştır. ÄKTA Avant 150 cihazı ve HisTrap™ kolonu (GE17-5248-01, HisTrap™ High Performance, GE Healthcare) afinite kromatografisi için kullanılmıştır. HEK-293T hücre hattında transfeksiyonun ertesı günü serum içermeyen besiyeri kullanıldığında daha büyük sinyal görölmüştür. İmidazol gradienti oluşturularak MYDGF'ye ait olduğu düşünölen bu sinyal elüe edilmiştir. Aynı sinyalin büyütölerək gösterimi de (B) bulunmaktadır.

Şekil 6.5.1.1 ve Şekil 6.5.1.2 karşılaştırıldığında normal besiyeri kullanıldığında MYDGF'ye ait sinyalin düşük olduğu gösterilmiştir. MYDGF saflaştırılmasında serumsuz besiyerinin transfeksiyondan 24 saat sonra uygulanması bu proteinin miktarını önemli ölçüde arttırdığı ve elde edilen sinyalin de arttığı görölmüştür.

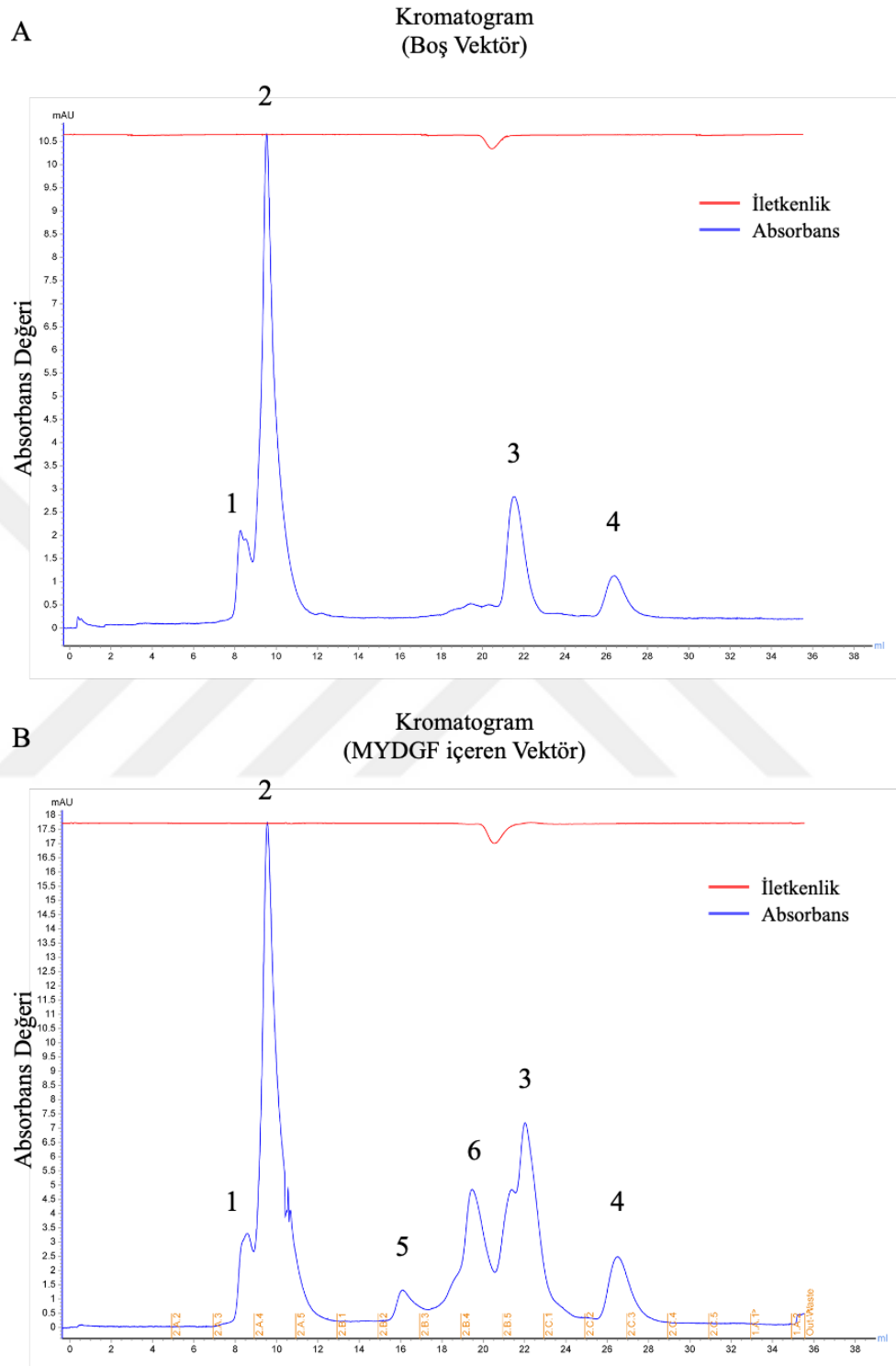
6.5.2. Tampon Çözelti Değişimi



Şekil 6.5.2. Elde edilen fraksiyonlardan iyonların arındırılması. ÄKTA Avant 150 cihazı ve *Desalting* kolonu kullanılarak serumsuz besiyerinin saflaştırılması sonrası elde edilen fraksiyonların iyonlardan arındırılması ile elde edilen kromatogram (A). Kromatogramda 1 numara ile gösterilen sinyal MYDGF proteininden, 2 numaralı sinyal ise ilk işlemdeki tampon çözeltilerin iyonlarından gelmektedir.

Tampon çözelti değişimi işlemi için ise *desalting* kolonu (GE17-1408-01, HiTrap™ *Desalting*, GE Healthcare) ile ÄKTA Avant 150 cihazı kullanılmıştır. Bu işlem ile afinite kromatografisinden elde edilen örnekler afinite kromatografisinde elüe edilmekte kullanılan imidazolden uzaklaştırılmış ve boyut dışlama kromatografisi için uygun hale getirilmiştir.

6.5.3. Boyut Dışlama (Jel Filtrasyon) Kromatografisi

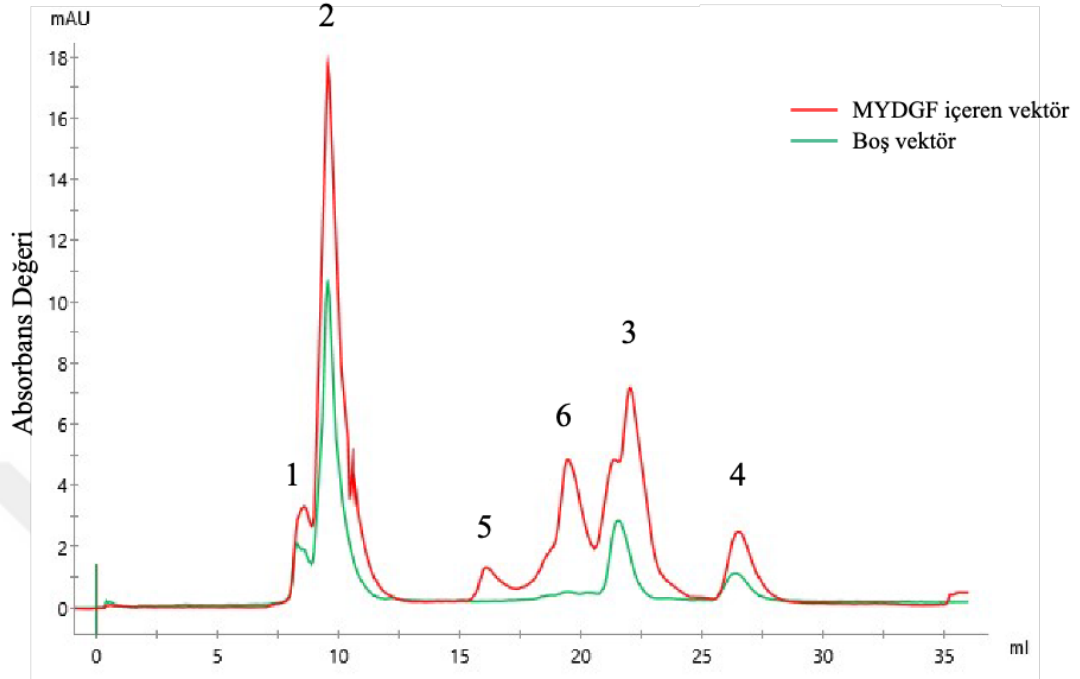


Şekil 6.5.3.1. Boyut dışlama kromatografisi (*size exclusion chromatography, SEC*) sonuçları. ÄKTA Avant 150 cihazı ve SEC kolonu kullanılarak boş vektör içeren (A) veya MYDGF içeren (B) vektör kullanılarak elde edilen besiyerinin *desalting* (tampon çözelti değişimi) sonrası boyut dışlama kromatografisinden elde edilen sonuçları.

Boş vektör plazmid ve MYDGF içeren plazmide boyut dışlama kromatografisi uygulandığında farklı sinyaller elde edilmiştir (5 ve 6 numaralı sinyaller). Bulunan farklı sinyallerin MYDGF proteinine ait olduğu düşünülmüştür ve Western Blot analizi yapılmıştır. 1,2,3 ve 4 numaralı sinyallerin ise besiyerinden kaynaklanan farklı proteinler olduğu düşünülmektedir.



Kromatogram
(MYDGF içeren Vektör)

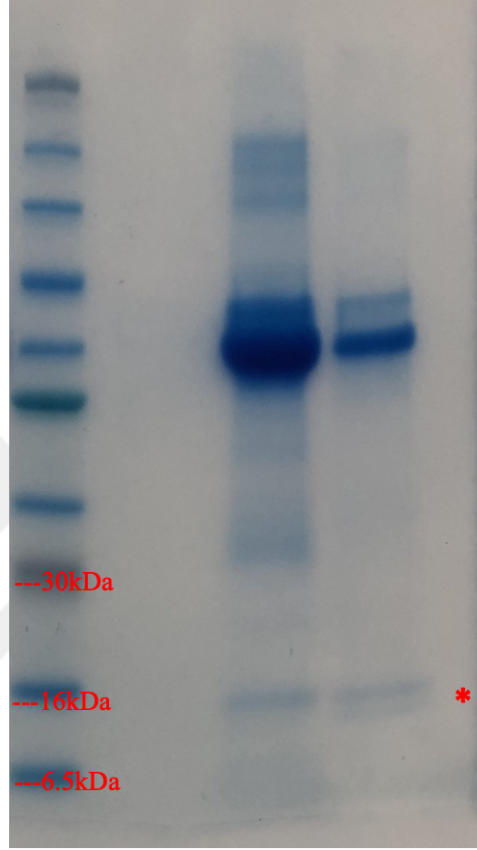


Şekil 6.5.3.2. Boyut dışlama kromatografisi (*size exclusion chromatography, SEC*) sonuçlarının karşılaştırılması. ÄKTA Avant 150 cihazı ve SEC kolonu kullanılarak boş vektör (yeşil renk) veya MYDGF içeren (kırmızı renk) vektör ile transfeksiyon sonucu elde edilen besiyerinin boyut dışlama kromatografisi yapılmıştır. Gelen sinyallerin daha iyi karşılaştırılabilmesi için alınan kromatogramlar üst üste konulmuştur.

Kromatografiden elde edilen iki farklı sonuç üst üste gelecek şekilde gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 1, 2, 3 ve 4 ile numaralandırılan sinyallerin boş vektörden, dolayısı ile besiyerinden geldiği düşünülmektedir. 5 veya 6 ile numaralandırılan sinyallerin ise MYDGF proteininden geldiği düşünülmektedir. Sinyallerden elde edilen fraksiyonlar kullanılarak yapılan Western Blot analizi sonucunda (**Şekil 6.6.2**) yalnızca 5 numaralı sinyalin MYDGF proteinine ait olduğu gösterilmiştir.

6.6. MYDGF Protein Üretiminin Doğrulanması

6.6.1. Protein Örneklerindeki MYDGF Varlığının Gösterilmesi

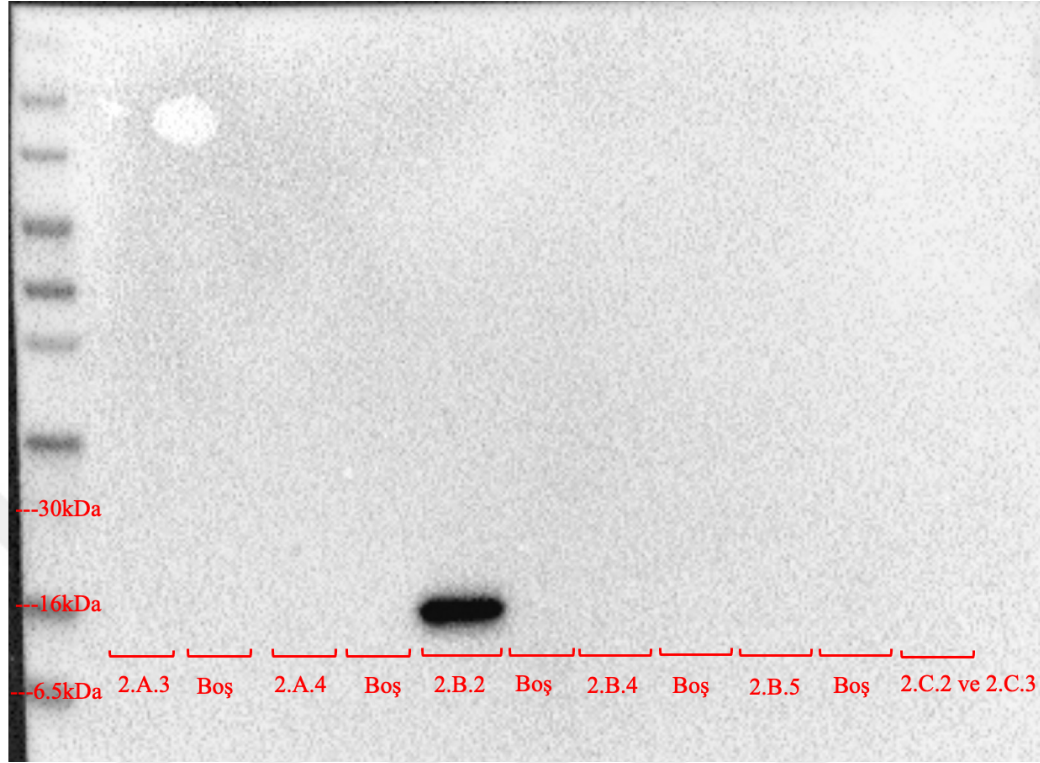


Şekil 6.6.1. Histrap kolon kullanımından önce ve sonra besiyeri içerisinde bulunan proteinlerin SDS-PAGE gösterimi.

Kırmızı * yaklaşık 16 kDa boyuttaki MYDGF proteininin olduğu bantların yerini göstermektedir. InstaBlue boyası ile boyanan stain-free jelden elde edilen bu görüntüde mavi bantlar farklı proteinleri göstermektedir.

Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder (BioLegend) belirteci yardımıyla MYDGF varlığı yaklaşık 16 kDa'a denk gelen yerde gösterilmiştir. Proteinler belirsiz konsantrasyonda yüklenmiştir. Histrap kolonu kullanılmadan önce besiyerinde çok farklı proteinlerin bulunmasına rağmen bu proteinler büyük ölçüde Histrap kolon vasıtasıyla uzaklaştırıldığı görülmüştür.

6.6.2. SEC sonrası MYDGF Varlığının Gösterilmesi



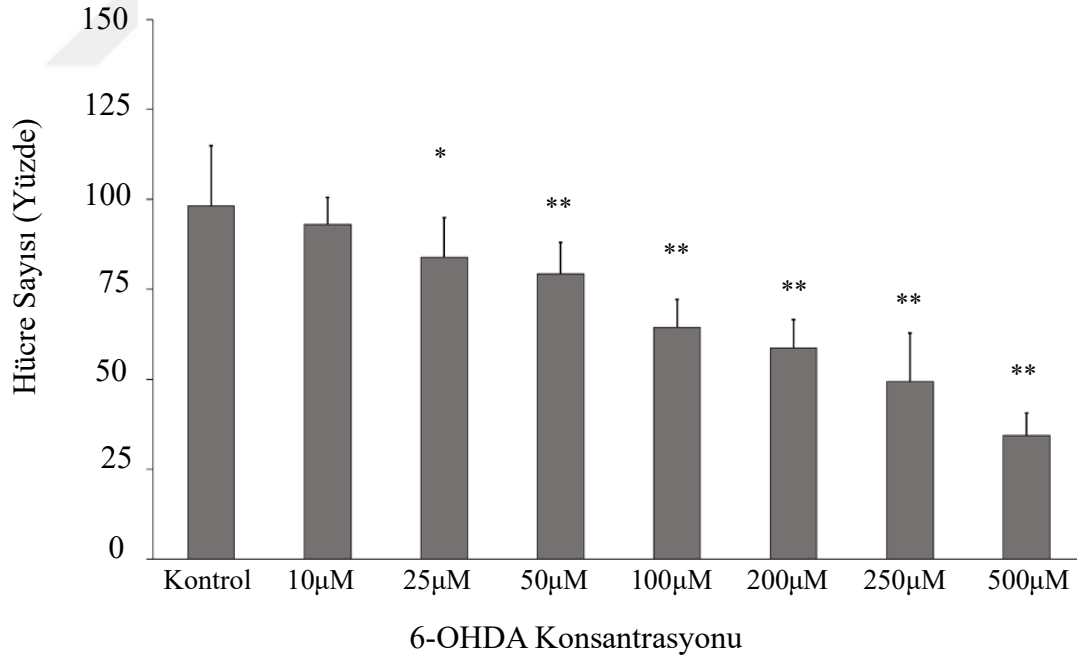
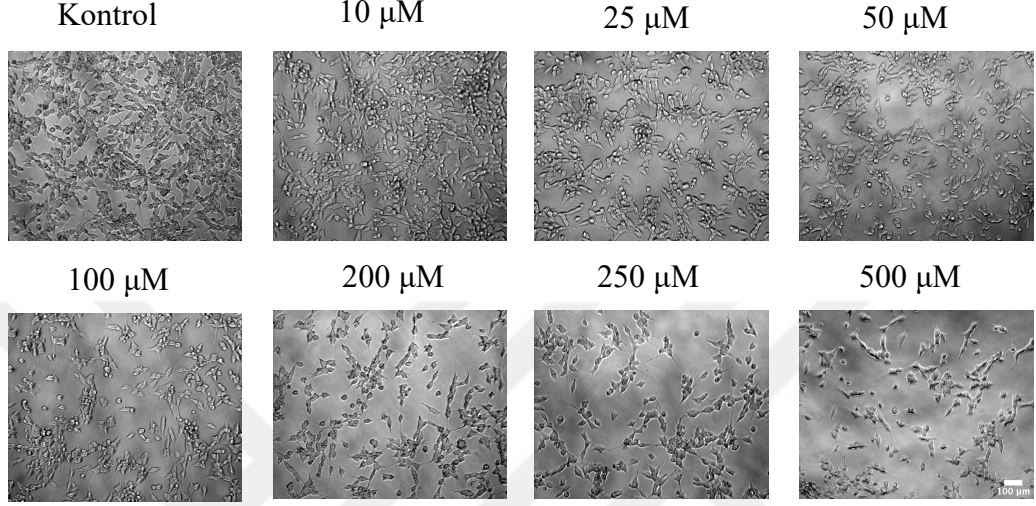
Şekil 6.6.2. Boyut dışlama kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonların Western Blot sonucu. Elde edilen fraksiyonlardan yalnızca 2.B.2 (Şekil 6.5.3.1' deki 5 numaralı sinyale ait) fraksiyonunda MYDGF proteini bulunmuştur.

MYDGF proteinin varlığı MYDGF primer antikoru (695802, BioLegend) ve ona uygun sekonder antikoru (HRP Goat anti-rat IgG, 405405, BioLegend) 1:5000 oranında kullanılarak gösterilmiştir. Yalnızca 2.B.2 sinyaline ait olan örnekte MYDGF'ye rastlanmıştır. Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder (BioLegend) belirteç olarak kullanılmıştır.

6.7. *In vitro* Parkinson Modeli ve MYDGF'nin Tedavi Edici Etkisi

6.7.1. Kullanılan 6-OHDA Dozunun Belirlenmesi

SH-SY5Y Hücre Canlılığı



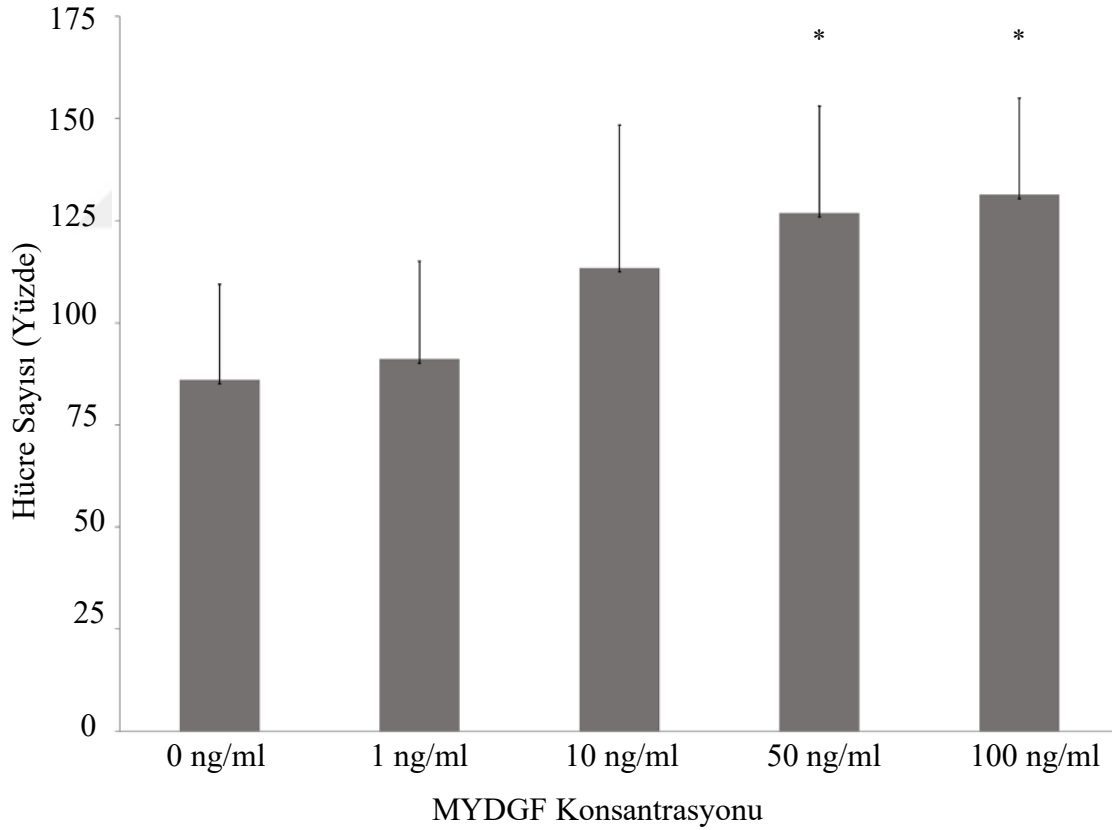
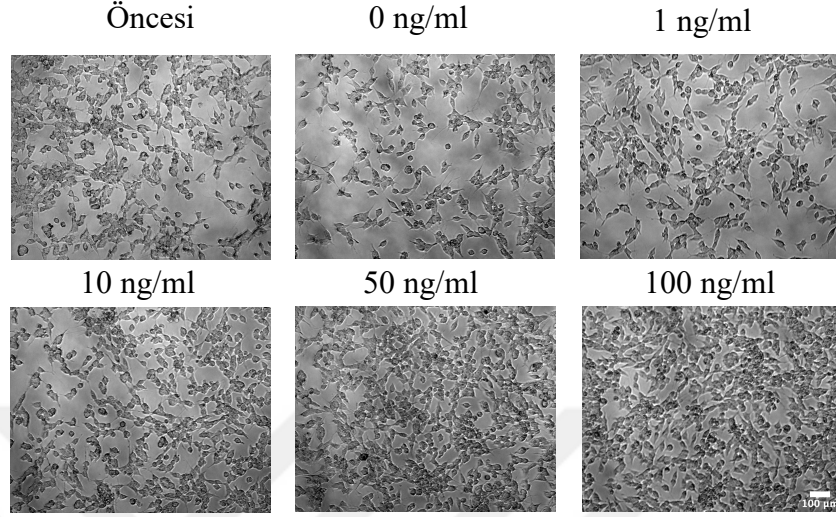
Şekil 6.7.1. Farklı dozlarda 6-OHDA uygulandığında hücre sayısının yüzdelik değişimi. Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılığı (* $p<0,05$ ve ** $p<0,01$) göstermektedir (Bar 100 µm'yi göstermektedir.).

6-OHDA farklı dozlarda (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 250 μ M ve 500 μ M) uygulanmış ve kontrol grubuna göre hücre sayıları karşılaştırılmıştır. Hücrelere 25 μ M 6-OHDA uygulandığında p değeri $<0,05$ iken 25 μ M üzerindeki tüm dozlarda p değeri $<0,01$ olarak bulunmuştur. *In vitro* Parkinson modeli için kontrol grubuna kıyasla hücre sayısını anlamlı bir şekilde azaltan ($p<0,01$ değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösteren) 6-OHDA dozlarından 50 μ M ve 100 μ M 6-OHDA deney gruplarına uygulanmak üzere seçilmiştir.



6.7.2. 50 μ M 6-OHDA ile Oluşturulan *in vitro* Parkinson Modelinde MYDGF etkisi

50 μ M 6-OHDA Uygulandığında SH-SY5Y Hücre Canlılığı



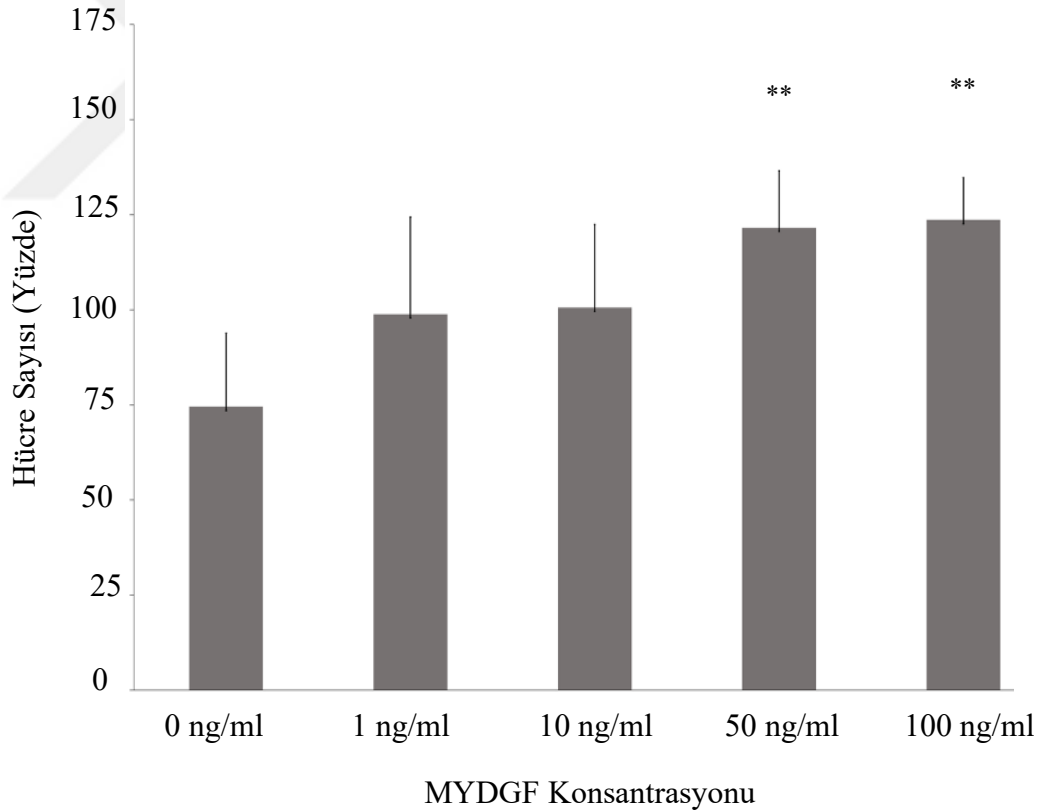
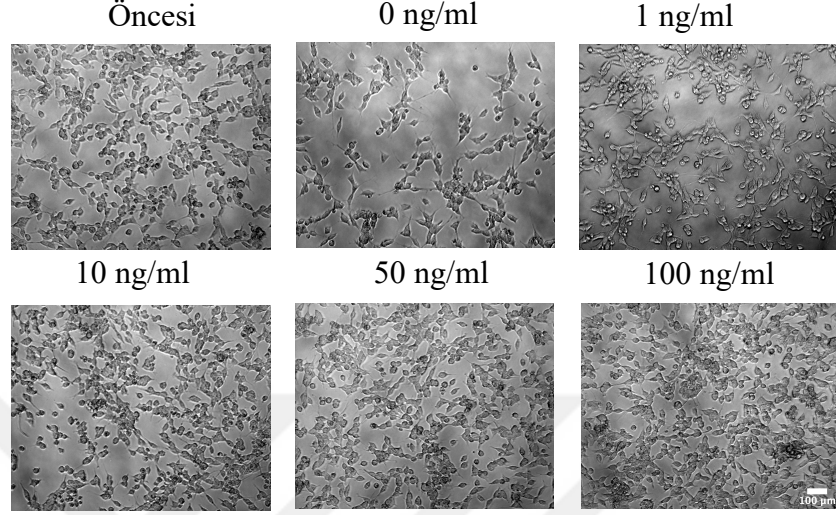
Şekil 6.7.2. *In vitro* Parkinson modelinde (50 μ M 6-OHDA ile oluşturulan) farklı konsantrasyonlarda MYDGF uygulandığında hücre canlılığı sonucu. (* $p < 0,05$) taşıyıcı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılığı göstermektedir (Bar 100 μ m'yi göstermektedir.).

50 μ M 6-OHDA ile *in vitro* Parkinson modeli oluşturularak farklı oranlarda (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml) MYDGF proteini uygulanmıştır. 50 ng/ml ve 100 ng/ml MYDGF' nin 50 μ M 6-OHDA ile *in vitro* Parkinson modelinde MYDGF uygulanmayan grup ile kıyaslandığında hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür (*p<0,05).



6.7.3. 100 μ M 6-OHDA ile Oluşturulan *in vitro* Parkinson Modelinde MYDGF etkisi

100 μ M 6-OHDA Uygulandığında SH-SY5Y Hücre Canlılığı



Şekil 6.7.3. *In vitro* Parkinson modelinde (100 μ M 6-OHDA ile oluşturulan) farklı konsantrasyonlarda MYDGF uygulandığında hücre canlılığı sonucu. (** p<0,01) taşıyıcı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılığı göstermektedir (Bar 100 μ m'yi göstermektedir.).

100 μ M 6-OHDA ile *in vitro* Parkinson modeli oluşturularak farklı oranlarda MYDGF proteini uygulanmıştır. MYDGF uygulaması için 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml 50 ng/ml ve 100 ng/ml oranları seçilmiştir. MYDGF' nin 100 μ M 6-OHDA ile *in vitro* Parkinson modelinde MYDGF uygulanmayan grup ile kıyaslandığında hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür (*p<0,01).



7. TARTIŞMA

Bu tezde, rekombinant insan MYDGF proteininin üretilip saflaştırılması ve elde edilen proteinin *in vitro* Parkinson hastalığı modeli üzerindeki tedavi edici etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Rekombinant insan MYDGF proteininin üretilmesi afinite kromatografisi ve jel filtrasyon (boyut dışlama) kromatografisi yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Parkinson hastalığının *in vitro* modeli ise 6-OHDA kullanılarak SH-SY5Y hücreleri üzerinde oluşturulmuştur.

Histidin işaretli proteinlerin üretilmesi; rekombinant proteinlerin saflaştırma tekniklerinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olmaktadır (Z. Lin ve ark., 2015). Öncelikle, rekombinant MYDGF proteininin üretilmesi için proteinin C terminalinde 6x histidin aminoasidi de içermesini sağlayacak şekilde primer çifti dizayn edilmiştir. Bu primer çiftlerinin çalıştığı en uygun koşulların bulunması için gradient PZR oluşturulmuştur. Gradient PZR sonucunda denenmiş olan tüm sıcaklık koşullarında benzer sonuçlar elde edilmiştir (**Şekil 6.1.1**). Yüksek hız ve yüksek performans ile çalıştıkları bilinen ticari olarak satılmakta olan Taq DNA polimerazlar (Q5® High-Fidelity DNA polymerase tek başına ve Q5® High GC Enhancer ile birlikte ve Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase) ile PZR'ları oluşturulmuştur. PZR'da kullanılan Taq polimeraz enzimleri çeşitlilik göstermektedir. En verimli polimerazın seçilmesi için oluşturulan bu PZR sonucunda enzimlerin benzer verimlilikte çalıştıkları görülmüştür (**Şekil 6.1.2**). Devam eden deneylerde istenilen gen bölgesinin çoğaltılmasında Phusion® High-Fidelity DNA Polimeraz kullanılmıştır. Hedef gen bölgesinin çok miktarda üretilmesi amacıyla belirlenen koşullarda PZR reaksiyonu oluşturulmuş (**Tablo 2, Tablo 3**) ve PZR sonucu bantların doğru uzunlukta oldukları (537 bp) görülmüştür (**Şekil 6.2**).

Moleküler klonlama teknikleri kesim endonükleazlarının keşfinden bu yana önemli ölçüde gelişmiştir ve rekombinant DNA teknolojisi günümüzde rutin bir uygulama olarak kullanılmaktadır (Celie ve ark., 2016). Klonlama için PZR sonrası doğru DNA dizilimini gösteren bantlar Chemidoc MP görüntüleme sisteminde bulunan UV lambası altında %1'lik agaroz jelden kesilmiştir. Darası alınmış 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınıp tartıldıktan sonra kullanılan kit ile DNA örneğinin

jelden geri kazanılması sağlanmıştır. PZR ürünü ve vektör plazmid pcDNA3.1(+) HindIII ve XhoI kesim enzimleri ile kesildikten sonra DNA temizleme protokolü kit yardımıyla uygulanmıştır. Elde edilen örneklerin konsantrasyonları ölçülmüş ve çevrimiçi NEBioCalculator programı kullanılarak ligasyon işlemi için gereken konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Ligasyon için uygun koşullar sağlandıktan ve reaksiyon tamamlandıktan sonra kompetent hale getirilmiş *E.coli* DH5 α bakteri suşu ile transformasyon gerçekleştirilmiştir.

Transformasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin gösterilmesi amacıyla ampisilin içeren bakteri katı besiyeri LB agar üzerinde koloni gelişiminin gösterilmesi sağlanmıştır. Kullanılan vektör pcDNA3.1(+) ampisiline karşı direnç geni içerdiğinden başarılı bir şekilde oluşan kolonilerin hem C19 genini hem de vektör DNA taşıdıklarını düşünülmüştür. Oluşan kolonilerin pcDNA3.1(+) vektörünün kendi üzerine kapanmasından kaynaklı oluşabileceği veya herhangi başka ampisilin dirençli bakteriden kaynaklı koloni oluşumu görülebileceği için koloni PZR yapılmıştır. Çift distile su ile kolonilerin seyreltilmesiyle elde edilen örnek DNA taslağı olarak kullanılarak koloni PZR oluşturulmuştur. His etiketli C19 genine ait primer çiftleri kullanıldığında kolonilerin hem His etiketli C19 genini hem de pcDNA3.1(+) vektörüne ait ampisilin direnç genini (ampisilinli LB agar üzerinde gelişebildiklerinden dolayı) içerdikleri gösterilmiştir (**Şekil 6.3.1**). Çift distile su ile kolonilerin seyreltilmesinden elde edilen örnek, antibiyotikli sıvı besi yeri LB broth içerisinde çoğaltıldıktan sonra kit yardımıyla plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu sağlanan plazmide kesim enzimleriyle tekrar kesim işlemi yapılmış ve His etiketli C19 gen bölgesini içeren plazmidin doğruluğu gösterilmiştir (**Şekil 6.3.2**). Kesilen plazmid hem vektör plasmidi hem de His etiketli C19 gen bölgesinin uzunluğunu gösteren alanlarda bant vermiştir. Ayrıca oluşturulan plasmidin doğruluğu sekanslamaya gönderilerek de sağlanmıştır. Doğrulaması yapılan plasmidin çoğaltılması transformasyon yöntemi ile tekrar gerçekleştirilip plasmid büyük miktarlarda üretilmiştir. LB broth yani sıvı besi yeri ve antibiyotik kullanılarak çoğaltılan bakterilerden plasmid izolasyonu yapılmıştır ve plasmidlerin konsantrasyonları IMPLEN cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Plasmidlerin konsantrasyonları belirlendikten sonra çift distile su ile 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş plasmidler transfeksiyon işleminde kullanılmıştır.

Transfeksiyon işleminde Opti-MEM, Lipofektamin 2000, hazırlanıp çoğaltılan ve konsatrasyonu belirlenmiş plazmidler kullanılmıştır. 10 cm'lik hücre plakalarına 1,2 milyon HEK293T hücresi ekilmiştir. Hücrelerin ekildiklerinin ertesi günü hedef geni içermeyen boş plazmid (pcDNA3.1(+)) ve hedef gen olan His-tag'li C19 geni Lipofektamine 2000 transfeksiyon karışımını oluşturmak üzere hazırlanmıştır. Transfeksiyon karışımı 10 dakika kabin içerisinde bekletildikten sonra hücrelere damla damla verilmiştir. İnkübatörde 6 saat bekletildikten sonra lipofektamine içeren besi yeri uzaklaştırılmış ve taze HEK293T besi yeri ile değiştirilmiştir. Başarılı bir transfeksiyon için, normal fizyolojik koşullar altında negatif yük taşıyan nükleik asit, aynı zamanda negatif yük taşıyan hücre zarı ile temas etmesi gerekmektedir. Lipofektamin 2000, nükleik asit molekülleriyle bir kompleks oluşturarak hücre zarının nükleik asidi elektrostatik olarak itmesini yenmesini ve hücre tarafından alınmasını sağlayan katyonik bir lipozom formülasyonu olmaktadır (Dalby ve ark., 2004).

Besi yeri değişiminden 24 saat sonra besi yeri serum içermeyen besi yeri ile değiştirilmiştir. Serum içermeyen besi yeri ise eklenildikten sonraki gün toplanılmış ve kromatografi yöntemi kullanılmak üzere saklanmıştır. Hücrelerden ise protein izolasyonu yapıp boş plazmid ve His etiketli MYDGF miktarlarının kıyaslanması için Western Blot yöntemi uygulanmıştır (**Şekil 6.4.1**). MYDGF endojen olarak her hücrede bulunmasından ötürü boş plazmid ile oluşturulan transfeksiyon sonrası MYDGF proteinin varlığı gösterilmiştir. C19 genini içeren plazmid ile yapılan transfeksiyon sonrası ise MYDGF miktarının arttırılmış olduğu gösterilmiştir. MYDGF yaklaşık 16kDa ağırlığında bir protein olmasından ötürü Western Blot sisteminde kullanılan belirteçte bulunan yaklaşık 16kDa bandının hizasında örnekler ait bantlar görülmüştür (**Şekil 6.4.2**). Bu sonuçlardan yola çıkılarak istenildiği gibi MYDGF miktarının başarılı bir şekilde arttırılabildiği görülmüştür. Daha sonra kromatografi yöntemi kullanılarak bu proteinin saflaştırılması sağlanacağından yüksek konsantrasyonda protein elde edebilmek önemli noktalardan biri olmuştur.

Rekombinant protein üretimi tanı ve tedavi amaçlı proteinler elde etmek için araştırmalarda giderek daha yaygın kullanılan bir yöntem olmaktadır. Seçilen üretim aşamaları proteinin düzgün olarak fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için önemlidir (Oliveira & Domingues, 2018). Transfeksiyon işlemi laboratuvarında rutin olarak

kullanılan (normal) besiyeri ve serum içermeyen besiyerinde denenmiştir. Serum içermeyen ortamda bulunmaları hücrelerin daha çok miktarda MYDGF proteini üretmelerini sağlamıştır. Afinite kromatografisi hem normal besiyeri hem de serumsuz besi yeri uygulanarak yapılmıştır. Normal besi yeri ile transfeksiyon yapıldığında da MYDGF'ye ait sinyal görülmüştür (**Şekil 6.5.1.1**). İlk oluşan tepecik kolona bağlanmayan proteinlere ait olmaktadır. İmidazol içeren solüsyon uygulanmaya başladıktan sonra oluşan tepecik ise MYDGF'ye ait olan absorbands değerine bağlı tepe noktasını göstermektedir. Serum içermeyen besi yeri kullanıldığında ise MYDGF'ye ait olduğu düşünülen absorbands değerine göre oluşan tepe daha yüksek sinyal içermiştir (**Şekil 6.5.1.2**). Buradan elde edilen sonuçlara göre serum içermeyen ortam oluşturulan örneklerde transfeksiyon daha verimli şekilde gerçekleşmiştir.

Rekombinant proteinler biyolojik ve biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır. Rekombinant proteinler önceleri sadece uzmanlar tarafından üretilebiliyorken günümüzde ticari olarak satın alınabilen sistemler sayesinde daha yaygın bir teknoloji haline gelmiştir (Ferrer-Miralles ve ark., 2015). Rekombinant insan MYDGF proteinin üretilebilmesi için tasarlanmış primerler kullanılarak üretilen proteinin C terminalinde 6 adet histidin aminoasidini bulundurması sağlanmıştır. Protein saflaştırma çalışmalarında çokça kullanılan his etiketi sayesinde MYDGF'nin metal iyon bazlı rezinlere olan afinitesi kullanılarak, MYDGF boyut dışlama kromatografisi öncesi ön saflaştırılmıştır. Kullanılan IMAC kolon nikel bazlı rezin temelli HisTrap™ kolonu olmuştur. Bu kolona bağlanan His etiketli MYDGF proteini nikelde daha yüksek afinite gösteren imidazol sayesinde elüe edilmiş ve konsantre edilip jel filtrasyon kromatografisi uygulanmak üzere hazırlanmıştır. Afinite kromatografisi (IMAC) spesifik bağlanma sağlaması ve düşük imidazol konsantrasyonu ile seçiciliği kontrol edebilmesi dolayısıyla avantajlı bir kromatografi yöntemidir (Gräslund ve ark., 2008).

Jel filtrasyon kromatografisinden önce tampon çözeltinin değişimi gerekmiştir. Bu amaçla *desalting* kolonu olarak HiPrep kolonu seçilmiş ve kullanılmıştır. Bu kolonun kullanılması ile proteinler imidazol içermeyen bir solüsyon içerisinde bulunacak hale getirilmiştir (**Şekil 6.5.2**). Kolon içerisinden geçirilen büyük molekül olan proteinlerin kolonu en erken terketmeleri ve iyonların kolon içerisinde bulunan aralıklı yapılarda zaman kaybederek ayrışması prensibine dayanarak çalışmıştır. Elde edilen örneklerden önce oluşan tepe MYDGF proteinini içermektedir. Buradan elde

edilen örnek ise ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre hale getirildikten sonra jel filtrasyon yöntemi için hazır hale getirilmiştir.

Boyut dışlama ya da diğer adıyla jel filtrasyon kromatografisi hem boş plazmid ile yapılan transfeksiyondan elde edilen besiyeri ile hem de MYDGF genini içeren plazmid ile yapılan transfeksiyon sonrası toplanan besiyeri kullanarak yapılmıştır (**Şekil 6.5.3.1**). Besiyerinden kaynaklanan proteinler ile MYDGF ayırımının daha belirgin bir şekilde yapılabilmesi amacıyla tasarlanan deney sonucunda 5 ve 6 numaraları ile numaralandırılmış sinyallerin MYDGF olabileceği düşünülmüştür (**Şekil 6.5.3.2**). Burada Şekil 6.5.3.1’ de ayrı ayrı A ve B şeklinde gösterilmiş olan grafikler üst üste oturtulmuş ve farklı olan sinyallerin görülmesi kolaylaştırılmıştır. Boş vektör plazmid ile yapılan transfeksiyondan elde edilen sinyaller ile MYDGF geninin içeren plazmid ile yapılan transfeksiyondan elde edilen boyut dışlama kromatografisinde yalnızca 5 ve 6 numaralı sinyallerde farklılık olduğu bulunmuştur. Bu sinyallerden hangisinin MYDGF’ ye ait olduğunun gösterilmesi amacıyla Western Blot yapılmıştır (**Şekil 6.6.2**). Elde edilen sonuçlara bakıldığında yalnızca Şekil 6.5.3.1’ de 5 numara ile gösterilen sinyalin (2.B.2 fraksiyonunun) MYDGF proteininden kaynaklı olduğu görülmüştür. Boyut dışlama kromatografisi ile yüksek kDa ağırlıklı olan proteinler önce sinyal oluşturmuş, küçük kDa ağırlıklı proteinler ise onlardan sonra sinyal oluşturmuşlardır. Bu yöntem ile MYDGF saflaştırılarak hücrelere verilmek üzere hazır hale getirilmiştir. Elde edilen saflaştırılmış protein örneği *in vitro* ve *in vivo* kullanılabilir duruma getirilmiştir.

Elde edilen MYDGF örneklerinin doğrulaması SDS-PAGE yöntemi ile belirli aşamalarda yapılmıştır. HisTrap™ kolonu öncesi besiyerindeki proteinler ve HisTrap™ kolonunun kullanımı sonrasında elde edilen örnekler kullanılmıştır. Proteinler yürütüldükten sonra InstantBlue™ boyaması ile boyanmış ve değerlendirilmiştir. HisTrap™ öncesi ve sonrası pek çok proteinin varlığı oluşan mavi bantlarla gösterilmiştir (**Şekil 6.6.1**). Belirteçte yaklaşık 16kDa bandına denk gelen kısımda MYDGF varlığı görülmüştür. Jelde görülen diğer bantlar ise hücre kültürü besiyerinde kullanılan serumdan kaynaklanmıştır. Bu proteinler jel filtrasyon kromatografisi vasıtasıyla ve ultrafiltrasyon tüpleri aracılığıyla ayrılmıştır ve yalnızca MYDGF içeren örnek kullanılmak üzere hazırlanmış ve muhafaza edilmiştir.

In vitro Parkinson modelinin oluşturulması için SH-SY5Y hücreleri ve 6-OHDA nörotoksini kullanılmıştır. 6-OHDA 7 farklı doz seçilere (10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 250 µM ve 500 µM) uygulanmış ve hücre canlılığı testi yapılmıştır. 25 µM 6-OHDA kullanılan grupta $p < 0,05$ olarak bulunurken bu dozun üzerindeki tüm dozlarda (50 µM, 100 µM, 200 µM, 250 µM ve 500 µM) p değeri $< 0,01$ olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında bulunmuştur (**Şekil 6.7.1**). Kontrol grubuna göre hücre sayısını istatistiksel olarak ($p < 0,01$) azaltan ilk iki doz yani 50 µM ve 100 µM 6-OHDA *in vitro* Parkinson modelinin oluşturulması için seçilmiştir. Bu dozlar uygulanarak yapılan modellemelerde daha sonra saflaştırılan MYDGF proteininin tedavi edici etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

PH'de NTF (nörotrofik faktör) temelli tedavilerin tercih edilmesinin temeli NTF'lerin nöronların hayatta kalmasını desteklemesi, aksonları rejenere etme yeteneğine sahip olmaları ve nöronal fonksiyon ve bağlantıları artırma özelliklerine dayanmaktadır. NTF'ler var olan dopaminerjik nöronların sadece hayatta kalmasını sağlamak dışında onları rejenere etmeleri ve zaten kaybedilmiş olan hücreleri de telef edebilme potansiyeline sahip oldukları için önem taşımaktadırlar (Chmielarz & Saarma, 2020). Boyut dışlama kromatografisi sonucu elde edilen örneklerden MYDGF'ye ait olduğuna emin olunan fraksiyonun konsantrasyonu Qubit™ 3 Fluorometer ile ölçüldükten sonra 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml MYDGF içerecek gruplar olacak şekilde bir gün önceden ekilen hücrelere önce hücre canlılığı testi için görüntü alındıktan sonra MYDGF proteini verilmiştir. MYDGF eklendikten 1 saat sonra ise seçilen dozlarda (50 µM ve 100 µM) 6-OHDA hücrelere eklenmiştir. 6-OHDA eklendikten 24 sonra ise deney sonlandırılmıştır ve hücre canlılığı testi için görüntü alınmıştır. 50 µM 6-OHDA ile oluşturulmuş olan modelde hücre sayısı 50 ng/ml ve 100 ng/ml MYDGF eklenen gruplarda 0 ng/ml MYDGF içeren gruba kıyaslandığında hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) arttığı görülmüştür (**Şekil 6.7.2**). 100 µM 6-OHDA ile oluşturulan modelde ise 0 ng/ml MYDGF içeren gruba kıyaslama yapıldığında 50 ng/ml ve 100 ng/ml MYDGF eklenen gruplardaki hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0,01$) (**Şekil 6.7.3**). Uygulanan diğer MYDGF dozlarında ise hücre canlılığında bir artış görülmüş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Grafiklerde hücre canlılığı her grup öncesine göre kıyaslanarak yüzde olarak gösterilmiştir.

Nörotrofik faktörlerin pek çok hastalığın tedavi seçenekleri arasında olması ile MYDGF'nin de potansiyel rejeneratif etkilerinin olabileceği düşünülmüştür. Korf-Klingebier ve ark. tarafından 2015 yılına ait çalışmada MYDGF'nin rejeneratif etkileri gösterilmiş ve varlığı keşfedilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan benzer yöntem ile proteini saflaştırmış ve onu tanımladıktan sonra fizyolojik etkilerini incelemek üzere çalışmalar yapmışlardır (Korf-Klingebiel ve ark., 2015). Bu sonuçlardan yola çıkılarak MYDGF'nin tedavi edici etkisinin *in vitro* Parkinson modeli üzerinde olduğu görülmüştür. Henüz yeni tanımlanan bu proteinin etkileri bilinmediğinden çalışma unsuru olarak bu tezde MYDGF'nin seçilmesi düşünülmüştür. Nörotrofik faktörlere ait reseptörler nöronların hücre membranında bulunmaktadır ve ilgili nörotrofik faktörün ortamdaki miktarına bağlı olarak hücrelerde değişiklikler meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu yüzden de tedavi edici etkilerinin de olabileceğini düşündürmektedirler (Dong ve ark.,2016).

Dünyada pek çok insanda görülen ve ilerleyici olan nörodejeneratif yapıdaki Parkinson hastalığının henüz hastalığın seyrini değiştiren bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hastalığın oranının giderek artıyor olması ise yeni tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesini düşündürmektedir. Farmakolojik açıdan yaklaşan tedavi yöntemleri ve farmakolojik olmayan tedavi yöntemleri önerilenler arasındadır. Mevcut tedavi seçeneklerinin sadece semptomları düzelttiği bilinmektedir (Armstrong & Okun, 2020). Bu nedenlerle hastalığın seyrini tamamıyla değiştirebilecek yeni tedavi edici ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Gen tedavisi gibi henüz geliştirilmekte olan tedavi yöntemlerinin çok güvenilir olmaması dolayısıyla hedef proteinlerin üretilip doğrudan kullanılması büyük önem taşımaktadır. Oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilebileceği düşüncesiyle proteinlerin saflaştırılması ve daha çok potansiyel ajan olabilecek proteinlerin tanımlanması gerekmektedir. NTF'ler nöronal gelişim ve sinaptik plastisitede önemli salgı molekülleridir. Bu nedenle, dopaminerjik nöronların sağkalımını teşvik yeteneği ile NTF'ler PH'nin prelinik modellerinde kapsamlı olarak test edilmiştir. En umut vaat eden NTF'ler ise klinik çalışmalarda kullanılmıştır ve diğerlerinin de kullanılması planlanmaktadır. PH bağlamında en iyi çalışılan

NTF'ler glial hücre hattı kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) ve başka bir GDNF-aile ligand neurturin (NRTN), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), CDNF (serebral dopaminerjik nörotrofik faktör) ve mesensefalik astrosit türevli nörotrofik faktör (MANF) olmuştur (Kirkeby& Barker, 2019).

Bu çalışmalarda Parkinson hastalığı modeli olarak kullanılmak üzere SH-SY5Y hücre hattı seçilmiş ve 6- OHDA nörotoksini kullanılmıştır ve MYDGF'nin tedavi edici etkisi araştırılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik özelliği olduğu da bilinmektedir. Parkinson hastalığı tedavisinde ise özellikle orta beyindeki dopaminerjik nöronları etkileme potansiyeline sahip olan ajanlar bilimsel araştırmalar için seçilmesi gerekmektedir. Dopamin reseptörlerine afinite gösteren ve dopamin benzeri yapıdaki 6-OHDA ise dejeneratif etkisinden dolayı seçilmiştir. Bu dejeneratif etkinin MYDGF proteini ile değiştirilip değiştirilemeyeceği gözlemlenmiştir. Nörotrofik faktörler ile yapılan klinik çalışmalarda PH'nin ilerleyişinde duraklamalar görülmüştür (Allen ve ark., 2013). Literatürde bulunan NTF' ler ile yapılan PH tedavi araştırmalarını içeren çalışmalara paralel olarak MYDGF'nin de potansiyel bir tedavi edici protein yapılı büyüme faktörü olarak nörodejeneratif bir hastalık olan PH'da kullanılabileceği bu tez çalışmasında görülmüştür.

8. SONUÇ

Bu tez sonucunda elde edilen verilere göre rekombinant insan MYDGF proteininin başarılı bir şekilde üretilip saflaştırıldığı görülmüştür. Protein üretilip saflaştırmanın uygun koşullar oluşturulduğunda mümkün olduğu görülmüştür.

Saflaştırılan proteinin *in vitro* olarak oluşturulan Parkinson hastalığı modelindeki tedavi etkisi gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkılarak saflaştırılan proteinin tedavi edici etkisinin olabileceği öngörülmektedir. İlerleyen çalışmalarda *in vivo* deneyler ile bu sonuçların desteklenmesi ile MYDGF'nin nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkisine ve bu etkinin hangi mekanizmalar aracılığıyla olduğuna ışık tutacağı düşünülmektedir.

Varlığı ve fizyolojik etkileri henüz tanımlanmamış pek çok protein bulunmaktadır. Özellikle tedavi edici etkisi olduğu düşünülen proteinlerin uygun kromatografi yöntemleriyle üretilip öncelikle *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere üretilip saflaştırılması önem taşımaktadır.

9. KAYNAKLAR

Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, *12*(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)

Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology and Therapeutics*, *138*(2), 155–175. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>

Amro, M. S., Teoh, S. L., Norzana, A. G., & Srijit, D. (2018). The potential role of herbal products in the treatment of Parkinson's disease. *La Clinica Terapeutica*, *169*(1), e23–e33. <https://doi.org/10.7417/T.2018.2050>

An, S., Wang, X., Ruck, M. A., Rodriguez, H. J., Kostyushev, D. S., Varga, M., Luu, E., Derakhshandeh, R., Suchkov, S. V., Kogan, S. C., Hermiston, M. L., & Springer, M. L. (2018). Age-Related Impaired Efficacy of Bone Marrow Cell Therapy for Myocardial Infarction Reflects a Decrease in B Lymphocytes. *Molecular Therapy*, *26*(7), 1685–1693. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.015>

Antony, P. M. A., Diederich, N. J., Krüger, R., & Balling, R. (2013). The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS Journal*, *280*(23), 5981–5993. <https://doi.org/10.1111/febs.12335>

Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development (Cambridge)*, *142*(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>

Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *323*(6), 548–560. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>

Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, *15*(12), 1257–1272. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)

Avagliano, C., Russo, R., De Caro, C., Cristiano, C., La Rana, G., Piegari, G., Paciello, O., Citraro, R., Russo, E., De Sarro, G., Meli, R., Mattace Raso, G., & Calignano, A. (2016). Palmitoylethanolamide protects mice against 6-OHDA-induced neurotoxicity and endoplasmic reticulum stress: In vivo and in vitro evidence. *Pharmacological Research*, *113*, 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.004>

Axelsen, T. M., & Woldbye, D. P. D. (2018). Gene therapy for Parkinson's disease, an update. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(2), 195–215. <https://doi.org/10.3233/JPD-181331>

Bakshi, S., Chelliah, V., Chen, C., & van der Graaf, P. H. (2019). Mathematical Biology Models of Parkinson's Disease. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, *8*(2), 77–86. <https://doi.org/10.1002/psp4.12362>

Bandres-Ciga, S., Diez-Fairen, M., Kim, J. J., & Singleton, A. B. (2020). Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiology of Disease*, *137*(January). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104782>

Berthet, A., & Bezard, E. (2009). Dopamine receptors and l-dopa-induced dyskinesia. *Parkinsonism and Related Disorders*, *15*(SUPPL. 4), 8–12. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70827-2](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70827-2)

Betarbet, R., Sherer, T. B., & Greenamyre, J. T. (2005). Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Experimental Neurology*, *191*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.08.021>

Bezard, E., & Przedborski, S. (2011). A tale on animal models of Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, *26*(6), 993–1002. <https://doi.org/10.1002/mds.23696>

Blesa, J., Trigo-Damas, I., del Rey, N. L. G., & Obeso, J. A. (2018). The use of nonhuman primate models to understand processes in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, *125*(3), 325–335. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1715-x>

Bortnov, V., Annis, D. S., Fogerty, F. J., Barretto, K. T., Turton, K. B., & Mosher, D. F. (2018). Myeloid-derived growth factor is a resident endoplasmic reticulum protein. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(34), 13166–13175.

<https://doi.org/10.1074/jbc.AC118.002052>

Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*, *110*(5), 517–536. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>

Brigo, F., Erro, R., Marangi, A., Bhatia, K., & Tinazzi, M. (2014). Differentiating drug-induced parkinsonism from Parkinson's disease: An update on non-motor symptoms and investigations. *Parkinsonism and Related Disorders*, *20*(8), 808–814. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.05.011>

Cabral-Miranda, F., & Hetz, C. (2018). ER stress and neurodegenerative disease: A cause or effect relationship? In *Current Topics in Microbiology and Immunology*. https://doi.org/10.1007/82_2017_52

Cai, Y., Arikath, J., Yang, L., Guo, M. L., Periyasamy, P., & Buch, S. (2016). Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders. *Autophagy*, *12*(2), 225–244. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1121360>

Celie, P. H. N., Parret, A. H. A., & Perrakis, A. (2016). Recombinant cloning strategies for protein expression. In *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.010>

Chen, F., Jin, L., & Nie, Z. (2017). Safety and Efficacy of Rotigotine for Treating Parkinson's Disease: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, *20*(389), 285–294. <https://doi.org/10.18433/J3Q35D>

Chen, Y., Cen, Z., Zheng, X., Pan, Q., Chen, X., Zhu, L., Chen, S., Wu, H., Xie, F., Wang, H., Yang, D., Wang, L., Zhang, B., & Luo, W. (2019). LRP10 in autosomal-dominant Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *34*(6), 912–916. <https://doi.org/10.1002/mds.27693>

Cherian, A., & Divya, K. P. (2020). Genetics of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Belgica*, 120(6), 1297–1305. <https://doi.org/10.1007/s13760-020-01473-5>

Cheung, Y. T., Lau, W. K. W., Yu, M. S., Lai, C. S. W., Yeung, S. C., So, K. F., & Chang, R. C. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology*, 30(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.11.001>

Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5 SPEC. ISS.), 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>

Chmielarz, P., & Saarma, M. (2020). Neurotrophic factors for disease-modifying treatments of Parkinson's disease: gaps between basic science and clinical studies. In *Pharmacological Reports*. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00120-3>

Conese, M., Cassano, R., Gavini, E., Trapani, G., Rasso, G., Sanna, E., Di Gioia, S., & Trapani, A. (2019). Harnessing Stem Cells and Neurotrophic Factors with Novel Technologies in the Treatment of Parkinson's Disease. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(7), 549–569. <https://doi.org/10.2174/1574888x14666190301150210>

Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 311(16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>

Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J., & Ciccarone, V. C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.023>

Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). *Review Parkinson ' s Disease : Mechanisms and Models*. 39(6), 889–909.

Delenclos, M., Burgess, J. D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T. F., Vekrellis, K., & McLean, P. J. (2019). Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of Neurochemistry*, *150*(5), 566–576. <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>

Dong, J., Li, S., Mo, J. L., Cai, H. Bin, & Le, W. D. (2016). Nurr1-Based Therapies for Parkinson's Disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *22*(5), 351–359. <https://doi.org/10.1111/cns.12536>

Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(s1), S3–S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>

Doty, R. L. (2012). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, *46*(3), 527–552. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.026>

Ebenhoch, R., Akhdar, A., Reboll, M. R., Korf-Klingebiel, M., Gupta, P., Armstrong, J., Huang, Y., Frego, L., Rybina, I., Miglietta, J., Pekcec, A., Wollert, K. C., & Nar, H. (2019). Crystal structure and receptor-interacting residues of MYDGF — a protein mediating ischemic tissue repair. *Nature Communications*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13343-7>

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x>

Fahn, S. (2008). The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *23*(SUPPL. 3). <https://doi.org/10.1002/mds.22028>

Falkenburger, B. H., Saridaki, T., & Dinter, E. (2016). Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 121–130. <https://doi.org/10.1111/jnc.13618>

Fernandes, H. J. R., Hartfield, E. M., Christian, H. C., Emmanoulidou, E., Zheng, Y., Booth, H., Bogetofte, H., Lang, C., Ryan, B. J., Sardi, S. P., Badger, J., Vowles, J., Evetts, S., Tofaris, G. K., Vekrellis, K., Talbot, K., Hu, M. T., James, W.,

Cowley, S. A., & Wade-Martins, R. (2016). ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Reports*, 6(3), 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.013>

Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & Garcfa-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-22055_1

Friedman, A., & Galazka-Friedman, J. (2012). The history of the research of iron in parkinsonian substantia nigra. *Journal of Neural Transmission*, 119(12), 1507–1510. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0894-8>

Ganguly, U., Chakrabarti, S. S., Kaur, U., Mukherjee, A., & Chakrabarti, S. (2018). Alpha-synuclein, Proteotoxicity and Parkinson's Disease: Search for Neuroprotective Therapy. *Current Neuropharmacology*, 16(7), 1086–1097. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666171129100944>

Gazewood, J. D., Richards, D. R., & Clebak, K. (2013). Parkinson disease: An update. *American Family Physician*.

Gelb, D. J., Oliver, E., & Gilman, S. (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of Neurology*. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.1.33>

Gelders, G., Baekelandt, V., & Van der Perren, A. (2018). Linking neuroinflammation and neurodegeneration in parkinson's disease. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/4784268>

Ghamgosha, M., Latifi, A. M., Meftahi, G. H., & Mohammadi, A. (2018). Cellular, Molecular and Non-Pharmacological Therapeutic Advances for the Treatment of Parkinson's Disease: Separating Hope from Hype. *Current Gene Therapy*, 18(4), 206–224. <https://doi.org/10.2174/1566523218666180910163401>

Grandi, L. C., Di Giovanni, G., & Galati, S. (2018). Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms. *Journal of Neuroscience Methods*, 308(June), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012>

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., ... Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. In *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>

Gu, X. S., Wang, F., Zhang, C. Y., Mao, C. J., Yang, J., Yang, Y. P., Liu, S., Hu, L. F., & Liu, C. F. (2016). Neuroprotective Effects of Paeoniflorin on 6-OHDA-Lesioned Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*, 41(11), 2923–2936. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2011-0>

Gubellini, P., & Kachidian, P. (2015). Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Revue Neurologique*, 171(11), 750–761. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.07.011>

Hadadianpour, Z., Fatehi, F., Ayoobi, F., Kaeidi, A., Shamsizadeh, A., & Fatemi, I. (2017). The effect of orexin-A on motor and cognitive functions in a rat model of Parkinson's disease. *Neurological Research*, 39(9), 845–851. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1352185>

Harischandra, D. S., Rokad, D., Ghaisas, S., Verma, S., Robertson, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2020). Enhanced differentiation of human dopaminergic neuronal cell model for preclinical translational research in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165533>

Hayes, M. T. (2019). Parkinson's Disease and Parkinsonism. In *American Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>

Hayes, M. W., Fung, V. S. C., Kimber, T. E., & O'Sullivan, J. D. (2019). Updates and advances in the treatment of Parkinson disease. *Medical Journal of Australia*,

211(6), 277–283. <https://doi.org/10.5694/mja2.50224>

Hornykiewicz, O. (2017). L-Dopa. *Journal of Parkinson's Disease*, 7(s1), S3–S10. <https://doi.org/10.3233/JPD-179004>

Horowski, R., & Löschmann, P. A. (2019). Classical dopamine agonists. *Journal of Neural Transmission*, 126(4), 449–454. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-01989-y>

Houghton, R., Boess, F., Verselis, L., Ding, Y., Freitas, R., Constantinovici, N., & Ong, R. (2019). Treatment Patterns in Patients with Incident Parkinson's Disease in the United States. *Journal of Parkinson's Disease*, 9(4), 749–759. <https://doi.org/10.3233/JPD-191636>

Huttunen, H. J., & Saarma, M. (2019). CDNF Protein Therapy in Parkinson's Disease. *Cell Transplantation*, 28(4), 349–366. <https://doi.org/10.1177/0963689719840290>

Jagadeesan, A. J., Murugesan, R., Vimala Devi, S., Meera, M., Madhumala, G., Vishwanathan Padmaja, M., Ramesh, A., Banerjee, A., Sushmitha, S., Khokhlov, A. N., Marotta, F., & Pathak, S. (2017). Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson's disease: a review. In *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. <https://doi.org/10.23750/abm.v88i3.6063>

Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(4), 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>

Jellinger, K. A. (2019). Is Braak staging valid for all types of Parkinson's disease? *Journal of Neural Transmission*, 126(4), 423–431. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1898-9>

Johnson, M. E., & Bobrovskaya, L. (2015). An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *NeuroToxicology*, 46, 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002>

Keener, A. M., & Bordelon, Y. M. (2016). *Parkinsonism*. 330–334.

Kim, S. D., Allen, N. E., Canning, C. G., & Fung, V. S. C. (2018). Parkinson disease. In *Handbook of Clinical Neurology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63916-5.00011-2>

Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal models for Parkinson's disease research: Trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>

Kirkeby, A., & Barker, R. A. (2019). Parkinson disease and growth factors — is GDNF good enough? *Nature Reviews Neurology*, 15(6), 312–314. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0180-6>

Ko, W. K. D., & Bezdard, E. (2017). Experimental animal models of Parkinson's disease: A transition from assessing symptomatology to α -synuclein targeted disease modification. In *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.020>

Korf-Klingebiel, M., Reboll, M. R., Klede, S., Brod, T., Pich, A., Polten, F., Napp, L. C., Bauersachs, J., Ganser, A., Brinkmann, E., Reimann, I., Kempf, T., Niessen, H. W., Mizrahi, J., Schönfeld, H. J., Iglesias, A., Bobadilla, M., Wang, Y., & Wollert, K. C. (2015). Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nature Medicine*, 21(2), 140–149. <https://doi.org/10.1038/nm.3778>

Kulisevsky, J., Oliveira, L., & Fox, S. H. (2018). Update in therapeutic strategies for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 31(4), 439–447. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000579>

Lane, E. L. (2019). L-DOPA for Parkinson's disease—a bittersweet pill. *European Journal of Neuroscience*, 49(3), 384–398. <https://doi.org/10.1111/ejn.14119>

Lang, C., Campbell, K. R., Ryan, B. J., Carling, P., Attar, M., Vowles, J., Perestenko, O. V., Bowden, R., Baig, F., Kasten, M., Hu, M. T., Cowley, S. A., Webber, C., & Wade-Martins, R. (2019). Single-Cell Sequencing of iPSC-

Dopamine Neurons Reconstructs Disease Progression and Identifies HDAC4 as a Regulator of Parkinson Cell Phenotypes. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.023>

Langley, J., Hussain, S., Flores, J. J., Bennett, I. J., & Hu, X. (2020). Characterization of age-related microstructural changes in locus coeruleus and substantia nigra pars compacta. *Neurobiology of Aging*, *87*, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.11.016>

Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., & Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: From structure and toxicity to therapeutic target. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>

Lau, A., So, R. W. L., Lau, H. H. C., Sang, J. C., Ruiz-Riquelme, A., Fleck, S. C., Stuart, E., Menon, S., Visanji, N. P., Meisl, G., Faidi, R., Marano, M. M., Schmitt-Ulms, C., Wang, Z., Fraser, P. E., Tandon, A., Hyman, B. T., Wille, H., Ingelsson, M., ... Watts, J. C. (2020). α -Synuclein strains target distinct brain regions and cell types. *Nature Neuroscience*, *23*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0541-x>

Lázaro, D. F., Pavlou, M. A. S., & Outeiro, T. F. (2017). Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *298*, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.007>

Le, W., Sayana, P., & Jankovic, J. (2014). Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics*, *11*(1), 92–110. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0234-1>

Levin, J., Kurz, A., Arzberger, T., Giese, A., & Höglinger, G. U. (2016). The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Deutsches Arzteblatt Online*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0061>

Lewitt, P. A. (2015). Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Movement Disorders*, *30*(1), 64–72. <https://doi.org/10.1002/mds.26082>

Lima, F. A. V., Joventino, I. P., Joventino, F. P., de Almeida, A. C., Neves, K. R. T., do Carmo, M. R., Leal, L. K. A. M., de Andrade, G. M., & de Barros Viana, G. S. (2017). Neuroprotective Activities of *Spirulina platensis* in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Are Related to Its Anti-Inflammatory Effects. *Neurochemical Research*, *42*(12), 3390–3400. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2379-5>

Lin, G., Wang, L., Marcogliese, P. C., & Bellen, H. J. (2019). Sphingolipids in the Pathogenesis of Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *30*(2), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.11.003>

Lin, Z., Zhao, Q., Xing, L., Zhou, B., & Wang, X. (2015). Aggregating tags for column-free protein purification. In *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.201500299>

Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2017). Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *NeuroMolecular Medicine*, *19*(2–3), 241–255. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8454-x>

Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*(6109), 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>

Luo, S. X., & Huang, E. J. (2016). Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly. *American Journal of Pathology*, *186*(3), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.023>

Machado, V., Zöller, T., Attaai, A., & Spittau, B. (2016). Microglia-mediated neuroinflammation and neurotrophic factor-induced protection in the MPTP mouse model of parkinson's disease-lessons from transgenic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms17020151>

Mastrangelo, L. (2017). The Genetics of Parkinson Disease. *Advances in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.08.001>

- Mayo, M. C., & Bordelon, Y. (2014).** Dementia with lewy bodies. *Seminars in Neurology*. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1381741>
- Mcgregor, M. M., & Nelson, A. B. (2019).** *Review Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease*.
- Mercado, G., Castillo, V., Soto, P., & Sidhu, A. (2016).** ER stress and Parkinson's disease: Pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Research*, *1648*, 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.042>
- Misgeld, U. (2004).** Innervation of the substantia nigra. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0918-2>
- Müller, T., Kuhn, W., & Möhr, J. D. (2019).** Evaluating ADS5102 (amantadine) for the treatment of Parkinson's disease patients with dyskinesia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *20*(10), 1181–1187. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1612365>
- Nagoshi, E. (2018).** Drosophila models of sporadic parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113343>
- Nasrolahi, A., Mahmoudi, J., Akbarzadeh, A., Karimipour, M., Sadigh-Eteghad, S., Salehi, R., & Farhodi, M. (2018).** Neurotrophic factors hold promise for the future of Parkinson's disease treatment: Is there a light at the end of the tunnel? *Reviews in the Neurosciences*, *29*(5), 475–489. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0040>
- Niethammer, M., Tang, C. C., Vo, A., Nguyen, N., Spetsieris, P., Dhawan, V., Ma, Y., Small, M., Feigin, A., During, M. J., Kaplitt, M. G., & Eidelberg, D. (2018).** Gene therapy reduces Parkinson's disease symptoms by reorganizing functional brain connectivity. *Science Translational Medicine*, *10*(469), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau0713>
- O'Connor, D. M., & Boulis, N. M. (2015).** Gene therapy for neurodegenerative diseases. In *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.06.001>

Okun, M. S. (2012). *Deep-Brain Stimulation for Parkinson ' s Disease*. 1529–1538. <https://doi.org/10.1056/NEJMct1208070>

Oliveira, C., & Domingues, L. (2018). Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>

Paul, G., & Sullivan, A. M. (2019). Trophic factors for Parkinson's disease: Where are we and where do we go from here? *European Journal of Neuroscience*, *49*(4), 440–452. <https://doi.org/10.1111/ejn.14102>

Pavlou, M. A. S., & Outeiro, T. F. (n.d.). *Epigenetics in Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1>

Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*, *85*(2), 257–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(17013), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>

Polinski, N. K., Volpicelli-Daley, L. A., Sortwell, C. E., Luk, K. C., Cremades, N., Gottler, L. M., Froula, J., Duffy, M. F., Lee, V. M. Y., Martinez, T. N., & Dave, K. D. (2018). Best practices for generating and using alpha-synuclein pre-formed fibrils to model Parkinson's disease in rodents. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(2), 303–322. <https://doi.org/10.3233/JPD-171248>

Polten, F., Reboll, M. R., Widera, C., Kempf, T., Bethmann, K., Gupta, P., Miglietta, J., Pekcec, A., Tillmanns, J., Bauersachs, J., Giannitsis, E., Pich, A., & Wollert, K. C. (2019). Plasma Concentrations of Myeloid-Derived Growth Factor in Healthy Individuals and Patients with Acute Myocardial Infarction as Assessed by Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *91*(2), 1302–1308. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03041>

Prensa, L., Giménez-Amaya, J. M., Parent, A., Bernácer, J., & Cebrián, C.

(2009). The nigrostriatal pathway: Axonal collateralization and compartmental specificity. In *Journal of Neural Transmission, Supplementa*. <https://doi.org/10.1007/978-3-211-92660-4-4>

Puschmann, A. (2017). New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(9). <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0780-8>

Reich, S. G. (2018). Parkinson Disease Parkinsonism Parkinson disease Tremor Levodopa Dyskinesias. *Medical Clinics of NA*. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>

Revuelta, G. J., Embry, A., Elm, J. J., Gregory, C., Delambo, A., Kautz, S., & Hinson, V. K. (2015). Pilot study of atomoxetine in patients with Parkinson's disease and dopa-unresponsive Freezing of Gait. *Translational Neurodegeneration*, 4(1), 2–5. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0047-8>

Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 109, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>

Rocha, N. P., Ferreira, J. P. S., Scalzo, P. L., Barbosa, I. G., de Souza, M. S., Christo, P. P., Reis, H. J., & Teixeira, A. L. (2018). Circulating levels of neurotrophic factors are unchanged in patients with Parkinson's disease. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20180035>

Rodríguez-Violante, M., Cervantes-Arriaga, A., Fahn, S., & Tolosa, E. (2017). Two-hundred years later: Is Parkinson's disease a single defined entity? *Revista de Investigacion Clinica*, 69(6), 308–313. <https://doi.org/10.24875/RIC.17002291>

Ryan, E., Seehra, G., Sharma, P., & Sidransky, E. (2019). GBA1-associated parkinsonism. *Current Opinion in Neurology*. <https://doi.org/10.1097/wco.0000000000000715>

Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiological Research*, 68(1), 17–24.

<https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>

Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M. F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, *167*(6), 1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>

Sarkar, S., Raymick, J., & Imam, S. (2016). Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: Recent perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060904>

Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(7), 435–450. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>

Schneider, R. B., Iourinets, J., & Richard, I. H. (2017). Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and management. *Neurodegenerative Disease Management*, *7*(6), 365–376. <https://doi.org/10.2217/nmt-2017-0028>

Schustrin, C., & Chandra, S. (2017). Parkinson Hastalığı ve Atipik Parkinson Sendromlarının Ayırıcı Tanısı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *26*(4), 494–508. <https://doi.org/10.17827/aktd.310177>

Senkevich, K., & Gan-Or, Z. (2020). Autophagy lysosomal pathway dysfunction in Parkinson's disease; evidence from human genetics. *Parkinsonism and Related Disorders*, *73*, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.11.015>

Sharples, S. A., Koblinger, K., Humphreys, J. M., & Whelan, P. J. (2014). Dopamine: A parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Frontiers in Neural Circuits*, *8*(JUNE), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00055>

Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., & Taniguchi, T. (2003). Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, *9*(8), 360–365.

[https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00117-5)

Shulman, J. M., De Jager, P. L., & Feany, M. B. (2011). Parkinson's disease: Genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 193–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130242>

Shults, C. W. (2006). Lewy bodies. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509567103>

Simola, N., & Morelli, M. (2007). *The 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson ' s Disease*. 11, 151–167.

Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>

Sjödin, S., Brinkmalm, G., Öhrfelt, A., Parnetti, L., Paciotti, S., Hansson, O., Hardy, J., Blennow, K., Zetterberg, H., & Brinkmalm, A. (2019). Endo-lysosomal proteins and ubiquitin CSF concentrations in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0533-9>

Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E., & Constantin, G. (2020). In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(May). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00328>

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6469–6473. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>

Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2018). Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein. *Cell and Tissue Research*, 373(1), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2706-9>

Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0183-y>

Staudt, M. D., Di Sebastiano, A. R., Xu, H., Jog, M., Schmid, S., Foster, P., & Hebb, M. O. (2016). Advances in neurotrophic factor and cell-based therapies for Parkinson's disease: A mini-review. *Gerontology*, *62*(3), 371–380. <https://doi.org/10.1159/000438701>

Stojkowska, I., Krainc, D., & Mazzulli, J. R. (2018). Molecular mechanisms of α -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*, *373*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2704-y>

Sullivan, A. M., & Toulouse, A. (2011). Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *22*(3), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.05.001>

Suppa, A., Bologna, M., Conte, A., Berardelli, A., & Fabbrini, G. (2017). The effect of L-dopa in Parkinson's disease as revealed by neurophysiological studies of motor and sensory functions. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *17*(2), 181–192. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1219251>

Tan, Y., Sgobio, C., Arzberger, T., Machleid, F., Tang, Q., Findeis, E., Tost, J., Chakroun, T., Gao, P., Höllerhage, M., Bötzel, K., Herms, J., Höglinger, G., & Koeglsperger, T. (2020). Loss of fragile X mental retardation protein precedes Lewy pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, *139*(2), 319–345. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02099-5>

Tarakad, A., & Jankovic, J. (2017). Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. In *Seminars in Neurology*. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601888>

Torres-Ortega, P. V., Saludas, L., Hanafy, A. S., Garbayo, E., & Blanco-Prieto, M. J. (2019). Micro- and nanotechnology approaches to improve Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release*, *295*, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.036>

Trigo-Damas, I., Del Rey, N. L. G., & Blesa, J. (2018). Novel models for parkinson's disease and their impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(3), 229–239. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1428556>

Trojanowski, J. Q., & Revesz, T. (2007). Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33(6), 615–620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00907.x>

Tulin, E. E., Onoda, N., Nakata, Y., Maeda, M., Hasegawa, M., Nomura, H., & Kitamura, T. (2001). SF20/IL-25, a Novel Bone Marrow Stroma-Derived Growth Factor That Binds to Mouse Thymic Shared Antigen-1 and Supports Lymphoid Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6338>

Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 124(8), 901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>

Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T., & Outeiro, T. F. (2016). Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *Journal of Neurochemistry*, 139, 240–255. <https://doi.org/10.1111/jnc.13249>

Vivekanantham, S., Shah, S., Dewji, R., Dewji, A., Khatri, C., & Ologunde, R. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease: Role in neurodegeneration and tissue repair. *International Journal of Neuroscience*, 125(10), 717–725. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.982795>

Voutilainen, M. H., Arumäe, U., Airavaara, M., & Saarma, M. (2015). Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDNF/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 589(24), 3739–3748. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.031>

Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology*, 27(5), 494–506.

<https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x>

Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., & Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8280-y>

Walden, H., & Muqit, M. M. K. (2017). Ubiquitin and Parkinson's disease through the looking glass of genetics. *Biochemical Journal*, *474*(9), 1439–1451. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160498>

Wang, B., Su, C. J., Liu, T. T., Zhou, Y., Feng, Y., Huang, Y., Liu, X., Wang, Z. H., Chen, L. H., Luo, W. F., & Liu, T. (2018). Neuroprotection of low-dose morphine in cellular and animal models of parkinson's disease through ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and activating autophagy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00120>

Wang, H., Jing, M., & Li, Y. (2018). Lighting up the brain: genetically encoded fluorescent sensors for imaging neurotransmitters and neuromodulators. *Current Opinion in Neurobiology*, *50*, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.03.010>

Weissbach, A., Wittke, C., Kasten, M., & Klein, C. (2019). 'Atypical' Parkinson's disease – genetic. *International Review of Neurobiology*, *149*, 207–235. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.10.011>

Williams, E. T., Chen, X., & Moore, D. J. (2017). VPS35, the retromer complex and Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, *7*(2), 219–233. <https://doi.org/10.3233/JPD-161020>

Williams, J. K., Yang, X., & Baum, J. (2018). Interactions between the Intrinsically Disordered Proteins β -Synuclein and α -Synuclein. *Proteomics*, *18*(21–22), 1–14. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800109>

Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>

Zeng, X. S., Geng, W. S., & Jia, J. J. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*, *10*. <https://doi.org/10.1177/1759091418777438>

Zhang, L.-L., Duff Canning, S., & Wang, X.-P. (2016). Freezing of Gait in Parkinsonism and its Potential Drug Treatment. *Current Neuropharmacology*, *14*(4), 302–306. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666151201190040>

Zhang, P. L., Chen, Y., Zhang, C. H., Wang, Y. X., & Fernandez-Funez, P. (2018). Genetics of Parkinson's disease and related disorders. *Journal of Medical Genetics*, *55*(2), 73–80. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105047>

Zhang, X. M., Yin, M., & Zhang, M. H. (2014). Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(7), 945–956. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.36>

Zhang, Y., Larcher, K., Mistic, B., & Dagher, A. (2017). Anatomical and functional organization of the human substantia nigra and its connections. *BioRxiv*, 1–23. <https://doi.org/10.1101/120857>

Zhao, L., Feng, S., Wang, S., Fan, M., Jin, W., Li, X., Wang, C., & Yang, Y. (2020). Production of bioactive recombinant human myeloid-derived growth factor in *Escherichia coli* and its mechanism on vascular endothelial cell proliferation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(2), 1189–1199. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14602>

Lisans Tezi

Tez başlığı; The role of orexinergic system on rat psychosis models

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üye. Pınar Öz

Yayınlar

- Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Öz, P., Gökalp, H. K., **Göver, T.**, & Uzbay, T. (2017). Dose-dependent and opposite effects of orexin A on prepulse inhibition response in sleep-deprived and non-sleep-deprived rats. Behavioural Brain Research. doi:10.1016/j.bbr.2017.12.002

Catal, **T.**, **Gover, T.**, Yaman, B., Droguetti, J., & Yilancioglu, K. (2017). Hydrogen production profiles using furans in microbial electrolysis cells. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(6). doi:10.1007/s11274-017-2270-1

- Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Sözlü Sunum Özeti:

(15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Mayıs 2017, Sakarya)

Gover, T., Gokalp, H.K., Oz., P(2017). The modulation of prepulse inhibition response with OXA on a sleep deprivation model. An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, Volume 11, Supplement 1, May 2017

Konferans Kitapçığı:

Gokalp, H.K., **Gover, T.**, Oz., P(2017). The role of paraventricular thalamic nucleus and the orexinergic system in the prepulse inhibition network, April 2017

Burslar, Ödüller, Sertifikalar, Stajlar

- Yüksek Onur Derecesi (Bölüm Birinciliği), Moleküler Biyoloji ve Genetik, Üsküdar Üniversitesi, 2017

- Erasmus + Staj Hareketliliği 2017; University of Oxford, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Birleşik Krallık
- Erasmus + Staj Hareketliliği 2016; University of Oxford, Department of Oncology, Birleşik Krallık
- Erasmus + Staj Hareketliliği 2015; University of Oxford, Department of Experimental Psychology, Birleşik Krallık



