

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUTANT PARKİN PROTEİNİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU VE NÖROBLASTOMA HÜCRE  
PROTEOMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

SİNEM ÖZGÜL

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ-2012

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUTANT PARKİN PROTEİNİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU VE NÖROBLASTOMA HÜCRE  
PROTEOMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

SİNEM ÖZGÜL

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ-2012

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MUTANT PARKİN PROTEİNİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU VE NÖROBLASTOMA HÜCRE  
PROTEOMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

SİNEM ÖZGÜL

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: DOÇ. DR. MURAT KASAP

Destekleyen Kurum: Kocaeli Üniversitesi BAP doktora destek programı ve TÜBİTAK

Proje No: 110S387

KOCAELİ-2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Gönül Kamıgür

İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Doğan Gülkaç

İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Pervin İşeri

İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI

Doç. Dr. Murat Kasap (Danışman)

İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI

Yard. Doç. Dr. Gürler Akpınar

İMZA

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

12/12/2012

Prof. Dr. Ümit Akpınar

## ÖZET

Nörodegeneratif hastalıklar arasında Parkinson Hastalığı (PH) dünya genelinde Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci hastalıktır. Hem genetik (belirlenen 18 gen lokusu) hem de çevresel (MPTP, paraquat, rotenone, 6-Hidroksidopamine) faktörlerin etkili olduğu PH'da en önemli patofizyolojik özellik beyindeki substantia nigra pars kompakta bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybıdır. Bu bölgedeki dopaminerjik nöronların % 60'ının kaybı ile hastalığın klinik semptomları ortaya çıkmaktadır. Klinik tabloda karşılaşılan klasik bulgular tremor, rijidite, portural instabilite ve hareketlerde kısıtlılıktır. Ancak PH'da karşılaşılan klinik tablo bazen kesin klinik tanı koyabilmek için yeterli olmayabilir. Bundan dolayı PH ile ilişkili yapılan araştırmaların bir kısmı özerkliği ve duyarlılığı yüksek biyobelirteçler üzerinedir. Biyobelirteçler hastalık henüz klinik olarak kendisini göstermeden tanı koymaya ve erken teşhis ile tedavinin veriminin artmasını sağlayacak moleküllerdir. Biyobelirteçlerin belirlenmesi için kullanılan yaklaşımların başında proteomiks gelmektedir. Proteomiks yaklaşımlar ile hücrenin tüm protein profili incelenebilmekte ve hastalıklar ile ilişkili proteinler belirlenebilmektedir. Bu çalışmada erken başlayan PH'ya sebep olabilen Parkin proteinine ait iki mutasyonun (Q311R ve A371T) nöroblastoma hücre proteomu üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar sırasında elde edilen verileri karşılaştırabilmek için yabani tip Parkin proteini kontrol olarak kullanılmıştır. Bulgular mutant Parkin proteininin E3 ubiquitin ligaz aktivitesini kaybetmeden yabani tip Parkin proteinine göre hücrenin nükleusunda daha fazla konumlandığını, hücre içerisinde parçalanmadan daha uzun süre kaldığını, hücre tarafından farklı şekilde translasyon sonrası değişimlere tabi tutulduğunu ve hücre proteomunu farklı şekilde etkilediğini göstermiştir. Özellikle mutant Parkin protein ekspresyonu hücreyi strese sokarak şaperon protein sentezini arttırmaktadır. Ayrıca bulunan ekspresyonu değişmiş bazı proteinlerin literatürde daha önceden PH ile ilişkisinin bilinmiş olması yaptığımız çalışmanın ve elde edilen verilerin mantıksallığını doğrulamıştır. Bugüne kadar çalışılmamış olan ancak önem içerdiğine inandığımız sinyal yolları ve bunların PH ile olan ilişkisi bu çalışma kapsamında fosfoproteom yönünden incelenmiştir. PH oluşumunda potansiyel etkilerinin olabileceği 13 fosforillenmiş protein belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Parkinson Hastalığı, Parkin Proteini, 2DE-DIGE Proteomiks, Fosfoproteomiks

## ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease encountered after Alzheimer disease around the world. The most important pathophysiologic feature of PD, to which both genetic (indicated 18 gene locus) and environmental (MPTP, paraquat, rotenone, 6-Hidroksidopamine) factors effect, is the loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta of the brain. Clinical symptoms of PD occur after 60 % of the dopaminergic neurons are lost in substantia nigra pars compacta. The most common clinical features of PD include tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability. However these common features are not sufficient indicators to truly diagnose PD. Therefore, to aid accurate diagnosis of PD some of the researchs for PD focus on finding of highly specific and sensitive biomarkers. Biomarkers are molecules that improve effectiveness of the treatment by helping early diagnosis before the disease appears. Proteomics is one of the main approaches to identify biomarkers. By proteomics approaches, total protein profile of a cell can be visualized, characterized and quantitative changes in expression patterns can be identified. The purpose of this Ph.D. thesis was to characterize a mutant Parkin protein (Q311R and A371T) and study the effect of observed mutations on parkin activity, stability, localization and neuroblastoma cell proteome. Wild type Parkin protein was used as the control for comparison. The findings indicated that mutant Parkin protein carried E3 ubiquitin ligase activity, localized more in the cell nucleus, was much more stable, possessed a post translational modification and displayed a pronounced effect on cell proteome in comparison to wild type Parkin protein. Specifically speaking mutant Parkin protein expression caused an increased cell stress and induced expression of chaperon proteins. Some of the identified proteins were found to be previously identified PD related proteins. Reidentification of these proteins during this study confirmed the accuracy of our approaches and findings. So far, signaling pathways and their role in PD formation have not been scrutinized. During this study we investigated the changes in phosphoproteome by using phosphoproteomic approaches. Thirteen phosphoproteins were identified as being potential effectors of PD formation.

**Key words:** Parkinson's Disease, Parkin Protein, 2DE-DIGE Proteomics, Phosphoproteomics

## TEŞEKKÜR

Danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat Kasap'a bana bu değerli projede çalışma fırsatı verdiği için minnetarım. Doktora öğrenimimde çok emeği geçen bu değerli insanın bitmek bilmeyen öğrenme merakı, bilgi paylaşımına açıklığı, araştırmacılığı, yüksek analiz gücü, tükenmeyen enerjisi ve hiç bir zaman esirgemediği desteği bu tez çalışmasının tamamlanmasında büyük rol oynamıştır. Hayatımın bundan sonrası döneminde de yanımda olacağını bildiğim değerli hocam Murat Kasap'a karşılıksız desteği, sabrı, hoşgörüsü ve bana da yer verdiği o büyük yüreği için çok teşekkür ederim.

Sayın Yard. Doç. Dr. Gürler Akpınar'a her türlü desteği, paylaşımcılığı ve motive edici pozitif yaklaşımı için çok teşekkür ederim.

Sayın Prof. Dr. Doğan Gülkaç ve Prof. Dr. Pervin İşeri'ye desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bir ömürlük dostum olan Derya Çelik'e gösterdiği sonsuz destek, motivasyon, paylaşım ve sevgiden dolayı çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım laboratuvar arkadaşım ve kardeşim Cansu Semiz'e çok teşekkür ederim.

Varlığı ile yanımda olamasa da her zaman kalbimde olacak canım annem Şükran Torol'a, babam Cihangir, kardeşlerim Cem ve Yeşim, beni yılmadan dinleyen çok sevdiğim ikizim Taylan ve küçük prenseslerim Yağmur ve Ilgaz Torol'a desteklerinden ve sevgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Sevgili kocam Korhan Özgül'e beni sabırla beklediği, 10352 kilometre uzakta olmasına rağmen her zaman yanımda olduğunu hissettirdiği, sonsuz sevgisi, ilgisi ve anlayışı için çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Parkinson Hastalığı (PH)	2
2.1.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi	2
2.1.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri ve Tanısı	4
2.1.3. Parkinson Hastalığının Tedavisi	6
2.1.4. Parkinson Hastalığında Görülen Patolojik Bulgular	6
2.2. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi ve Moleküler Mekanizmaları	8
2.2.1. Çevresel Faktörler	9
2.2.2. Genetik Faktörler	9
2.2.3. Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu	16
2.2.3.1. Mitofaji ve Parkinson Hastalığı	18
2.2.3.2. Mitokondri Dinamiğini Etkileyen PH ile İlişkili Diğer Genler	19
2.2.4. Post-Translasyonel Modifikasyonlar ve Ubikuitin Proteozom Sistem (UPS) Bozukluğu	19
2.3. Parkin İlişkili Parkinson Hastalığı	22
2.3.1. <i>Park2</i> Geni	24
2.3.2. Parkin Proteini	24
2.3.3. Parkin İlişkili Proteinler	29
2.4. Parkinson Hastalığı Araştırmalarında Proteomiks	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Besiyerlerinin ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.1.1. Mueller-Hilton (MH) Agar	34
3.1.2. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri	34
3.1.3. Zengin Sıvı Besiyeri	34
3.1.4. Antibiyotikli Besiyeri	34
3.1.5. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.2. Kullanılan Nükleik Asit Teknikleri	41
3.2.1. Kandan RNA İzolasyonu	41
3.2.2. cDNA Sentezi	41
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	41
3.2.4. PZR Ürününün Temizlenmesi	43
3.2.5. Jel Elektroforezi	43
3.2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	43
3.2.5.2. SDS-PAGE Protein Jel Elektroforezi	43
3.2.6. DNA Parçalarının Agaroz Jelden İzolasyonu ve Saflaştırılması	45
3.2.7. DNA Parçalarının Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi	45
3.2.8. Etanol Çöktürmesi ile DNA'nın Temizlenmesi	47



3.2.9.	DNA Parçalarının (İnsört) Vektör DNA'ya Ligasyonu	47
3.2.10.	Kompetent <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	47
3.2.11.	Kompetent <i>E.coli</i> Hücrelerine Transformasyon (Elektroporasyon)	47
3.2.12.	Alkali Liziz Metodu ile Plazmit DNA İzolasyonu	49
3.2.13.	<i>E.coli</i> Hücrelerinden Endotoksin İçermeyen Plazmit İzolasyonu	49
3.2.14.	DNA Konsantrasyonu Ölçümü	50
3.2.15.	Dizileme ve Dizi Analizi	50
3.3.	Klonlamalar	50
3.3.1.	pCR2.1-TOPO-Park2 Yabani Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi	50
3.3.2.	pcDNA4/TO-Park2 Yabani Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi	51
3.3.3.	pcDNA4/TO-Park2 Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi	51
3.3.4.	pPAL7- Park2 Yabani ve Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi	51
3.3.5.	pMAL-c4X-Park2 Yabani ve Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi	52
3.3.6.	pcDNA4/TO-GFP-Park2 Yabani ve Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi	53
3.4.	Hücre Kültürü	54
3.4.1.	Hücre Çizgilerinin Hazırlanması	54
3.4.1.1.	Hücrelerin Büyütülmesi	54
3.4.1.2.	Hücrelerin Dondurulması	55
3.4.1.3.	Hücrelerin Çözülmesi	55
3.4.1.4.	Hücreleri Pasajlanması	55
3.4.1.5.	Hücrelerin Sayılması	56
3.4.2.	İmmün Floresan Mikroskopisi	56
3.4.2.1.	Hücrelerin Cover-Sliplere Sabitlenmesi ve İmmünboyanması	56
3.4.3.	Elektrotransfeksiyon ile Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması	57
3.4.3.1.	Transfeksiyon	57
3.4.3.2.	Tek Hücre Seçimi ve Klon Eldesi	57
3.5.	Protein Analizleri	60
3.5.1.	Protein Özütlerinin Hazırlanması	60
3.5.1.1.	SH-SY5Y Hücrelerinden Protein Özütlerinin Hazırlanması	60
3.5.1.2.	<i>E.coli</i> Hücrelerinden Protein Özütlerinin Hazırlanması	60
3.5.1.3.	Nüklear ve Sitoplazmik Protein Özütlerinin Hazırlanması	61
3.5.2.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Lowry Assay)	61
3.5.3.	Protein Saflaştırma	62
3.5.3.1.	Parkin-Exact Tag Yabani Tip ve Mutant Rekombinant Parkin Proteininin Saflaştırılması	62
3.5.3.2.	Parkin-MBP Tag Yabani Tip ve Mutant Rekombinant Parkin Proteininin Saflaştırılması	63
3.5.4.	Western Blotlama	63
3.5.5.	<i>In Vitro</i> Ubikuitinasyon Assay	64
3.6.	Kullanılan Proteomiks Teknikleri	67
3.6.1.	2DE-Jel Elektrofrezisi	67
3.6.2.	Difference Gel Electroporesis (DIGE)	67
3.6.3.	2DE-Temelli Fosfoproteomiks	68
3.6.3.1.	Fosfoproteinlerin ProQ Dimond ile Boyanması	68
3.6.4.	Jel İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi (In-Gel Digestion)	70
3.7.	Analizlerde Kullanılan Programlar	71
4.	BULGULAR	72
4.1.	Yabani ve Mutant Parkin Proteinlerinin Hücre Kültüründe İfade Edilmesi	72

4.1.1.	Mutant <i>Park2</i> Geninin Eldesi	72
4.1.2.	Yabani Tip <i>Park2</i> Geninin Eldesi, Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve Dizi Analizi	74
4.1.3.	Yabani Tip <i>Park2</i> PZR Ürününün pCR2.1-TOPO Vektörüne Klonlanması	74
4.1.3.1.	Yabani Tip <i>Park2</i> Geninin pcDNA4/TO Vektörüne Alt-Klonlanması	78
4.1.4.	SH-SY5Y TetR <sup>+</sup> Stabil Hücre Hattının Oluşturulması	78
4.1.5.	SH-SY5Y-TetR <sup>+</sup> -Park2 Yabani Tip ve Mutant Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması	81
4.2.	Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerinin Karakterizasyonu	81
4.2.1.	Yabani ve Mutant Tip Parkin Proteinlerinin Post-Translasyonel Modifikasyonları	81
4.2.2.	Stabilite Farklılıkları	84
4.2.3.	Lokalizasyon Farklılıkları	87
4.2.3.1.	Mutant ve Yabani Tip Parkin Proteinlerin Sitoplazmik ve Nükleer Protein Formları	87
4.2.3.2.	pcDNA4/TO-GFP-Park2 Yabani Tip ve Mutant Rekombinant Plazmit ile Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması	89
4.2.4.	Aktivite Farklılıkları	92
4.2.4.1.	pPAL7-Park2 Klonundan İfade Edilen Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteininin Saflaştırılması	96
4.2.4.2.	pMal-c4X-Park2 Klonundan İfade Edilen Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteininin Saflaştırılması	99
4.2.4.3.	<i>In vitro</i> Parkin Ubikuitin Aktivitelerinin Ölçülmesi	99
4.2.5.	Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerini Eksprese Eden SH-SY5Y Hücrelerinin Proteomlarının Analizleri	103
4.2.5.1.	Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerini Stabil Olarak Eksprese Eden SH-SY5Y Hücrelerinin Proteom Profillerinin 2DE-DIGE Metodu Kullanılarak Karşılaştırılmalı Analizlerinin Yapılması	103
4.2.5.2.	Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerini Stabil Eksprese Eden SH-SY5Y Hücrelerinin Fosfoprotein Profillerinin Karşılaştırılması	126
5.	TARTIŞMA	131
6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	145
7.	EKLER	146
8.	KAYNAKLAR DİZİNİ	150
9.	ÖZGEÇMİŞ	167

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

6-OHDA	6-Hidroksidopamin
ADPD	Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı
AmBic	Amonyum Bikarbonat
ARJP	Otozomal Resesif Juvenil Parkinsonizm
ATP13A2	ATPase tip 13A2
Ca-Mg	Kalsiyum-Magnezyum
cDNA	Komplementer DNA
COR	C-terminal of ROC domain
DA	Dopamine
DAT	Dopamin Transporter
DBS	Derin Beyin Stümilasyonu
DIGE	Difference Gel Electroporesis
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen-diamin-tetraasidik asit
ER	Endoplazmik Retikulum
ERGİC	ER- Golgi ara kompartmanı
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FBS	Fetal Sığır Serumumu
GFP	Yeşil Floresan Protein
GI	Gastrointestinal
GIGYF2	GRB10 interacting GYF protein 2
GSH	Glutathione
HTRA2	HtrA serin peptidaz 2
IAA	İyodaAsetamid
IBR	In-Between RING Domain
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
K	Lizin amino aside
kDA	Kilo Dalton
KRS	Kufor-Rakeb
LB	Luria Bertani Besiyeri
LC	Lewy Cisimleri
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry
LRRK2	Lösin-rich Repeat Kinaz 2
mAb	monoklonal Antikor
MAO-B	Monoamin Oksidaz B
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase domain
MBP	Maltoz Bağlama Proteinine
Mfn	Mitofusin
MH	Mueller-Hilton Besiyeri
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin
mtDNA	Mitokondriyal DNA

MW	Moleküler Ağırlık
NA	Norepinefrin
NaF	Sodyum Florid
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NO	Nitric Oksit Radikali
ONOO <sup>-</sup>	Peroksintril
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
Paraquat	1,1-dimetil-4,4-bipiridinyum
PBS	Fosfat Tuz Tampon çözeltisi
PH	Parkinson Hastalığı
PINK1	PTEN-induced Kinaz 1 geni
PSB	Protein Solubilization Buffer
PTM	Translasyon Sonrası Modifikasyon
PVDF	Polyviniliden-difluoride
PZR	Polymeraz Zincir Reaksiyonu
RING1 ve RING2	Really Interesting New Gene Domain
RNA	Ribonükleik asit
ROC	Ras in complex proteins domain
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PZR	Reverse Transcription PZR
SCF	Skp1-Cullin-Fbox
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SN	Substantia Nigra
SNCA	alfa-sinüklein geni
SNpc	Substantia Nigra pars kompakta
SOD	Superoksit Dismutaz
βME	Betamerkaptoetanol
TBS	Tris Tuz Tampon çözeltisi
Ub	Ubikuitin
UBL	Ubiquitin-like Domain
UCH-L1	Ubikuitin C-terminal Hidrolaz L1
UKPDS	United Kingdom Parkinson's Disease Society
UPD ve ya RING0	Unique Parkin Domain
UPS	Ubikuitin Proteozom Sistemi
VDAC1	Voltage-Dependent Anion Channel 1
YT veya WT	Yabani Tip
α-SYN	alfa-sinüklein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> James Parkinson tarafından 1817 de yazılmış Parkinson Hastalığı ile ilişkili ilk doküman	3
<b>Şekil 2.2.</b> Parkinson Hastalığının histolojik lezyonları	10
<b>Şekil 2.3.</b> Ubikuitin proteozom sistemi	23
<b>Şekil 2.4.</b> <i>Park2</i> geninin genom ve transkriptomda ifadesi ve Parkin proteininin fonksiyonel domainlerinin gösterimi	26
<b>Şekil 3.1.</b> Kolonizasyon oluşturan hücrelerin büyük kültür kaplarına aktarılması	59
<b>Şekil 4.1.</b> Mutant Parkin proteinindeki mutasyonların Chromos programı ile gösterimi ve ConSurf analizi	73
<b>Şekil 4.2.</b> <i>Park2</i> genini içeren PZR ürününün agaroz jel görüntüsü	75
<b>Şekil 4.3.</b> Clustel W analizi sonucu yabani tip ve mutant Parkin protein dizilerinin karşılaştırılmalı analizi	76
<b>Şekil 4.4.</b> pCR2.1-TOPO-Park2 yabani tip rekombinant vektörün EcoRI ve SacI enzimleri kesimi agaroz jel görüntüsü	77
<b>Şekil 4.5.</b> pCDNA4/T-Park2 yabani tip rekombinant vektörün EcoRI ve BamHI enzimleri kesimi agaroz jel görüntüsü	79
<b>Şekil 4.6.</b> Farklı hücre hatlarının TetR antikoruna ile western blot taraması	80
<b>Şekil 4.7.</b> SH-SY5Y-PARK2 mutant ve SH-SY5Y-PARK2 yabani tip hücrelerin farklı zamanlarda taranması ve seçilmesi	82
<b>Şekil 4.8.</b> Western blot metodu ile tetrasiklin indüksiyonu öncesi ve sonrası Parkin proteininin yabani tip ve mutant formlarının ekspresyonlarının gösterilmesi	83
<b>Şekil 4.9.</b> Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin % 8-15 gradient jel üzerindeki western blot görüntüsü	85

<b>Şekil 4.10.</b> Yabani tip ve mutant Parkin proteinleri fosforilasyon profillerinin 2DE-jel elektroforezi ile western blot, ProQ-Diamond ve Sypro-Ruby boyamaları karşılaştırmalı analizi	86
<b>Şekil 4.11.</b> Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin hücre içerisindeki kararlılıklarının karşılaştırılması	88
<b>Şekil 4.12.</b> Yabani tip ve mutant Parkin'in sitoplazmik (C) ve nükleer (N) formlarının western blot yöntemi ile karşılaştırılması	90
<b>Şekil 4.13.</b> Yabani tip ve mutant Parkin'in SH-SY5Y hücrelerindeki lokalizasyonlarını belirlemek amacı ile yapılan immunfloresan çalışmalar	91
<b>Şekil 4.14.</b> pCDNA4/TO-GFP klon plazmitlerin BamHI-HindIII enzimleri kesimlerinin agaroz jel görüntüsü	93
<b>Şekil 4.15.</b> GFP-pCDNA4TO-Park2 yabani tip ve mutant klon plazmitlerin EcoRI-HindIII-BanHI enzimleri kesimlerinin agaroz jel görüntüsü	94
<b>Şekil 4.16.</b> pGFP-Parkin-yabani tip ve pGFP-Parkin-mutant klonlarını tetrasiklin altında kontrollü eksprese eden SH-SY5Y hücrelerinde Parkin lokalizasyonunun hem GFP-filtresi ile hem de Texas red ile görüntülenmesi	95
<b>Şekil 4.17.</b> pPAL7-Park2 yabani tip ve mutant klon plazmitlerin EcoRI-HindIII enzimleri kesimlerinin agaroz jel görüntüsü	97
<b>Şekil 4.18.</b> İndüklenmemiş ve indüklenmiş pPAL7-yabani tip plazmiti içeren <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücrelerinden hazırlanan protein özütlerinin çözülebilir ve çözülemez formlarının Parkin antikoru ile western blot taraması	98
<b>Şekil 4.19.</b> Profinity eXact Tag-Parkin yabani tip rekombinant protein saflaştırma denemesi sonrası anti-Parkin antikoru ile yapılan western blot taraması	98
<b>Şekil 4.20.</b> <i>E. coli</i> DH10B hücresinden izole pMAL-c4X-Park2 yabani tip ve mutant rekombinant plazmitlerin EcoRI-HindIII enzimleri kesimi agaroz jel görüntüsü	100
<b>Şekil 4.21.</b> MBP-Parkin protein saflaştırması % 12 SDS PAGE jeli ve western blot görüntüleri	101

<b>Şekil 4.22.</b> <i>In vitro</i> yabancı tip ve mutant Parkin proteinlerin ubikitilasyon aktivitesi ölçümlerinin western blot ile gösterimi	102
<b>Şekil 4.23.</b> Yabancı tip ve mutant Parkin proteinlerini eksprese eden SH-SY5Y hücre protein özütlerinin farklı floresan boya ile işaretlenmesi sonrası bir araya getirilerek yapılan deneylerden elde edilen 2DE jel imajları	106
<b>Şekil 4.24.</b> Jel üzerindeki protein spotlarının dağılım eğrileri (Scatter Plot)	107
<b>Şekil 4.25.</b> PDQest analiz sonucunda istatistiksel olarak ifadelerinde farklılıklar gösteren spotlar	108
<b>Şekil 4.26.</b> Belirlenen proteinlerin hücre içi lokalizasyonları	109
<b>Şekil 4.27.</b> Yabancı tip ve mutant Parkin proteinlerinin ekspresyonunun indüklendiği ve indüklenmediği hücrelerden elde edilen protein özütleri ile 14-3-3 proteininin western blot taraması	117
<b>Şekil 4.28.</b> Yabancı tip ve mutant Parkin proteinlerinin ekspresyonunun indüklendiği ve indüklenmediği hücrelerden elde edilen protein özütleri ile UCHL-1 proteininin western blot taraması	118
<b>Şekil 4.29.</b> Canonical yolak analizi sonucu regüle olan proteinlerin ilişkilendirildiği yolaklar	121
<b>Şekil 4.30.</b> IPA analizi sonucu belirlenen sinyal ve etkileşim yolakları	122
<b>Şekil 4.31.</b> IPA analizi sonucu belirlenen transkripsiyonun düzenlenmesi yolakları	123
<b>Şekil 4.32.</b> IPA analizi sonucu belirlenen mitokondriyal metabolizma yolakları	124
<b>Şekil 4.33.</b> Üç farklı etkileşim yolağının birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan protein yolakları arasındaki etkileşimler	125
<b>Şekil 4.34.</b> Yabancı tip ve mutant Parkin proteinlerini eksprese eden SH-SY5Y hücre protein özütlerinin ProQ-Diamond ve Sypro-Ruby floresan boyaması sonrası 2DE jel imajları	127
<b>Şekil 4.35.</b> IPA analizi ile fosfoproteomiks sonucu ekspresyonu değişen proteinler arasındaki etkileşimler	130

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Parkinson Hastalığında görülen motor ve motor olmayan semptomlar	5
<b>Çizelge 2.2.</b> Parkinson Hastalığı ile sıklıkla karıştırılan diğer nörodejeneratif hastalıklar	7
<b>Çizelge 2.3.</b> Parkinson Hastalığına ait gen bölgeleri	11
<b>Çizelge 2.4.</b> Parkinson Hastalığı ile ilişkili mitokondri dinamiğini etkileyen genler ve mitokondri fonksiyonu üzerine etkisi	21
<b>Çizelge 2.5.</b> Parkin ile etkileşime girerek aktivitesine negatif ve ya pozitif etki eden regülatör proteinler	28
<b>Çizelge 2.6.</b> Parkin'in etkileştiği E2 konjuge edici enzimler ve çalışılan model organizmalar	30
<b>Çizelge 2.7.</b> Olası Parkin substratları ve görevleri	31
<b>Çizelge 3.1.</b> Stok antibiyotik konsantrasyonları ve kullanılan miktarlar	35
<b>Çizelge 3.2.</b> Kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışı	36
<b>Çizelge 3.3.</b> cDNA sentez reaksiyonu karışımı	42
<b>Çizelge 3.4.</b> Primerler Listesi ve PZR Şartları	44
<b>Çizelge 3.5.</b> SDS-PAGE jel içeriği	46
<b>Çizelge 3.6.</b> 1:3 oranında kurulan ligasyon reaksiyonu karışımı	48
<b>Çizelge 3.7.</b> Proteinleri immunboyama ile işaretleme prosedürü	58
<b>Çizelge 3.8.</b> Western Blot analizinde kullanılan antikörlerin listesi	65
<b>Çizelge 3.9.</b> <i>In vitro</i> Ubikuitinasyon Assay için kullanılan reaksiyon karışımı	66
<b>Çizelge 3.10.</b> Fosfoproteinlerin Pro-Q Diamond boyası ile boyanma prosedürü	69
<b>Çizelge 4.1.</b> DIGE deneyine ait deney tasarımının özet olarak verilmesi	104



- Çizelge 4.2.** LC-MS/MS analizi sonrası tanımlanan regüle olmuş proteinler, bu proteinlerin görevleri ve lokalizasyonları verilmiştir 110
- Çizelge 4.3.** Çizelge 4.2.'de tanımlanan proteinlerin regülasyon düzeylerinin rakamsal ifadesi 114
- Çizelge 4.4.** Literatürde Parkin ile ilişkisi belirlenerek çalışılan proteinler ve 2DE-DIGE analizi sonucu bulunan proteinlerin karşılaştırmalı tablosu 119
- Çizelge 4.5.** Fosfoproteomiks ile SH-SY5Y hücresi içerisinde ekspresyonu indüklenmiş yabancı tip ve mutant Parkinin hücrenin fosforile olan protein profilinde etkilendiği görülen proteinler ve görevleri 128

## 1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI

Parkinson Hastalığı dünya genelinde en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biridir ve hastalık oluşumunun moleküler mekanizması üzerine yapılan çalışmalar çok çeşitlidir. Hastalığa sebep olan genlerin belirlenmesi ve patolojik etkilerinin anlaşılması tanı ve tedavi açısından önem teşkil etmektedir. Şimdiye kadar *Park2* geninde belirlenen mutasyonların bir çoğu hastalık ile ilişkilendirilmiştir ancak bu ilişkilendirmelerin çoğu detaylı ve moleküler düzeyde yapılmamıştır. *Park2* geninin kodladığı Parkin proteininin E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip olduğu ve hücrede protein temizleme görevi yaptığı düşünülürse, bu proteinin hücre üzerindeki etkilerinin detaylı bir şekilde bilinmesinin önemi daha iyi anlaşılmış olur. Şu ana kadar elde edilen veriler Parkin'in fonksiyon bozukluğunun ubiquitin proteozom sisteminin düzgün çalışmamasına dolayısı ile de parçalanması gereken proteinlerin birikmesine, mitokondri dinamiğinin bozulmasına ve nöronal hücrelerin ölümüne sebep olduğu yönündedir.

Bu tezin amacı erken başlayan Parkinson Hastalığına sebep olan mutant Parkin proteinini moleküler düzeyde karakterize etmek ve SH-SY5Y nöroblastoma hücre proteomunu nasıl etkilediğini anlamaktır.

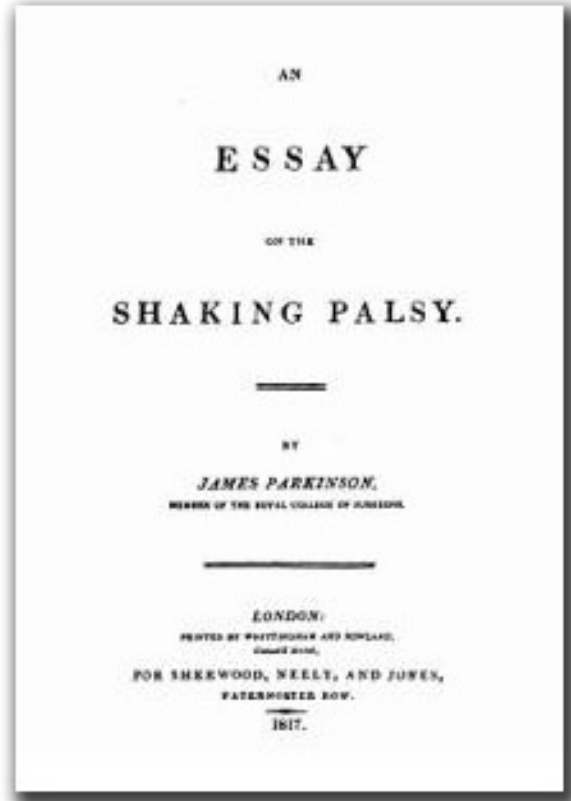
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Parkinson Hastalığı (PH)

Parkinson Hastalığı (PH) bir hareket bozukluğu hastalığıdır ve Alzheimer Hastalığından sonra en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıktır (Hoehn and Yahr, 1967). Dünya genelinde altı milyon insanın Parkinson hastası olduğu bilinmektedir (Morgan et al., 2010). Parkinson Hastalığının başlıca semptomları hastalığın başlangıcından bir süre sonra kendini göstermektedir ve günümüzde hastalığı tamamıyla ortadan kaldıracak bir tedavi metodu bulunmamaktadır. PH'da nörodejenerasyona sebep olan moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bunun en temel nedeni PH'nın kompleks bir hastalık olmasıdır. Başka bir deyişle PH'nın oluşumunda hem çevresel hem de genetik faktörler rol alır (Gasser, 2007). Çevresel faktörlerin kontrolü kolay olmadığından dolayı hangi çevresel faktörler ne şekilde PH oluşumunu etkiler sorusunu yanıtlamak kolay değildir. Ancak genetik faktörlerin moleküler çalışmalar yolu ile belirlenmesi daha net sonuçlar verir ve PH'nın oluşum mekanizmasını açıklamaya yardımcı olur. Kullanılan genetik yaklaşımlardan birisi PH'da etkisi olduğu düşünülen genler üzerindeki mutasyonların belirlenmesi ve bu mutasyonların ilgili proteinlere nasıl yansıdığına ortaya çıkarılmasıdır. Elde edilen veriler PH oluşumunda rol alan metabolik yolların ortaya çıkarılmasına ve bu yollarda anahtar rol oynayan ve gelecekte PH tedavisinde biyohedef özelliği gösterebilecek moleküllerin ortaya çıkarılmasına yardımcı olmaktadır. PH ile ilgili yapılan araştırma sayısının çokluğu, hastalıktan etkilenen bireylerin kurduğu dayanışma dernekleri ve çalışmalara ayrılan bütçeler bu hastalığın toplum açısından çözümünün ne derece önemli olduğunu göstermektedir.

#### 2.1.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi

Parkinson Hastalığı ilk olarak İngiliz fizikçi ve farmakolog James Parkinson tarafından 1817 yılında "*An essay on the shaking palsy*" adlı makalesi ile klinik bir sendrom olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.1). James Parkinson hastalığın semptomlarını kaslarda zayıflama ile istem dışı titreme, duruş ve postür bozukluğu, kısa sürede yürüyüş hızındaki artış, duyuların ve karar gücünün değişmesi olarak tarif etmiştir. Bu tanıma göre Dr. Parkinson; dinlenme halinde titreme, akinezi, yapısal instabilite ve yürüyüş problemleri gibi hastalığa ait bazı motor semptomları da tanımlamıştır (Parkinson, 2002).



**Şekil 2.1.** James Parkinson tarafından 1817 de yazılmış Parkinson Hastalığı ile ilişkili ilk doküman (<http://www.pdmdcenter.com/articles/HopkinsWeb/index.html>).

Jean Martin Charcot, James Parkinson'un orijinal tanımına ek olarak hastalarda gözlediği kas rijiditesini ve duyuşal değişiklikleri de ekleyerek hastalığı tekrar tanımlamış ve hastalığa onu ilk kez tanımlayan James Parkinson'un adını vermiştir (Goetz, 2002). Parkinson Hastalığının patolojisinde en bilinen özellik substantia nigra pars kompaktada (SNpc) bulunan nöronların kaybıdır (Cookson, 2005). Arvid Carlsson 1958'de memeli beyinlerinde nörotransmitter olarak dopamini (DO) bulmuştur (Carlsson ve Waldeck, 1958). Ehringer ve Hornykiewicz ise 1960'da dopamin eksikliğinin ve SN'daki nöron kaybının PH oluşumundaki etkisinin farkına varmışlardır (Polymeropoulos et al., 1997). 1960'larda dopamin öncüsü levo-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) PH'ya karşı tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Bu zamana kadar PH tedavisinde kullanılan ilaçlar dopaminerjik nöron dejenerasyonunu engelleme ya da yavaşlatma yönünde etkili olmayıp yalnızca semptomları hafifletmektedir (Vidailhet et al., 1999). Diğer nörodejeneratif hastalıklar gibi PH sporadik ve ya kalıtsal formdadır. İlk olarak tanımlanan gen,  $\alpha$ -sinüklein kodlayan SCNA'dır ve bu gendeki Ala53Thr mutasyonunun kalıtsal PH'ya sebep olduğu bilinmektedir (Polymeropoulos et al., 1997). Daha sonra birçok genetik faktör tanımlanmıştır ve bugün itibarıyla kalıtsal formda PH'ya sebep olan 18 bölge belirlenmiştir (Kumar et al., 2011). Kalıtsal hastalıkların moleküler mekanizmaları hakkında ne kadar çok bilgi sahibi olunursa hastalığın tedavisi adına o kadar çok mesafe kat edilmiş olacaktır.

### 2.1.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri ve Tanısı

Dinlenme halindeki titreme, kasların istemsiz kasılması, hareketlerde yavaşlama, hafif kamburumsu duruş ve postural reflekslerde bozulma PH motor semptomları arasında yer alır (Corti et al., 2005). PH'nın ayrıca motor olmayan semptomları olarak bilinen etkileri de tanımlanmıştır. Bu etkiler arasında psikiyatrik bozukluklar, bilişsel işlev bozukluğu, uyku bozuklukları, duyuşal isteklerin değişmesi ve otonom işlev bozuklukları sayılabilir (Aygün, 2009) (Çizelge 2.1.). Parkinson Hastalığında görülen motor ve motor olmayan semptomlar çizelgede verilmiştir.

Parkinson Hastalığının tanısında kullanılan üzerinde fikir birliği yapılmış evrensel herhangi bir genetik test veya moleküler metot bulunmamaktadır. Bu nedenle tanı klinik bulgular ışığında konulmaktadır. Uzman hekimler tarafından "*United Kingdom Parkinson's Disease Society (UKPDS) Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*" ve "*National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Diagnostic criteria for*

**Çizelge 2.1.** Parkinson Hastalığında görülen motor ve motor olmayan semptomlar

<b>Motor Semptomlar</b>	<b>Motor Olmayan Semptomlar</b>
Resting Tremor (Dinlenme halinde el ve ayakta titreme)	Psikiyatrik bozukluklar (Depresyon, anksiyete)
Bradikinezi (Hareketlerin yavaşlaması)	Bilişsel işlev bozuklukları (Demans)
Rijidite (Kasların istemsiz kasılması ve sertliği)	Uyku bozuklukları (Uyku bölünmesi- Uykusuzluk)
Postural instabilite (Hafif kamburumsu duruş ile öne doğru küçük adımlarla yürüyüş)	Apathy (Duyusal isteklerin değişimi)
Hipomimia (Mimik ve ifade bozukluğu)	Otonom işlev bozukluğu (Bradikardi, aritmi, kabızlık, idrar yapma kusurları, cinsel işlev bozukluklar)
Dysarthria (Konuşma bozukluğu)	
Ayakları sürüyerek yürüme bozukluğu	

*Parkinson's Disease*” tanı kriterleri kullanılmaktadır. Ancak PH tanısı herhangi bir biyobelirteç ile desteklenemediğinden dolayı zaman zaman yanlış konulabilmektedir. Yapılan araştırmalar konulan PH tanılarının doğruluk oranının % 76 civarında olduğunu göstermektedir (Hughes et al., 1992; Kasap ve Akpınar, 2011). Çizelge 2.2.’de PH ile sıklıkla karıştırılan diğer hastalıkların listesi verilmiştir.

### **2.1.3. Parkinson Hastalığının Tedavisi**

Günümüzde Parkinson Hastalığı tedavisinde uygulanan yaklaşımların çoğu semptomatik olup yan etkileri uzun vadede yıkıcı olan tedavilerdir. Tedavide temel strateji dopamin eksikliğinin tamamlanmasıdır. Dopamin kan beyin bariyerini geçemediğinden direk tedavi amaçlı kullanılamamaktadır. Dopamin öncülü olan L-Dopa ilk olarak 1960’larda tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmış ve klinik semptomları yüksek oranda hafifletmiştir. Yüksek miktardaki L-Dopa sadece beyinde değil gastrointestinal (GI) bölgede de dopamine çevrilerek aktive olmaktadır. Bundan dolayı GI enzim inhibitörleri (karbidopa) kullanılarak tedavi uygulanmıştır. Daha sonra dopamin agonistleri sentetik olarak sentezlenmiş ve tedavide kullanılmıştır (Goldstein, 2009). Hastalığın tedavisi uzman doktor kontrolünde hastanın ilaçlara verdiği yanıtlar göz önüne alınarak dozu ve yan etkileri ayarlanarak uygulanmaktadır. Bir diğer yaklaşım olan Derin Beyin Stimülasyonu (*Deep Brain Stimulation, DBS*) yönteminde basal gangliaya mikroeletrod cerrahi müdahale ile yerleştirilmektedir. Bu yaklaşım L-Dopa’nın etkinliği düştüğünde uygulanan bir yöntemdir (Marras and Lang, 2008). Tüm bu tedavi stratejileri nöronal dejenerasyonu yavaşlatma ya da durdurma amaçlı değil hastalık semptomlarını azaltma amaçlıdır.

### **2.1.4. Parkinson Hastalığında Görülen Patolojik Bulgular**

SN’da bulunan dopaminerjik nöronlar nöromelanin pigmenti içermektedir. PH’nın patolojik olarak tanısı otopsi sonrası alınan beyin dokularındaki hücre ölümünden kaynaklı depigmentasyon ve Lewy cisimlerinin bulunması ile yapılır. Lewy cisimleri ilk olarak Heinrich Lewy tarafından 1929’da substantia inominata nöronlarında rapor edilmiştir. Daha sonra Treiakov tarafından SNpc nöronlarında çökelti oluşumları tanımlanarak Lewy cisimleri (LC) adı verilmiştir. LC, alfa-sinüklein ( $\alpha$ -SYN) ve ubikuitin pozitif protein ve lipid çökeltileri olarak tanımlanan intrasitoplazmik çökeltilerdir (Şekil 2.2.) (Elibol, 2008; Engelder, 2008).

**Çizelge 2.2.** Parkinson Hastalığı ile sıklıkla karıştırılan diğer nörodejeneratif hastalıklar.

Alzheimer's Hastalığı
İdiyopatik Parkinson Hastalığı
İlerleyici supranükleer felç
Çoklu sistem atrofisi
Striatali kapsayan Alzheimer tipi patoloji
Lacunar durum
Nigral atrofi
Postensefalitik parkinsonizm
Essential tremor
Psikogenik tremor
İlaçla indüklenmiş parkinsonizm



Lewy cisimleri SNpc'daki nöronların sitoplâzmalarında olduğu gibi korteksteki non-dopaminerjik nöronlarda da bulunabilen, merkezi bir çekirdek ve bir merkezden yayılan filamentlerden oluşan yuvarlak proteinöz yapılardır. LC'nin en önemli komponentinin  $\alpha$ -SYN olduğu bilinmesine rağmen, agregasyonun moleküler mekanizması, biyolojik rolü ve PH patolojisine etkisi halen belirsizdir. LC yapısında  $\alpha$ -SYN, ubikuitin ve şimdiye kadar belirlenmiş yaklaşık 80 protein bilinmektedir (Licker et al., 2009).

LC yapısında bulunan  $\alpha$ -sinüklein, sinüklein protein ailesine ait 140 amino asitten oluşan yaklaşık 19 kDa'luk ve beyinde yoğun olarak ifade edilen bir proteindir. Fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen sinaptik veziküllerin boyutu, resirkülasyon ve plastisitesinin düzenlenmesi gibi nörotransmisyonunda görev almaktadır (Moore et al., 2005). Doğal formda  $\alpha$ -SYN sitoplâzmadaki çözülebilir ve katlanmamış formda bulunmaktadır.  $\alpha$ -SYN monomerleri düşük pH, yüksek sıcaklık, organik solventler, metal iyonları ve pestisitlere maruz kaldıklarında hücre membranında çökeltiler oluşturabilmekte (Cole et al., 2005) ve membran potansiyelini değiştirerek hücre ölümüne sebep olabilmektedirler (Bonini and Giasson, 2005). Lipid membranında  $\alpha$ -helikal formda olan  $\alpha$ -SYN, LC'lerde fibriller oluşturmak için beta sheet konformasyonu almaktadır.  $\alpha$ -SYN tek başına PH patolojisini oluşturmamaktadır. Çünkü  $\alpha$ -SYN sadece PH da değil diğer nörodejeneratif hastalıklarda ve sadece nöronlarda değil diğer hücre tiplerinde de oluşabilmektedir.

## **2.2. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi ve Moleküler Mekanizmaları**

Parkinson Hastalığı etiyolojik olarak sporadik ya da idiopatik PH ve kalıtsal ya da ailesel PH şeklinde sınıflandırılmaktadır (Simon-Sanchez et al., 2007). Sporadik PH vakalarının etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, proteozomdaki fonksiyon bozukluğu, inflamasyon, protein çökelekleri ve çeşitli kimyasal toksinler gibi genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Dawson and Dawson, 2002, 2003; Hunot and Hirsch, 2003; Paolini et al., 2004; Savitt et al., 2006; Vila et al., 2000).

PH primer koku alma bozukluğunun geliştiği bir hastalıktır. İlk belirtilerden biri olarak koku kaybı gösterilmiştir. Sporadik PH'da koku alma duyusunun bozulması klinik semptomlar ortaya çıkmadan gelişen bulgular arasında yer almaktadır (Bahuleyan and Singh, 2012). Hawkes ve arkadaşlarına göre 'ikili hit teori' ile bilinmeyen bir patojen burun ve bağırsak yolu olmak üzere iki şekilde beyine ulaşmaktadır. Olfactory yolu aracılığı ile olana anterograd yol, enteric plexus ve preganglionic vagal fibriller aracılığı ile olana retrograd yol adı verilmektedir (Hawkes et al., 2007). Araştırmacılara göre

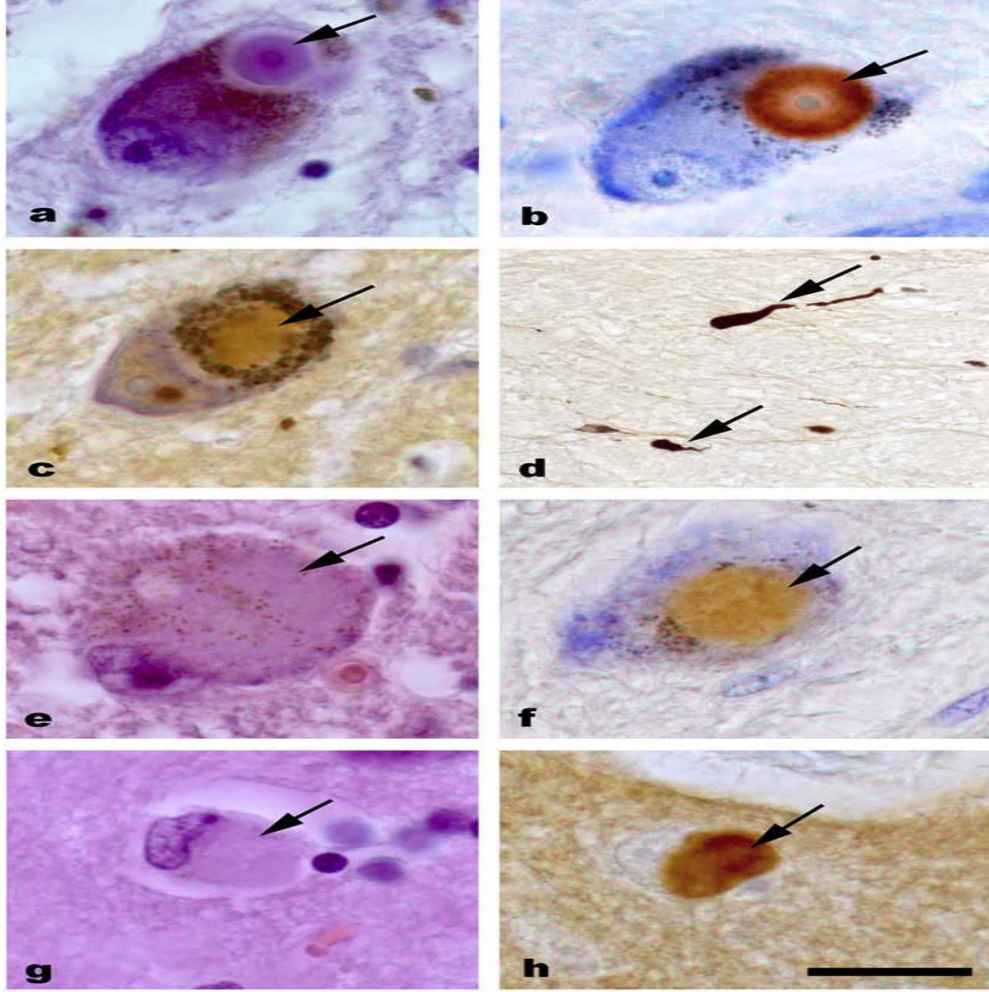
başlangıç prosesi nazaldır. Patojen tükürük ve mukus ile yutulmakta ve mide duvarını geçerek vagus distal fiberlerini istila etmektedir. Patojen medulladaki vagal dorsal motor nükleuslara zarar vermek için geri hareket ederek motor vaguslarına yükselmektedir. Yani nazal mukozadan temporal lobdaki medial amygdala, olfaktori tüberkil ve piriform ve periamygdalear korteks gibi olfaktori yapılarına dolayısı ile beyine ulaşmaktadır (Hawkes et al., 2009).

### **2.2.1. Çevresel Faktörler**

Çevresel faktörlerin PH oluşumundaki önemi, ilk olarak 1983'de sentetik olarak üretilen MPTP'nin (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin) hızlı ve geri dönüşümsüz şekilde ilaç bağımlılarında PH semptomlarının oluşturması sonucu anlaşılmıştır (Tipton et al., 1986). MPTP glial monoamin oksidaz B (MAO-B) enzimi ile MPP<sup>+</sup> (1-metil-4fenilpiridinium) toksin maddesine yıkılmaktadır ve bu madde mitokondri Elektron Taşıma Zinciri (ETZ) kompleks I' i inhibe ederek SN'da nöron hücre ölümüne sebep olmaktadır (Corti et al., 2005). MPTP'nin keşfiyle başka kimyasal maddelerinde PH oluşumuna katkıda bulunacağı düşünülmüştür. Zaman içerisinde yapılan çalışmalar MPTP ye ilaveten başka kimyasal maddelerin de varlığını ortaya çıkarmıştır. Örneğin, Paraquat (1,1-dimetil-4,4-bipiridinyum) farelerde nigral dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna sebep olan MPP<sup>+</sup> yapısal benzeri bir moleküldür ve herbisit içeriğinde bulunmaktadır (McCormack et al., 2002). Rotenone ve diedrin gibi sentetik diğer pestisitleri kullanan kişilerde de PH semptomları görülmüştür (Langston and Ballard, 1983; Simon-Sanchez et al., 2007; Tanner, 1992). Günümüzde 6-Hidroksidopamin (6-OHDA), MPTP, rotenone ve paraquat PH hayvan modeli oluşturmak için en sık kullanılan kimyasal ajanlardır (Potashkin et al., 2011).

### **2.2.2. Genetik Faktörler**

Önceleri PH'nın genetik tabanlı olmayan bir hastalık olduğu düşünülüyordu. Ancak dünyanın farklı bölgelerinde yapılan araştırmalar ve elde edilen bulgular PH'nın inanılan aksine genetik bir tabanı olabileceğini gösterdi. PH'ya neden olan genlerin keşfi ile hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılması hız kazanmıştır. Bugüne kadar 18 genetik bölge (PARK1-18) ve Gaucher's lokus otozomal dominant ve otozomal resesif PH ile ilişkili bulunmuştur (Çizelge 2.3.). Bu lokuslarda bulunan genlerin bir kısmı isimlendirilmiştir. Etkilenmiş aile bireylerinin taşıdıkları mutasyonların bazıları belirlenmiş ve bu mutasyonların PH oluşumundaki etkileri çalışılmıştır. Bu mutasyonların bazıları sporadik olarak da ortaya çıkmakta ve PH'ya neden olmaktadır.



**Şekil 2.2.** Parkinson Hastalığının histolojik lezyonları. a-c: SNpc'da görülen LC, d: Lewy nöritleri, e-f: pale badisi, g-h: entorhinal korteksteki kortikal Lewy cisimleri (a, e ve g: Hematoksilin and eosin boyaması; b, d, f ve h: anti- $\alpha$ -sinüklein antikotu ile immünohistokimyası, c: anti-ubikuitin antikotu ile immünohistokimyası. Bar skalası: a-c ve e-h: 20  $\mu$ m, d: 60  $\mu$ m) (Licker et al., 2009).

**Çizelge 2.3.** Parkinson Hastalığına ait gen bölgeleri

<b>Gen Lokus</b>	<b>Kromozom</b>	<b>Gen ürünü</b>	<b>Kalıtım paterni</b>	<b>Olası fonksiyonu</b>
<b>PARK1/4</b>	4q21-q23 / 4p15	$\alpha$ -sinüklein (SNCA)	OD	Vezikül trafiği/sinaptik plastisite
<b>PARK2</b>	6q25.2-27	Parkin	OR	E3 Ubikuitin Ligaz
<b>PARK3</b>	2p13	?	OD	
<b>PARK5</b>	4q14	UCH-L1	OD?	Ubikuitin hidrolaz ?
<b>PARK6</b>	1p35-36	PINK1	OR	Mitokondriyal kinaz
<b>PARK7</b>	1p36	DJ-1	OR	Sitozolik redoks duyarlı protein
<b>PARK8</b>	12p11.2-q13.1	LRRK2	OD	MAPKK kinaz
<b>PARK9</b>	1p36	ATP13A2	OR	Lizozomal H <sup>+</sup> -ATPase
<b>PARK10</b>	1p32	RNF11	SUS	
<b>PARK11</b>	2q34	GIGYF2	OR	
<b>PARK12</b>	Xq21-q25		SUS	
<b>PARK13</b>	2p12	Htra2/Omi	SUS	Mitokondriyal proteaz
<b>PARK14</b>	22q13.1	PLA2G6	OR	
<b>PARK15</b>	22q12-q13	FBXO7	OR	
<b>PARK16</b>	1q32	Bilinmiyor		
<b>PARK17</b>	4q16	VPS35 (GAK)	OD	
<b>PARK18</b>	6p21.3	EIF4G1	LOPD	
<b>Gaucher's lokus</b>		GBA	OD	

OR: otozomal resesif. OD: otozomal dominant. SUS: susceptibiliyet locus for idiopathic PH. UCH-L1: Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1. PINK1: Phosphatase and Tensin (PTEN)-induced kinase 1. LRRK2: leucine-rich repeat kinase 2. RNF11: RING-finger protein 11. Htra2/Omi: High temperature regulation A serine peptidase2/Omi. VPS35: vacuolar protein sorting-associated protein 35 . EIF4G1: Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1. GBA: Glucosylceramidase (Gasser et al., 2011; Houlden et al., 2011)

Aşağıda bu genlere ait çalışmalara özet olarak değinilmiştir.

#### PARK1 ve PARK4

Parkinson hastaları ile ilk linkaj çalışmaları Polymeropoulos ve arkadaşlarının kromozomun 4q21 lokusunu haritalamasıyla başlamıştır ve buldukları bu bölgeye PARK1 adını vermişlerdir (Polymeropoulos et al., 1996). Bu bölgede alfa-sinüklein (*SNCA*) geni bulunmaktadır ve bu gendeki mutasyonlar otozomal dominant PH'ya (ADPD) sebep olmaktadır. *SNCA* genindeki Ala53Thr mutasyonu tipik bir belirteçtir ve ilk olarak hastalıktan etkilenmiş Yunan/İtalyan ailelerde belirlenmiştir (Golbe et al., 1996; Polymeropoulos et al., 1997). Daha sonra bir Alman ailesinde Ala30Pro amino asit değişimi (Kruger et al., 1998) ve bir İspanyol ailesinde Glu46Lys mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyon taşıyıcılarında demansa ait Lewy cisimleri patolojisi gibi hastalık kriterleri gözükmemektedir (Zarranz et al., 2004). *SNCA* gen dozu da PH oluşumunda etkindir. Gen multiplikasyonu ilk olarak Amerikan bir ailede tanımlanmıştır. Gen multiplikasyonu olan bireylerde protein yapısal olarak bir değişiklik taşımasa da (yabani tip alfa-sinüklein) protein fazla miktarda sentezlendiğinden dolayı birikmekte, çökmekte ve bu yolla PH'ya sebep olmaktadır (Gasser et al., 2011). Alfa-sinüklein genindeki nokta mutasyonları, intronik varyasyonlar ve promotor dizisindeki değişimler sporadik PH'ya sebep olabilmektedir (Kruger et al., 1999). Alfa-sinüklein rolü hakkında kesin bir bilgi olmamasına rağmen, bu proteinin sinaptik plastisite (Clayton and George, 1999), dopamin salınım ve taşınımında (Wersinger and Sidhu, 2003), mikrotübül ile ilişkili tau proteininin fibrilizasyonunda (Mamah et al., 2005) ve kaspaz-3 aktivasyonunun azalmasında (Adamczyk et al., 2010) rol alabileceği önerilmiştir. Alfa-sinüklein PH hastalarının beyinlerinde Lewy cisimlerinin ana filamentsel ögesi olarak bulunmaktadır (Hardy et al., 2006; Spillantini et al., 1997). Patolojik olarak fibriler  $\alpha$ -SYN-çökeltileri (Lewy patoloji) *SNCA* mutasyonlarına sahip tüm hastalarda bakıldığında sadece substantia nigra (SN) da değil mesocortical ve neocortical nöronlarda da görülmektedir. Oluşan  $\alpha$ -SYN pozitif çökelek yapıları PH haricinde başka nörodejeneratif hastalılarda da görülebilmektedir. Bu hastalıklara genel olarak sinükleopatiler adı verilmektedir (Eller and Williams, 2011).

#### PARK2

PARK2 lokusu ilk defa Yamamura ve arkadaşları tarafından kromozomun 6q25.2-27 bölgesinde Japon bir ailede tanımlanmış ve erken başlayan otozomal resesif juvenil PD (ARJP) olarak isimlendirilmiştir (Kitada et al., 1998). *Park2* geni 12 ekzona sahiptir.

Parkin proteini çoğunluğu sitozolde bir kısmı ER, mitokondri ve çekirdekte lokalize olan 465 amino asitlik E3 ubikuitin ligazdır. Parkin hedefi olan proteinlere ubikuitin ekleyerek onları parçalanmak üzere proteozoma gönderir (Belin and Westerlund, 2008; Farrer et al., 2001). Bazı tek nükleotid değişimleri, küçük ve büyük delesyonlar, intra-exonik delesyonlar, exon multiplikasyonları Parkin'in ligaz fonksiyonunun kaybına sebep olmaktadır. Parkin ile ilişkilendirilen PH'nın en karakteristik özelliği SNpc'da LC oluşumunun görülmemesidir, ancak bazı vakalarda LC gözlemlendiği de rapor edilmiştir (Farrer et al., 2001; Lucking et al., 2000).

### PARK3

PARK3 gen lokusunun PH ile ilişkisi tüm genom haritalama yaklaşımı kullanılarak ortaya çıkartılmıştır. PARK3 geni 2. kromozomun p13 kolunda bulunmaktadır. PARK3 ile ilişkilendirilen PH genellikle 61 yaş ve üzeri bireylerde görülmekte olup fizyopatolojik olarak SNpc'da LC varlığı ile karakterize edilmiştir (Gasser et al., 1998; Wszolek et al., 2001).

### PARK5

Kromozomun 4p14 bölgesinde bulunan Ubikuitin C-terminal Hidrolaz L1 (UCH-L1) geni otozomal dominant PH ile ilişkili bulunmuştur. İlk olarak Alman bir ailede UCH-L1 genindeki Ile93Met değişimi gösterilmiştir (Leroy et al., 1998). UCH-L1, beyinde fazla miktarda eksprese edilen nörona özgü hem ubikuitin hidrolaz hem de ubikuitin ligaz aktivitesine sahip bir enzimdir (Wilkinson et al., 1989). UCH-L1, monomer formda olduğunda  $\alpha$ -sinükleinin çoklu ubikuitinasyon zincirini hidroliz ederek onu proteozomal yıkıma göndermektedir. Dimer formda olduğunda ise  $\alpha$ -sinükleine K63 pozisyonundan ubikuitin ekleyerek proteini proteozomal yıkımdan kurtarmaktadır. UCH-L1'in Ile93Met varyantı enzimin hidroliz aktivitesini engelleyerek dimerizasyonu desteklerken, Ser18Tyr varyantı proteinin dimer oluşturmasını engelleyerek sporadik PH'ya karşı koruyucu etki göstermektedir (Liu et al., 2002; Maraganore et al., 2003).

### PARK6

Kromozomun 1p35-36 bölgesinde bulunan ARJP ya sebep olan PARK6 lokusu ilk olarak İtalyan ve İspanyol ailelerinde Gly309Asp ve Trp473OPA (o-Phthaldialdehyde) mutasyonları ile tanımlanmıştır. Bu lokus PTEN-induced kinase 1 geni (PINK1) serin-treonin kinaz olan bir tümör supresör proteinini kodlamaktadır. PINK1 mitokondriyal hedef motifi içermektedir. Mitokondriyal disfonksiyonlardan kaynaklı strese karşı mitokondrinin mitofajiye gitmesini sağlayarak nöron hücrelerini apoptoza karşı

korumaktadır (Valente et al., 2004). Hastalık fizyopatolojisinde LC oluşumu yoktur (Valente et al., 2001).

#### PARK7

Kromozomun 1p36 bölgesinde bulunan PARK7 lokusu ilk kez Alman bir ailede tanımlanmıştır. Daha sonra İtalyan ve Uruguay ailelerinde de görülmüş olup ARJP'ye sebep olmaktadır (van Duijn et al., 2001). PARK7 lokusunda bulunan DJ-1 geni Bonifati ve arkadaşları tarafından belirlenmiş olup bu gendeki delesyon ve nokta mutasyonlarının proteinde fonksiyon kaybına sebep olduğu gösterilmiştir (Bonifati et al., 2003). DJ-1 bir onkogendir ve kodladığı DJ-1 proteini nöronların sitoplâzmalarında ve oksidatif strese cevap olarak mitokondrileri ve nükleuslarında bulunmaktadır (Bandopadhyay et al., 2004). Bazı çalışmalar proteinin dimer formunda fonksiyonel olduğunu göstermiştir. *E. coli* şaperon proteini Hsp 31 ile yapısal benzerliğinden dolayı DJ-1 proteininin şaperon benzeri bir protein olduğu düşünülmektedir (Lee et al., 2003). Ayrıca DJ-1 oksidatif streste kriokoruyucu potansiyelinden dolayı redoks duyarlı bir proteindir (Kim et al., 2005).

#### PARK8

Kromozomun 12p11.21 bölgesinde bulunan PARK8 lokusu ilk olarak Japon bir ailede gösterilmiştir. PH'nın otozomal dominant kalıtım gösteren formudur (Funayama et al., 2002). Paisan-Ruiz ve arkadaşları tarafından 2004 yılında PARK8 lokusunda Dardarin olarak da adlandırılan lösün-rich repeat kinaz 2 (LRRK2) geni belirlenmiştir (Paisan-Ruiz et al., 2004). LRRK2 geni 51 ekzon içermektedir ve 250 kDa'luk çok büyük bir proteini kodlamaktadır. N-terminal ankyrin domain, lösün zengin tekrar, ROC (Ras in complex proteins) domain, COR (C-terminal of ROC) domain, MAPKKK (Mitogen activated protein kinase kinase kinase) domain ve WD 40 domain gibi birkaç fonksiyonel domaine sahiptir (West et al., 2005). Bu gendeki mutasyonlar hem ailesel hem de sporadik formdaki PH ile ilişkilendirilmiştir ve bu zamana kadar PH'nın en yaygın sebebidir. Gende 5 patojenik (Arg1441Cys/Gly/His, Tyr1699Cys, Gly2019Ser, Ile2020Thr ve Gly2385Arg) mutasyon belirlenmiştir. LRRK2'nin fizyolojik fonksiyonu halen tam olarak bilinmemesine rağmen protein-protein etkileşiminde, nörotlerin ve nöronal yaşamın düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir (Galter et al., 2006). Vaka çalışmaları gendeki mutasyonların klasik LC fizyopatolojisi oluşturduğunu göstermektedir (Gasser et al., 2011).

#### PARK9

Kromozomun 1p36 bölgesinde bulunan PARK9 lokusu ilk olarak Arap bir ailede tanımlanmıştır. ATPase tip 13A2 (*ATP13A2*) genini içermektedir ve bu gendeki homozigot

ve compound heterozigot mutasyonlar Klinikte Kufor-Rakeb (KRS) olarak da isimlendirilen otozomal resesif kalıtsal atipik Parkinson sendromuna sebep olmaktadır (Hampshire et al., 2001; Ramirez et al., 2006). ATP13A2 lizozomal bir membran proteindir fakat hastalık oluşumuna sebep olan patojenik mekanizması halen bilinmemektedir (Santoro et al., 2011).

#### PARK10

İzlandaya özgü 117 Parkinson hastasının geniş genom taramasında 51 ailede kromozomun 1p32 bölgesinde en az birden fazla etkilenmiş bireyde PH için şüpheli gen belirlenmiştir (Hicks et al., 2002). Bu bölgedeki hangi genin ne şekilde PH'ya sebep olduğu bilinmemektedir.

#### PARK11

İkizler ile yapılan çalışmalarda kromozomun 2q36-q37 bölgesinde PH ile ilişkili PARK11 lokusu bulunmuştur (Pankratz et al., 2003). Otozomal resesif kalıtım göstermektedir. PARK11 lokusunda bulunan GIGYF2 (GRB10 interacting GYF protein 2) geninin fonksiyonu tam olarak bilinmese de hastalık için aday genidir (Lautier et al., 2008).

#### PARK12

PARK12 PH'da X kromozomu ile ilk bağlantılandırılan lokustur ve Pankratz ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Pankratz et al., 2002). Şimdiye kadar etkilenmiş aile bireylerinde mutasyon taşıyan gen belirlenememiştir.

#### PARK13

PARK13 lokusu kromozomun 2p13 kolunda bulunmaktadır ve hastalık için HtrA serin peptidaz 2 (HTRA2) aday genidir. HTRA2 çekirdekte kodlanan bir proteindir ve mitokondride membranlar arası boşlukta lokalize olmaktadır. Apoptoz sırasında sitozole salınmaktadır. Alman kökenli idiopatik Parkinson hastalarında Ala141Ser ve Gly399Ser gen varyantları belirlenmiştir ve bu varyantların *in vitro* çalışmalarda mitokondriyal disfonksiyonu indüklediği ve defektif proteaz aktivasyonunun temelini oluşturduğu görülmüştür (Strauss et al., 2005).

#### PARK14

PARK14'e bağlı parkinsonizm PLA2G6 genindeki mutasyondan kaynaklanmaktadır ve bu gen kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 proteinini kodlamaktadır. Bu protein gliserofosfolipitlerin serbest yağ asidi olan araşidonik aside hidrolizini katalizlemektedir (Paisan-Ruiz et al., 2009; Yoshino et al., 2010). PLA2G6 genindeki



Arg741Gln, Arg747Trp ve Arg632Trp mutasyonları hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Sina et al., 2009).

#### PARK15

PARK15 bölgesinde bulunan FBXO7 geni otozomal resesif erken başlayan Parkinson sendromu ile ilişkilidir. FBOX7 F-box ailesine ait bir proteini kodlamaktadır ama patolojisi halen bilinmemektedir (Di Fonzo et al., 2009).

#### PARK16

Kormozomun 1q32 kolunda bulunan PARK16 lokusu üzerinde şu ana kadar herhangi bir gen tanımlanmamıştır (Satake et al., 2009).

#### PARK17

Erken başlayan otozomal dominant PH ile ilişkili PARK17 lokusu, kromozomun 4p16 bölgesinde bulunmaktadır. Bu lokusta vacuolar protein sorting-associated protein 35 (VPS35) geni bulunmuştur. VPS35 geninde Asp620Asn mutasyonunu tanımlanmıştır ve bu mutasyonun hastalık ile ilişkisi çalışılmaktadır (Vilarino-Guell et al., 2011; Zimprich et al., 2011).

### **2.2.3. Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu**

Mitokondri memeli hücrelerinde ETZ komplekslerinin (Kompleks I, II, III, IV ve V) bulunduğu ve ATP sentezinin yapıldığı organeldir. Mitokondri yapısını oluşturan proteinlerdeki mutasyonlar ve ya anormal ekspresyonlar kalıtsal ve yaş bağımlı nörodejeneratif hastalıklara sebep olmaktadır. Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkta oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu nöropatolojinin gelişmesine zemin hazırlamaktadır (Bueler, 2010). Mitokondriyal ETZ kompleks I inhibitörleri olan MPTP, paraquat ve rotenone pestisitlerine maruz kalmak davranışsal PH semptomlarının görülmesine sebep olmaktadır. Parkinson hastalarındaki kompleks I defektler yalnızca substantia nigradaki nöronal mitokondrilerde değil kas, platelet, striatum, lenfosit, kortikal beyin dokusu ve fibroblast mitokondrilerinde de görülmektedir (Bindoff et al., 1991; Haas et al., 1995; Mizuno et al., 1989; Mytilineou et al., 1994; Parker et al., 2008). Kompleks I defektleri ATP üretimini azaltmaktadır ve bu reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin artmasından dolayı hasara sebep olmaktadır. Bazen elektronlar ETZ'de kompleks III'den sitokrom c ve kompleks IV'e atlayacakları yerde moleküler oksijene atlayarak hücrede yüksek reaktif ROS oluştururlar. ROS süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri, alkolsil radikalleri, hidrojen peroksit, ozon,

hipoklorik asit gibi yüksek reaktivitedeki moleküler oksidantları içerebilmektedir. Bu reaktifler glutathione (GSH) ve glutathione peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimler aracılığı ile anti-oksidadif sistemler kullanılarak inaktif hale getirilmektedirler. ROS oluşumu ve anti-oksidadif sistemler ile bunların yok edilmesi belirli bir denge içerisinde. Bu dengenin bozulması hücreyi ölüme götürebilmektedir (Finkel and Holbrook, 2000). Parkinson hastalarının post mortem beyin dokularındaki SN bölgeleri incelendiğinde oksitlenmiş lipid, protein ve DNA miktarının arttığı, anti-oksidadif GSH miktarının azaldığı, ROS'un ise arttığı görülmüştür (Jenner, 2003). Oluşan bu oksidadif stres dopaminerjik nöronlarda hücre ölümüne sebep olmaktadır. Dopaminerjik nöronlarda oksidadif stresin artmasına sebep olan bir diğer sebep DA metabolizmasıdır. Monoamin oksidaz B (MAO-B) ve katekol-O-metil-transferaz (COMT) ile DA oksidasyonundan hidrojen peroksit ve 3,4-dihidroksifenilasetik asit (DOPAC) oluşur. Bunun aksine DA oto-oksidadyonu ile süper oksit ve reaktif quinonlar oluşur. Süper oksit, süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit çevrilirken aynı zamanda nitrik oksit radikalleri ile de reaksiyona girerek peroksinitrili oluşturabilir. Dopaminerjik nöronlarda bol miktarda bulunan geçiş metalleri (özellikle demir) hidrojen peroksit ile reaksiyon vererek hidroksil radikali oluşumuna sebep olur. Oluşan hidroksil radikali nöronlara hasar verir. Quinonlar ise proteinlerin sistein dizileri ile ilişkiye girerek proteine zarar vermektedir. DA quinonları; oksidadif stres, mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon ve proteozom bozulmasıyla ilişkilidir (Miyazaki and Asanuma, 2008).

Ailesel formdaki PH ile ilişkili genlerdeki (PINK1, DJ1, Parkin,  $\alpha$ -synuklein, LRRK2) mutasyonlar doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondri fonksiyonunu ve dinamiğini, hücre ölümünü ve dopaminerjik nöron dejenerasyonunu etkilemektedir (Zhu and Chu, 2010). Örneğin PINK1 bir serine/treonin kinazdır ve N-ucundaki dizi sayesinde mitokondriye lokalize olmaktadır. Parkin ise E3 ubiquitin ligaz olup nöron koruyucu rolü bulunmaktadır. PINK1 ve Parkin birlikte mitokondri membran potansiyeli, kalsiyum dengesi, krista yapısı, solunum aktivitesi ve mitokondriyal DNA (mtDNA) bütünlüğünü korumakta ve aksonlarda mitokondrinin taşınımını düzenlemektedirler (Bueler, 2010). PINK1'in kinaz aktivitesinden dolayı mitokondride oksidadif strese karşı koruyucu rolü bulunmaktadır. Mitokondri hedef dizisi içermesine rağmen sitoplazmada da varlığı gösterilmiştir. PINK1 mitokondrinin dış zarında bulunmasına rağmen PINK1'e ait kinaz domainin bir kısmı sitozolde de olmaktadır (Zhou et al., 2008).

Parkinin mitokondri morfolojisini etkilediğine dair çalışma ilk olarak Greene ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Parkin geni susturulmuş *Drosophilalarda* yarı şeffaf

kanatlar, kısa hayat süresi, dopaminergic nöronların kaybı, oksidatif strese hassasiyetin artması ve kısır erkek fenotipleri ortaya çıkmıştır. En ilginç olanı ise kanat kaslarında şişmiş mitokondri morfolojisinin görülmesidir. Yapılan çalışmalarda kanat kaslarının apoptoza gittiği açıkça gösterilmiştir (Greene et al., 2003). Parkinson hastalarının çeşitli dokularında mitokondri morfolojisi incelenmiş mitokondri sayısı, dağılımı, kümelenmeleri ve membran düzensizliği belirlenmiştir (Deng et al., 2008). PH'lardan alınan beyin dokusu biyopsilerinde sinirlerinde mitokondriyal boyut farklılıkları gözlemlenmiştir (Poole et al., 2010). Juvenil Parkinson hastalarının SNc'da mitokondriyal küçük kümecikler oluşturduğu rapor edilmiştir (Hayashida et al., 1993). Nörotoksin modellerinde mitokondri şişmesi ve kristalin dağılımı genellikle ilk değişimlerdir (Forno and Norville, 1976; Hayashida et al., 1993). SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde overekspres parkin mitokondriyal DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu arttırmakta, mtDNA onarımını uyararak oksidatif hasarlara karşı hücreleri korumaktadır. Parkin hasarlı ve mutant mtDNA'nın onarımında, replikasyonunda ve transkripsiyonunda ve mitokondriyal biyogenezinde görev almaktadır (Rothfuss et al., 2009).

### **2.2.3.1. Mitofaji ve Parkinson Hastalığı**

Parkinson hastalarında hasarlı mitokondrinin ortadan kaldırılması olarak bilinen mitofaji artmaktadır. Parkin'in mitofaji üzerine etkisi ilk kez Narendra ve arkadaşları tarafından HEK293 ve HeLa hücrelerinde Parkin'in bilinmeyen bir mekanizma ile depolarize mitokondriye doğru seçici olarak toplanması ve mitokondrinin ortadan kaybolduğunun gösterilmesiyle bulunmuştur (Narendra et al., 2008). Parkin'in depolarize mitokondriyi mitofajiye teşvik etmesinin nedeni hücreyi apoptozdan kurtarmak da olarak düşünülmektedir. Bu konuda ileri sürülen moleküler etkileşim mekanizması Parkin'in mitokondriye çekilmesinde PINK1'in rolüne işaret etmektedir. Normalde tüm dizi sentezlenen PINK1 mitokondri iç zarına yerleşir. PINK1'in putatif transmembran domainini mitokondri iç zarında lokalize olan PARL keserek 52 kDa formundaki PINK1'i oluşturur (Deas et al., 2011). Oluşan yeni formdaki PINK1 ise mitokondriden sitoplazmaya geri gönderilir. Herhangi bir hasar sonucu mitokondri membranının depolarize olması durumunda ise PINK1'in PARL tarafından kesilmesi engellenmektedir. Tüm uzunluktaki PINK1 mitokondri dış zarında birikmekte ve Parkin'in bu bölgeye doğru çekilmesine aracılık etmektedir. PINK1'in sağlıklı mitokondride birikimi proteolitik mekanizmalarla engellenmektedir (Meissner et al., 2011). PINK1 mitokondri dış zarını kinaz domaininden

bir kısmı sitozolde olacak şekilde sarmaktadır. Bu domainin fiziksel temasta olduğu Parkin'i fosforile ettiği düşünülmektedir (Jin et al., 2010; Meissner et al., 2011).

PINK1 ve Parkin'in mitofajiyi nasıl başlattığına dair farklı mekanizmalar ortaya atılmıştır. Geiseler ve arkadaşlarına göre Parkin aracılığı ile mitofaji Parkin'in Lys 27 ve Lys 63 poliubukuitinasyon aktivitesine bağlıdır. Parkin voltage-dependent anion channel 1'i (VDAC1) Lys 27'den poliubikuitine eder böylelikle p62/SQSTM1 denen ubikuitin ve otofaji arasındaki adaptör proteini bölgeye yönlendirerek hasarlı mitokondrinin mitofajiye gitmesinde rol oynar (Geisler et al., 2010). Ziviani ve arkadaşlarına göre ise Drosophilada mitofaji Parkin'in PINK1 tarafından mitokondriye çekilmesi ve Mitofusin (Mfn) proteininin ubikuitinlenmesi ile teşvik edilmektedir (Ziviani et al., 2010). Sha ve arkadaşları ise *in vitro* kinaz assayinde yabani tip (YT) PINK1'in YT Parkin'i fosforile ettiğini göstermişlerdir. SH-SY5Y hücrelerinde overeksprese Parkin'in fosforilasyonunun WT PINK1 overekspresyonu ile arttığı *PINK1* geni susturulması ile azaldığı da gösterilmiştir (Sha et al., 2010). Kim ve arkadaşları ise BE(2)C insan nöroblastoma hücrelerinde Parkin'in yüksek oranda korunmuş Thr 175'in spesifik olarak PINK1 tarafından fosforile edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu fosforilasyonun Drosophilada Parkin'in mitokondriyal translokasyonu için kilit rol oynadığı da gösterilmiştir (Kim et al., 2008).

### **2.2.3.2. Mitokondri Dinamiğini Etkileyen PH İle İlişkili Diğer Genler**

Her ne kadar Parkin ve PINK1'in mitokondriyal dinamik üzerine etkisi detaylı olarak çalışılmış olsa da PH ile ilişkili diğer genlerin de mitokondri homeostazı ile ilişkisi olduğu bilinmektedir (Çizelge 2.4.)

### **2.2.4. Post-Translasyonel Modifikasyonlar ve Ubikuitin Proteozom Sistem (UPS) Bozukluğu**

Proteomun karmaşıklığı ve çeşitliliği geri dönüşümlü olarak kovalent translasyon sonrası modifikasyon (PTM) ile artmaktadır. PTM'ler farklı formlarda olabilir. PTM proteinlerin konformasyonunu, aktivitesini ve etkileştiği diğer protein partnerlerini değiştirmektedir. Hücre içsel ve dışsal faktörlere karşı protein ekspresyon seviyesini düzenlemek yerine bazı proteinlerini PTM ile modifiye ederek cevap verir. Fosforilasyon en yaygın görülen geri dönüşümlü PTM'dir (Johnson and Barford, 1993). Ökaryotlarda proteinler serin, treonin ve tirozin amino asitlerinden, prokaryotlarda ise histidin, arjinin ve lizin amino asitlerinden fosforile olmaktadır (Dissmeyer, 2011). 520'den fazla kinaz ve 120'den fazla fosfotaz bulunan ökaryotik hücrelerde fosforilasyon ve defosforilasyon insan

proteomunun dinamik yapısını anlama adına önemlidir (Manning et al., 2002).

PTM'ler yalnız fosforilasyon, sülfirilasyon, asetilasyon ve metilasyon gibi küçük kimyasal grupların eklenmesiyle gerçekleşmez aynı zamanda ubikuitin (Ub) eklenmesi ile de olmaktadır. Ubikuitin ilk olarak 1975 yılında tanımlanmıştır (Glickman and Ciechanover, 2002). Ubikuitin primer yapısı yüksek oranda korunmuş 76 amino asitten oluşan 8433 daltonluk küçük bir proteindir. Yüksek sıcaklığa dayanıklı globular olan bu protein nötral pH'da yüksek oranda çözülmüş ve katlanmış olup yapısı kararlıdır. Tüm ökaryotlarda bulunmaktadır ve hücre içi proteolizde yıkım belirteci olarak görev yapmaktadır (Tanaka et al., 2004).

Ubikuitinasyon en yaygın PTM'lerden biridir ve proteinin stabilitesini, lokalizasyonunu, aktivitesini ve yarı ömrünü düzenlemektedir (Shi et al., 2011). Ökaryotlarda hücrel proteinler lizozomlarda ATP gereksinimi olmadan ortadan kaldırılırken, sitozolde ATP bağımlı Ub aracılı sistem ile yıkılmaktadır. Yanlış katlanmış ve kısa ömürlü hücre içi proteinlerin Ub aracılığı ile yıkımı ubikuitin proteozom sistemi (UPS) ile gerçekleşmektedir (Güney, 2002).

UPS hücre döngüsü progresyonu, DNA onarımı, sinyal iletimi, transkripsiyonun düzenlenmesi, immün yanıt, hücre ölümü (apoptozis), hücrel strese cevapta ve protein homeostazı gibi önemli biyolojik süreçlerde görev almaktadır (Güney, 2002; Tanaka et al., 2004). UPS, PH gibi nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi ile de ilişkilidir. UPS ile yanlış katlanmış ve çökelti oluşturacak proteinlerin yıkımı yapılmakta böylece nöron hücrelerinde toksin birikimi engellenmektedir (Chan et al., 2011).

Ubikuitinasyon, ubikuitinin proteine enzimatik reaksiyonlar sonucu kovalent bağlanması ile gerçekleşir. Ubikuitinasyonun biyokimyasal mekanizması kısaca şu şekilde özetlenebilir. (1) Ubikuitin aktive edici enzim olan E1 sistein amino asidi ile ubikuitinin karboksil ucundaki glisin 76 arasında yüksek enerjili tioester bağı oluşturulur. (2) Aktive olan ubikuitin, ubikuitin konjige edici enzim olan E2'nin sistein amino asidine transfer edilir. (3) E3 ubikuitin ligaz enzimi aracılığı ile ubikuitin karboksil ucundaki glisin dizisinden, ekleneceği substratın amino ucundaki lizine kovalent olarak bağlanır (Şekil 2.3.). Substratlar tek ve ya çoklu Ub bağlanması ile modifiye edilmektedir. Çoklu poliubikuitin zinciri bu reaksiyonun tekrarı ile gerçekleşmektedir (Shi et al., 2011; Tanaka et al., 2004).

**Çizelge 2.4.** Parkinson Hastalığı ile ilişkili mitokondri dinamiğini etkileyen genler ve mitokondri fonksiyonu üzerine etkisi

<b>PH ile ilişkili genler</b>	<b>Mitokondri fonksiyonu üzerine etkisi</b>	<b>Referans</b>
$\alpha$ -Synuclein (PARK1/4)	Overekspresyonu sonucu Mitokondriyal fragmentasyon Kompleks I bozulması Mitofajinin artması	(Chinta, et al., 2010)
Parkin (PARK2)	Mitofajiye aracılık etmektedir Mitokondriyal füzyon/fisyon (ayrılma) hataları Azalmış Kompleks I ve IV aktivitesi ATP seviyesinin azalımı Azalmış antioksidant kapasitesi	(Deng et al., 2008; Narendra et al., 2008)
PINK1 (PARK6)	Mitokondriyal füzyon/fisyon hataları ATP seviyesinin azalımı Mitokondriyal DNA içeriğinin azalması Oksidatif strese hassasiyetin artması	(Deng et al., 2008; Lutz et al., 2009)
DJ-1 (PAK7)	Mitokondriyal fragmentasyon Membran potansiyelini azalması Kompleks I bozulmasından dolayı solunum oranının azalması Mitokondriyal ROS üretiminin artması	(Irrcher et al., 2010; Thomas et al., 2011)
LRRK2 (PARK8)	Bilinmemekle birlikte mitokondriyal disfonksiyonuna karşı korumakta	(Saha et al., 2009)
HtrA2/Omi (PARK13)	Mitokondriyal ROS üretiminin artması Membran potansiyelini azalması Mitokondriyal füzyonun Opa1 ilişkisi ile artması	(Kieper et al., 2010)

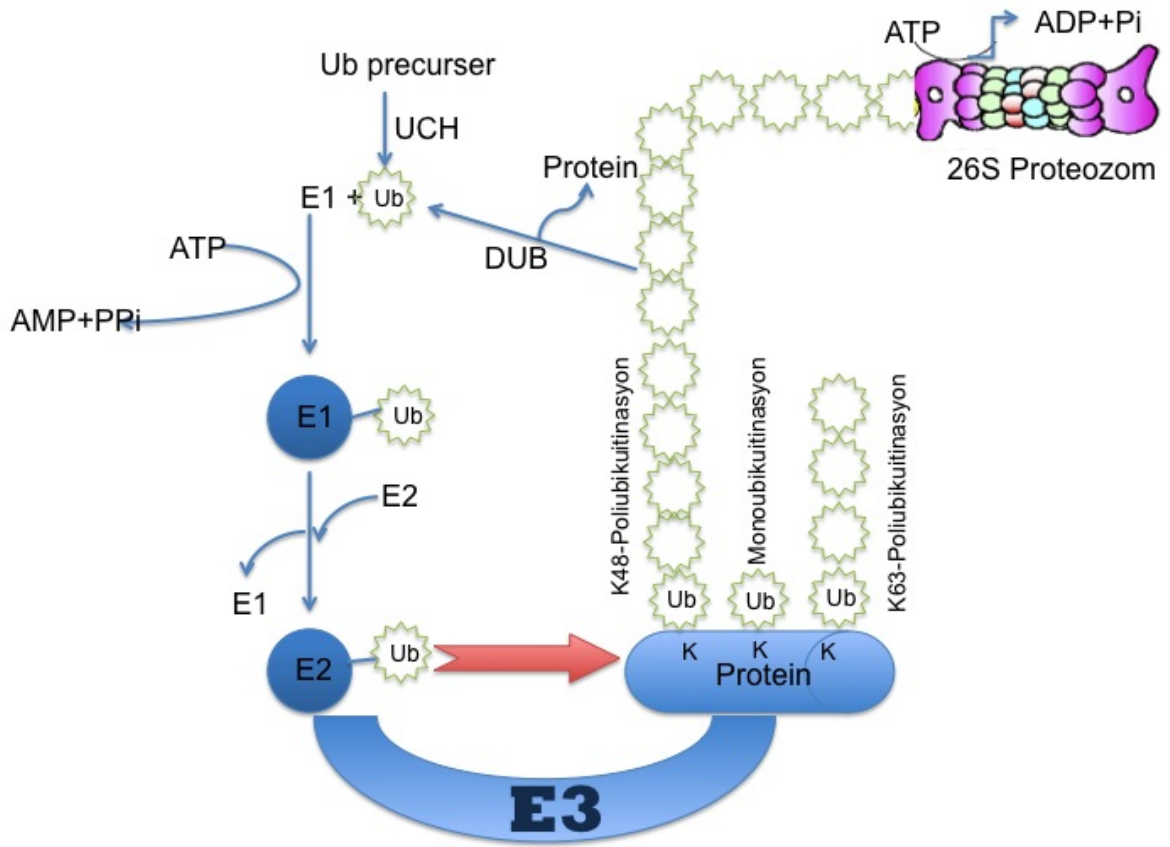
Poliubikuitin zinciri yeni eklenecek ubikuitinin karboksil ucunun bir önceki ubikuitinin lizin dizisine bağlanması ile gerçekleşir. Bir ubikuitin molekülünde 7 tane lizin bulunmaktadır ve her biri poliubikuitinasyon için konjugasyon bölgesi olarak görev alabilmektedir (Peng et al., 2003). Ubikuitinasyon K11 ve K48 amino asitleri üzerinden olursa proteinler poliubikuitinasyona uğrayarak 26S proteozom üzerinden parçalanırlar. Eğer ubikuitinasyon K48 amino asiti üzerinden gerçekleşirse protein monoubikuitinasyona uğrar ve degrade olmak yerine hücrede başka roller üstlenir. Bu roller arasında hücre sinyal metabolizmasında ve DNA onarımında oynanan roller en belirgin olanlarıdır (Hoegge et al., 2002; Krappmann and Scheidereit, 2005). İnsan proteomunda 500'den fazla E3 protein ligaz bulunmaktadır. E3 protein ligaz bolluğu hücrede protein yıkımında spesifisitenin bu proteinlerce sağlandığını göstermektedir.

### **2.3. Parkin İlişkili Parkinson Hastalığı**

Otozomal resesif ve erken başlayan formdaki PH'nın en yaygın sebebi *park2* genindeki mutasyonlardır. Vakaların çoğunluğu homozigot mutasyonlardan, bir kısmı monoalelik mutasyonlardan çok az bir kısmı ise compound heterozigot mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Hedrich et al., 2004; Klein et al., 2007).

Parkin mutasyonu taşıyan bireylerde diğer Parkinson tiplerinden farklı olarak hastalığın erken evresinde distoni ve hiperfleksi gözükmemektedir (Lucking et al., 2000). Diğer erken başlangıçlı PH ile karşılaştırıldığında hastalığın ilerleyişi daha yavaştır (Lucking et al., 2000). Klinik semptomlar genellikle sporadik PH semptomlarından ayırt edilemez ve Levo-dopaya yanıt diğer PH tiplerinde olduğu gibidir. Şimdiye kadar birkaç Parkin bağımlı PH vakasının nöropatolojisi incelenmiş, *park2* genindeki homozigot delesyon ve SN ve coeruleus'daki dopaminerjik nöron kaybı gösterilmiştir (Hayashi et al., 2000; Ishikawa and Takahashi, 1998; Matsumine et al., 1998; Mori et al., 1998).

Öncül çalışmalarda Parkin mutasyonu olan hastalarda LC oluşumu gösterilememişken daha sonraki çalışmalarda Parkin bağımlı LC oluşumu literatürde rapor edilmiştir (Mori et al., 1998). Gelecek çalışmalarda otopsi sayısının artması hastalığın nöropatolojisi hakkında daha kesin sonuçlar almamızı sağlayacaktır.



Şekil 2.3. Ubikuitin proteozom sistemi



### 2.3.1. *Park2* Geni

İnsan genomunda 6q25.2-q27 kromozomal bölgesinde bulunan ve Parkin proteinini kodlayan *park2* geni (GenBank erişim numarası: EF375726.1) şimdiye kadar belirlenmiş en büyük 2. gendir. Gen 12 ekzona sahiptir ve büyüklüğü 1.4 Mbç'dir. İzole edilmiş cDNA klonu üzerinde bulunan *park2*'ye ait okuma çerçevesi 1395 bç bir DNA parçasıdır (Kitada et al., 1998; Matsumine et al., 1997). Parkin katalitik aktivitesini azaltan ya da yok eden değişimler; tek baz değişimleri, splice bölge mutasyonları, nokta mutasyonları, küçük-büyük delesyonlar ve ekzon delesyonu ile tranke protein oluşumudur. Otozomal resesif erken başlangıçlı Parkinson hastalarının % 50'sinde Parkin mutasyonu belirlenmiştir (Lucking et al., 2000). Parkin geninde şimdiye kadar 214 mutasyon tanımlanmıştır ve bunların 128'i patojenik olarak sınıflandırılmıştır. (<http://www.molgen.vib-ua.be/PDmutDB>).

Parkin yalnızca insan, sıçan ve fare gibi omurgalılarda değil *C.elegans* ve *D. melanogaster* gibi omurgasızlarda da bulunmakta olup evrimsel süreçte ileri derecede korunmuştur (Haywood and Staveley, 2004).

Farklı dokularda farklı miktarda ifade edilen Parkin özellikle beyin, kalp, testis ve iskelet kaslarında yüksek oranda ifade edilmektedir. *Park2* gen ifadesi beyin dokusunda SN dahil olmak üzere farklı bölgelerde de olmaktadır. (Kitada et al., 1998).

### 2.3.2. Parkin Proteini

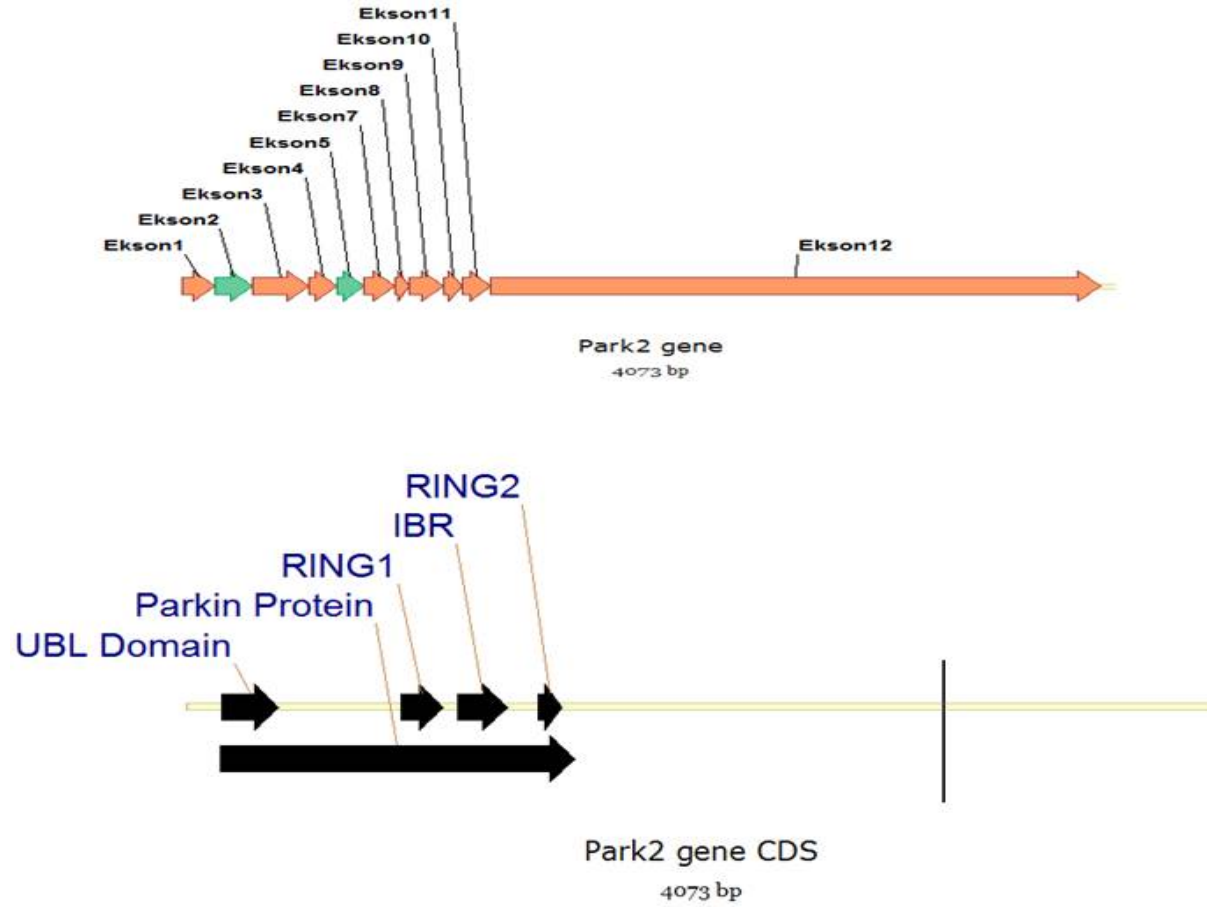
E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip olan Parkin proteini (Swiss-Prot erişim numarası: O60260) 456 aminoasitten oluşmaktadır ve 52 kDa büyüklüğündedir (Şekil 2.4.). Proteinin fonksiyonel olarak amino ucunda ubiquitin-like domain (UBL), sistince zengin unique parkin domain (UPD ya da RING0), karboksi ucunda ise iki adet really interesting new gene (RING1 ve RING2) domain, arasında in-between RING (IBR) domain bulunmaktadır (Hristova et al., 2009; Shimura et al., 2000). Amino ucunda bulunan UBL (1-76 amino asit arası) ubiquitin ile amino asit seviyesinde % 62 oranında benzerlik göstermektedir (Kitada et al., 1998) ve Parkin ekspresyonun kontrolünde (Finney et al., 2003), substrat tanıma (Shimura et al., 2000) ve 26S proteazom alt ünitesi olan Rpn10 ile etkileşim açısından önemlidir (Sakata et al., 2003). UBL ve RING0 domainleri Parkin aktivitesi için değil aktivitenin düzenlenmesi için gereklidir. RING-IBR-RING domainine TRIAD ve ya DRILL domaini de denilmektedir. Bu domain E2 ve substratlara bağlanır. Bu bölge proteinin RING-finger tip E3 ligaz ailesine üye olmasını sağlamaktadır.

RING domainindeki çinko, sistein ve histidin dizilerini bağlar. Klasik DNA'ya bağlanan çinko parmak motifinin aksine RING domainleri protein-protein ilişkileri için yüzey hazırlamaktadırlar. RING domainleri ökaryotlarda oldukça yaygındır ve hücre kökeni belirlenmesinde kullanılırlar (Tanaka et al., 2004). Ayrıca onkogenез ve embriyogenез gibi birçok farklı metabolik olayda da rol aldıkları bilinmektedir (van der Reijden et al., 1999). Parkin'in E3 ligaz aktivitesi RING2 domaininden gelmektedir (Matsuda et al., 2006).

Parkin hasarlı ve ya yanlış katlanmış proteinlerin proteozomal degradasyonu için ubiquitin eklenmesini sağlar (Shimura et al., 2000). Böylece proteozom bağımlı proteoliz olur. Parkin proteinin proteozomal yoldaki rolüne ek olarak nöron koruyucu görevide vardır. Böylelikle dopaminerjik dejenerasyona karşı hücreyi korumaktadır (Klein et al., 2006; Petrucelli et al., 2002). Parkin'in bir diğer fonksiyonu ise mitokondri fonksiyonunu düzenlemektedir. Parkin mtDNA'sına bağlanarak mitokondriyal transkripsiyonu ve replikasyonu arttırmaktadır (Kuroda et al., 2006; Rothfuss et al., 2009). Ayrıca Parkin'in zar proteinlerinin endositozunda, protein seçim ve trafiğinde (Fallon et al., 2006) DNA tamirinde (Kao, 2009b), transkripsiyonel regülasyonda (Okui et al., 2005), kanserleşmede (Devine et al., 2011) potansiyel etkisinin olduğu bilinmektedir ve bu etkilerin nasıl gerçekleştiğine dair olan hücresel mekanizmalar araştırılmaya devam etmektedir (Abbas et al., 1999). Parkin ligaz fonksiyonundan bağımsız olarak, gen transkripsiyonunda p53 gibi repressor görevi de görmektedir (da Costa et al., 2009).

Hücre içerisinde genel olarak sitoplazmada (Shimura et al., 1999) lokalize olan Parkin trans-golgede (Kubo et al., 2001), aktin ve tubulin filamentlerinde (Huynh et al., sinaptik veziküllerde (Fallon et al., 2002; Huynh et al., 2003; Ren et al., 2003) ve endoplazmik retikulumda (ER) (Kasap ve ark., 2009) bulunmaktadır.

Parkin aktivitesi, kendi kendini inhibisyon (oto-inhibisyon) ve eksternal interaksyonlar ile düzenlenmektedir. Parkin *in vitro* ve hücre kültürü çalışmalarında oto-ubikuitin aktivitesi göstermektedir (Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). Yabani tip Parkin'in oto-inhibisyonu iki şekilde olmaktadır. (1) Amino ucundaki UBL domaininin proteinden tamamen kesilerek uzaklaştırılması ile (2) UBL domaininin karboksi ucundaki RING domainden konformasyonel olarak uzaklaştırılması ile (Chaugule et al., 2011). Parkin'in etkileşimde olduğu birçok eksternal interaksyon partnerları bulunmaktadır ve bunlar proteinin aktivitesini etkileyebilmektedirler. Örneğin kinaz aktivitesine sahip olan PINK1'in Parkin'i fosforile ederek mitokondriyal dinamiği düzenlemesi gibi (Sha et al., 2010).



**Şekil 2.4.** *Park2* geninin genom ve transkriptomda ifadesi ve Parkin proteininin fonksiyonel domainlerinin gösterimi (UBL: ubiquitin-like; IBR: in-between-ring) Vector NTI programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Şimdiye kadar Parkin'in farklı protein komplekslerine katıldığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Xiong ve arkadaşları katlanmamış proteinlerin degradasyonunu indüklemek için Parkin'in PINK1 ve DJ-1 ile kompleks oluşturduğunu söylemişlerse de bu etkileşim tam olarak kanıtlanamamıştır (Xiong et al., 2009). Staropoli ve arkadaşları ise siklinE'nin ubikuitilenmesi ve proteozomal degradasyonu için Parkin'in Skp1-Cullin-Fbox (SCF)-like kompleksin bir üyesi olduğunu söylemişlerdir (Staropoli et al., 2003). Parkinin oluşturduğu bir diğer potansiyel kompleks ise PaelR'nin tekrar katlanma veya degradasyonu için şaperon Hsp70 ve U-box protein CHIP ile yaptığı komplekstir (Imai et al., 2002).

Parkin'in E3 ubikuitin ligaz aktivitesi negatif ve ya pozitif olarak farklı regülatör proteinler ile düzenlenmektedir. 14-3-3η ve BAG5 proteinlerinin Parkin'in oto-inhibisyon konformasyonunu sabitleyerek ve ya E2 ve olası substratların bağlanma bölgelerini bloklayarak negatif regülatör olarak etki ettikleri gösterilmiştir (Kalia et al., 2004; Sato et al., 2006). Küçük ubikuitin benzeri protein olan SUMO-1 ise Parkin'inin nükleusa lokalizasyonunu ve oto-ubikuitinlenmesini arttırarak proteinin fonksiyonunu pozitif olarak düzenlemektedir (Um and Chung, 2006). Ayrıca Eps15 ve Endophilin-1A gibi UBL domaini ile etkileşen proteinler de oto-inhibisyonu engelleyerek Parkin'in kendi kendine ubikuitinlenmesine olanak sağlamaktadırlar (Fallon et al., 2006; Trempe et al., 2009).

Fosforilasyon, S-nitrolizasyon, oksidasyon ve ubikuitinasyon Parkin PTM'leridir ve bunlar proteininin fonksiyonunu etkilemektedirler. Parkin; kazein kinaz-1, protein kinaz A, protein kinaz C, siklin-bağımlı kinaz 5 (cdk5), c-Abl ve PINK1 tarafından fosforillenmektedir (Imam et al., 2011; Y. Kim et al., 2008; Ko et al., 2010). İlginçtir ki, Parkin'in PINK1 ile fosforillenmesi hariç diğer proteinler ile fosforilasyonu proteinin aktivitesini engellemektedir (Trempe et al., 2009).

Parkin sistein amino asidi açısından oldukça zengindir ve bu amino asit nitrilizasyon için uygun bir amino asittir. Yapılan çalışmalar S-nitrolizasyonun Parkin'in fonksiyonunun kaybolmasına sebep olduğunu göstermiştir (Chung et al., 2004; Yao et al., 2004). Aynı şekilde Parkin oksidasyonu proteinin çözünürlüğüne, agregasyon ve degradasyon özelliğinin değişimine dolayısı ile proteinin fonksiyonunun bozulmasına sebep olmaktadır (Winklhofer et al., 2003). Parkin'in oto-ubikuitinlenmesi normal şartlarda hücrede gerçekleşen bir olaydır fakat yüksek oranda ubikuitinlendiği zaman proteozom bağımlı şekilde degrade edilmektedir (Chaugule et al., 2011; Meng et al., 2011).

**Çizelge 2.5.** Parkin ile etkileşime girerek aktivitesine negatif ve ya pozitif etki eden regülator proteinler

<b>Proteinler</b>	<b>Etkilediği Yolakla</b>	<b>Referans</b>
14-3-3 $\eta$	Signal regulation (Negatif etki)	(Sato et al., 2006)
BAG5	Co-chaperone (Negatif etki)	(Kalia et al., 2004)
CHIP	Şaperon	(Imai et al., 2002)
LRRK2	Kinaz	(West et al., 2005)
DJ-1 mutantları	Redox protein?	(Xiong et al., 2009)
PINK1	Mitokonriyal kinase	(Moore et al., 2005)
SUMO	(Pozitif etki)	(Um and Chung, 2006)
Eps15	(Pozitif etki)	(Fallon et al., 2006)
Endophilin-1A	(Pozitif etki)	(Trempe et al., 2009)

BAG5: Bcl-2 associated anthanogene 5, CHIP: Carboxyl terminus of the Hsc70 interacting potein, LRRK2: Leucin rich repeat kinase 2, PINK1: PTEN-induced kinase1, SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier, Eps15: Epidermal growth factor receptor substrate 15.

### 2.3.3. Parkin İlişkili Proteinler

Parkin'in gerçek substratlarını belirlemek onun fonksiyonunu ve hastalık oluşumundaki etkisini anlamak adına çok önemlidir. Parkin'in etkileştiği birden fazla substrat vardır. İlk olarak Zhang ve arkadaşları tarafından belirlenen substrat septin olarak da adlandırılan ve çoğunlukla sinir sisteminde ifade edilen ve sinaptik veziküllerde görev alan CDCrel-1 dir (Zhang et al., 2000). CDCrel-1 in adenovirus yardımıyla yapılan viral transdüksiyon sonucu nörodejenerasyonu indüklediği bulunmuştur (Dong et al., 2003).

Parkin birden fazla E2 ubikuitin konjuge edici enzim ile ilişki halindedir. İnsanda bulunan UbcH7, UbcH8 ve UbcH13/Uev1 E2 enzimlerine ek olarak ER'da bulunan Ubc6 ve Ubc7 ile de etkileşimi vardır (Çizelge 2.6.) (Doss-Pepe et al.,2005; Imai et al., 2001; Matsuda et al., 2006; Zhang et al., 2000). Etkileştiği E2 önderliğinde substratlara ubikuitin ekleyerek farklı hücresel fonksiyonları yürütmektedir. E2/E3 kompleksi substratı K48'den polyubikuitine ederek proteozomal degradasyona yollamaktadır.

Parkin 26S proteozom alt ünitesi olan Rpn10 ile de UBL domaini vasıtasıyla etkileşim halindedir. Bunlara ek olarak Parkin'in etkileştiği çok çeşitli olası substratlar mevcuttur. Bunlar cell division control-related protein (CDC-rel-1 ve CDC-rel2a), O-glikolizlenmiş  $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ Sp22),  $\alpha$ -sinüklein interaksiyon protein (synphillin-1), synaptotagmin XI, dopamine transporter (DAT); hücre döngüsünü kontrol eden proteinler siklin E, amino acyl tRNA subunit p38/JTV-1,  $\alpha/\beta$  tubilin gibi hücre iskeleti proteinleri, RanBP2 gibi nüklear eksport proteinleri, Eps-15 ve parkin associated endothelin-like receptor (Pael-R) gibi sinyal transdüksiyon proteinleri, EGF reseptör proteinleridir (Çizelge 2.7.). Parkin'in fonksiyonunun bozukluğu depolarize ve fragmente mitokondri ile ilişkilendirilmiştir. İki farklı çalışma grubu mitokondriyal füzyon için gerekli olan Mitofusin 1 ve 2'yi Parkin'in olası substratı olarak belirlemişlerdir (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010). Olası Parkin substratları ve içinde oldukları yollar Çizelge 2.7.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Parkin'in etkileştiği E2 konjuge edici enzimler ve çalışılan model organizmalar

<b>E2</b>	<b>Model Organizma</b>	<b>Referans</b>
UbcH7 ve UbcH8  UbcH7	Hücre kültürü İnsan beyni	(Shimura et al., 2000; Shimura et al., 2001; Zhang et al., 2000)
UbcH6, UbcH7	Hücre kültürü	(Imai et al., 2001)
UbcH13/Uev1  E2	<i>In vitro</i>	(Doss-Pepe et al., 2005; Matsuda et al., 2006)

Ubc: ubiquitin conjugating enzyme E2, Uev1a: Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1a.

**Çizelge 2.7.** Olası Parkin substratları ve görevleri

<b>Substrat</b>	<b>Biyolojik yolak</b>	<b>Referans</b>
SEPT5 (CdCrel-1)	Sinaptik fonksiyon	(Zhang et al., 2000)
Synphilin-1	Nörodejenerasyon (?)	(Chung et al., 2001)
$\alpha$ SP22	?	(Shimura et al., 2001)
SEPT4 (CDCrel-2)	Sinaptik fonksiyon	(P. Choi et al., 2003)
Pael-R	Hücre sel sinyal transdüksiyonu	(Imai et al., 2001)
Siklin E	Hücre siklusu kontrolü	(Staropoli et al., 2003)
p38/JTV-1	Protein biyosentezi	(Corti et al., 2003)
Synaptotagmin XI	Sinaptik fonksiyon	(Huynh et al., 2003)
$\alpha/\beta$ -tubulin	Hücre iskelet yapısı	(Ren et al., 2003)
ST-polyQ proteinleri	Nörotoksisite	(Tsai, et al., 2003)
Dopamine transporter	Nörotransmisyon	(Jiang, et al., 2004)
HA-SIM2	Transkripsiyon	(Okui et al., 2005)
FBP1	Transkripsiyon	(Ko et al., 2006)
Eps15#	Endositoz	(Fallon et al., 2006)
RanBP2	Nükleer import/SUMOlaşma	(Um et al., 2006)



	n	
IKK $\gamma$ ve TRAF2	NF- $\kappa$ B sinyal yolağı	(Henn et al., 2007)
PICK1	Sinaptik fonksiyon	(Joch et al., 2007)
DJ-1(L166P mutant)	Nörotoksisite	(Olzmann et al., 2007)
PDCD2-1	Apoptozis/hücre proliferizasyonu	(Fukae et al., 2009)
Bcl-2	Anti-apoptozis	(D. Chen et al., 2010)
VDAC1/p62-SQTM1	Otofaji/mitofaji	(Geisler et al., 2010)
Mitofusins 1 ve 2	Mitokondriyal füzyon (birleşme)	(Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010; Ziviani et al., 2010)
Drp1	Mitokondriyal fizyon (ayrılma)	(H. Wang et al., 2011)
PARIS	Transkripsiyon	(Shin et al., 2011)
MIRO	Mitokondriyal fonksiyon	(X. Wang et al., 2011)

SEPT5 (CDCrel): cell division control-related protein,  $\alpha$ Sp22: O-glycosylated  $\alpha$ -synuclein, Pael-R: Parkin associated endothelin-like receptor, p38/JTV-1: Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2, SIM2: single-minded 2, FBP1: far upstream sequence element-binding protein 1, RanBP2: Ran-binding protein 2, TRAF2: TNF receptor-associated factor 2, PICK1: Protein kinase C-alpha-binding protein, DJ-1: Parkinson disease protein 7, PDCD2: programmed cell death 2, Bcl-2: B-cell CLL/lymphoma 2, VDAC1: voltage-dependent anion channel 1, SQTM1: sequestosome 1.

#### 2.4. Parkinson Hastalığı Araştırmalarında Proteomiks

Parkinson Hastalığı birçok farklı model organizma ile çalışılmaktadır. Hayvan modellerinde nörodejenerasyon; neurotoxins 6-hydroxydopamine, MPTP, paraquat, rotenone veya lipopolisakkaritler gibi proinflamator moleküller ile yapılmaktadır. Ayrıca genetik olarak modifiye edilmiş hayvanlar gen defekleri çalışmak amacı ile kullanılmaktadır. Hayvan modelleri her ne kadar hastalığın patofizyolojisi hakkında bilgi verse de bu modellerin kullanımında sınırlar vardır. Hiç bir modelde PH'ya ait insanda görülen klinik semptomlar tümüyle görülmemektedir. Her çalışma grubu kendi hayvan modelini oluşturmaktadır ve bunun bir standardı yoktur (Blandini and Armentero, 2012).

Nörodejenerasyon çalışmaları için hücresel modeller içerisinde öncelikle katekolaminerjik insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) tercih edilmektedir. SH-SY5Y hücreleri SK-N-SH hücrelerinin üçüncü alt klonudur ve simpatik adrenerjik ganglia orijinli nöroblastoma metastazı olan hastanın kemik iliği biyopsisinden elde edilmiştir (Biedler et al., 1973). Bu hücreler tirozin ve dopamin- $\beta$ -hidroksilaz ekspresyone edebildiklerinden dolayı dopamin (DA) ve norepinefrin (NA) sentezleyebilmektedirler (Oyarce and Fleming, 1991). Ayrıca DA homeostazını düzenleyen ve sadece dopaminerjik nöronlarda sentezlenen dopamin transporter (DAT) ve DA reseptörlerini ifade etmektedir ve bu hücrelerde DA saklama vezikülü özelliği bulunmaktadır. Bundan dolayı SH-SY5Y sitoplazmik DA konsantrasyonu hücreler arası ortama dopamine eklenmesiyle artabilmektedir (Takahashi et al., 1994; Xie et al., 2010). Bu nedenle bizim çalışmamızda da SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Besiyerlerin ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

##### **3.1.1. Mueller-Hilton (MH) Agar**

Mueller-Hilton (MH) agar (Oxoid), ticari olarak satılan preparatından üreticinin tavsiyesine uygun olarak hazırlandı. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra yaklaşık 45-50 °C ye kadar soğutuldu. Besiyeri, plastik petrilere derinliği 3-4 mm olacak şekilde steril bir ortamda döküldü ve düzgün bir zeminde soğumaya bırakıldı.

##### **3.1.2. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri**

Luria-Bertani (LB) (Sigma, ABD), ticari olarak satılan preparatından üreticinin tavsiyesine uygun olarak hazırlandı. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmayacaksa + 4 °C'de saklandı.

##### **3.1.3. Zengin Sıvı Besiyeri**

Bir litre sıvı besiyeri için; 10 g tripton, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 2 g glukoz tartıldı, 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmayacaksa + 4 °C'de saklandı.

##### **3.1.4. Antibiyotikli Besiyeri**

Hazırlanan stok antibiyotik konsantrasyonları ve kullanılan antibiyotik miktarları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. .

Antibiyotik etkinliğinin inhibe olmaması için besiyeri yaklaşık 50 °C'ye soğutulduktan sonra antibiyotik eklendi. Antibiyotik besiyeri ile iyice karıştırıldıktan sonra eğer katı besiyeri yapılacak ise plastik petrilere yaklaşık derinliği 3-4 mm olacak şekilde dökülerek steril bir ortamda soğumaya bırakıldı. Katılaştıran besiyeri kullanılmayacaksa +4 °C'de saklandı. Sıvı besiyeri ise antibiyotik eklendikten sonra kullanıldı.

##### **3.1.5. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

Tampon çözeltiler Çizelge 3.2 verildiği şekilde hazırlandı.

**Çizelge 3.1.** Stok antibiyotik konsantrasyonları ve kullanılan miktarlar

<b>Antibiyotik</b>	<b>Stok konsantrasyonu</b>	<b>Çalışma Konsantrasyonu</b>	<b>100 ml besiyeri için stoktan kullanılan miktar</b>
Ampisilin (Sigma, ABD)	0,1 g/ml	100 µg/ml	100 µl
Kloramfenikol (Sigma, ABD)	0,1 g/ml	35 µg/ml	35 µl
Zeosin (Invitrogen, ABD)	0.1 g/ml	100 µg/ml	100 µl
Blastasidin (Invitrogen, ABD)	0.05 g/ml	5 µg/ml	10 µl

**Çizelge 3.2.** Kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışı

<b>Tampon Çözelti Adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve Miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Tris.HCl pH 8,8	1,5 M, 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 8,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
Tris.HCl pH 6,8	0,5 M, 100 ml	6 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 6,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
TBE	1 X, 1 lt	10,8 g Tris, 5,5 g borik asit, 4 ml EDTA (0,5 M pH 8,0) 1 lt suda çözülerek otoklavlandı.
Sodyum asetat	3M, 10 ml	2,46 g sodyum asetat 10 ml saf suda çözüldü.
Gliserol	% 10, 1L	100 ml gliserol 1L su ile karıştırıldı otoklavlandı ve + 4 °C'de saklandı.
SDS	% 10, 10 ml	1 g SDS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum persülfat (APS)	% 10, 10 ml	1 g APS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
Akrilamid / bisakrilamid	% 30, 100 ml	29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid tartılıp 100 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5 X, 300 ml	4,5 g Tris, 21,6 g glisin ve 1,5 g SDS saf suda çözülerek 5 X tampon 1 X 'e seyreltildi.

SDS-PAGE Yükleme Tamponu	4 X, 8 ml	1 ml 0,5 M Tris.HCl pH 6,8, 0,8 ml gliserol, 1,6 ml % 10 SDS, 0,4 ml $\beta$ ME, 0,2 ml BFB (% 0.05) ve 4 ml saf su karıştırıldı. 1 X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.
SDS-PAGE sabitleştirici solüsyon	% 40 Metanol, % 10 Asetik asit, 100 ml	40 ml metanol ve 10 ml asetik asit karıştırılarak su ile 100 ml'ye tamamlandı
SDS-PAGE boyama solüsyonu	% 0,1 (w/v) Coomassie mavisi, 250 ml	SDS-PAGE sabitleştirici solüsyonun içerisine 0,25 g Coomassie mavisi eklenerek hazırlandı.
Western Blot Transfer Tamponu	100 ml	0,58 gr Tris, 0,29 gr Glisin, 0,025gr SDS (0,375 ml %10 SDS'den) tartılarak 100 ml saf suda çözüldü.
TBST pH 7.6	25 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 % 0.1 Tween 20, 1L	2.42gr Tris, 8gr NaCl, 1ml Tween 20 900 ml saf suda çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlandı.
Ponceau S boyama solüsyonu	% 0.1 (w/v)	0.1gr Ponceau S ve 0.5 ml asetik asit karıştırılarak 100 ml saf suda çözüldü.
Bloklama Tamponu (Western Blot)	% 5, 10 ml	5 g bloklama tozu (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, ABD)), 10 mL TBST içinde çözüldü ve filtre kâğıdından geçirilerek kullanıldı.
HyperFilm Developer solüsyonu	Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika)	Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml saf su, 50 ml solüsyon A, 2 ml solüsyon B ve 2 ml solüsyon C ile karıştırılarak kullanıldı.

HyperFilm Fiksleme solüsyonu	Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika)	Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml saf su, 50 ml solüsyon A ve 10 ml solüsyon B ile karıştırılarak kullanıldı.
Amonyum Klorür (NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> )	50 mM, 50 ml	0.22 g NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> tartılıp 50 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Formaldehit	% 3, 50 ml	100 µl % 37 formaldehit 1113 µl PBS ile karıştırılarak kullanıldı.
Triton X-100	% 0,5 1 ml	5 µl Triton X-100 95 µl PBS ile karıştırılarak kullanıldı.
Ubikuitinasyon Reaksiyon tamponu	50 mM Tris.HCl pH 8.8, 2 mM DTT ve 5 mM MgCl <sub>2</sub> 50ml	1.66 ml 1,5M Tris.HCl pH 8.8'den, 0.015 g DTT ve 0.024 g MgCl <sub>2</sub> karıştırılıp saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
Kolon Tamponu Parkin-MBP tag füzyon proteini saflaştırma	20 mM Tris.HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT ve 100 µM ZnSO <sub>4</sub> 100 ml	0,24 g Tris, 1,16 g NaCl ve 0,037 g EDTA 80 ml saf suda çözüldü. pH 7,4 olarak ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
2DE- Rehidrasyon örnek tamponu	8 M üre, 50 mM DTT, % 2 (w/v) CHAPS, % 0.2 (w/v) Amfolit pH 3-10, % 0.001 Bromofenol mavisi 50 ml	24 gr üre, 1 gr CHAPS, 0.385 gr DTT, 250 µl Amfolit (% 40) ve 0.5 mg Bromofenol mavisi karıştırılıp saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2DE stripleri yıkama tamponu I	6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, % 2 SDS, % 20 gliserol, % 2 (w/v) DTT 250 ml	90.15 gr üre, 62.5 ml 1.5M Tris.HCl pH8.8, 5 gr SDS, 50 ml gliserol, 5 g DTT karıştırılıp saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

2DE stripleri yıkama tamponu II	6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, % 2 SDS, % 20 gliserol, % 2.5 (w/v) iyoda asetamid	90.15 gr üre, 62.5 ml 1.5M Tris.HCl pH8.8, 5 gr SDS, 50 ml gliserol, 6.25 gr iyoda asetamid karıştırılıp saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.
DIGE liziz tamponları	30 mM Tris, 7 M üre, 2 M Thioüre, 5 mM Magnezyum Asetat, % 4 (w/v) CHAPS pH 8,5 250ml	0.9 gr Tris, 105 g üre, 38 g thioüre, 0.26 gr Magnezyum Asetat karıştırılıp saf su ile 250 ml'ye tamamlandı. Alikotlara ayrılarak -80 °C'de saklandı. Kullanılacak ise CHAPS % 4 olacak şekilde tartılıp karışıma eklendi ve pH'sı pH kağıdı kullanılarak 8.5'a ayarlandı.
DIGE 2 X örnek tamponu	8 M üre, 130 mM DTT, % 4 (w/v) CHAPS, % 2 (v/v) Amfolit, 2 ml	0.96 gr üre, 0.04 gr DTT, 0.08 gr CHAPS, 100 µl Amfolit (% 40) 2 ml saf su ile karıştırılarak kullanıldı.
Formik asit	% 1, 50 ml	0.5 ml formik asit 49,5 ml saf suya eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.
Asetonitril	% 2, 50 ml	1 ml asetonitril 49 ml saf suya eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.
Asetonitril	% 40, 50 ml	20 ml asetonitril 30 ml saf suya eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum Bikarbonat (AmBic)	50 mM, 10 ml	40 mg AmBic tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
İyoda Asetamid (IAA)	50 mM, 10 ml	92.5 mg IAA tartılıp 10 ml 50 mM AmBic ile çözüldü. Her seferinde taze hazırlanıp kullanıldı.



DTT	10 mM, 10 ml	15.4 mg DTT tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve her seferinde kullanılmadan hazırlandı.
L-Lizin	10 mM, 1 ml	0.146 g L-Lizin tartılıp 1 ml saf suda çözüldü ve - 20 °C'de saklandı.
Sodyum Florid pH 7.2 (NaF)	0.1 M, 50 ml	0,21 gr NaF tartılıp 40 ml saf suda çözüldü pH 7.2 'e ayarlandı ve 50 ml'ye tamamlanıp filtre edildi ve + 4°C'de saklandı.
Pro-QR Diamond destaining solüsyonu	50 mM Sodyum Asetat pH 4, % 20 Asetonitril	50 ml 1 M Sodyum Asetat pH 4'den, 200 ml Asetonitril ile karıştırılıp saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

### **3.2. Kullanılan Nükleik Asit Teknikleri**

#### **3.2.1. Kandan RNA İzolasyonu**

Kandan RNA izolasyonu, ticari olarak satılan QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak üreticinin tavsiyesine uygun olarak gerçekleştirildi. Kullanılan prosedür özetle şöyledir. Taze alınan 1ml kan, 5 ml eritrosit patlatan (EL) tampon ile karıştırılıp buz üzerinde 15 dakika ara ara karıştırılarak bekletildi. Karışım 400 xg'de + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısım atıldı. Dipte oluşan çökelek tekrar 2 ml EL ile çözüldü, 400 xg'de + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısım atıldı. Çökelek 0.142 M betamerkaptoetanol (BME) içeren 600 µl lökosit patlatan tampon (RLT) içerisinde pipet yardımıyla lizize uğratıldı ve temizleme amaçlı, QIAshredder spin kolondan geçirildi. Altta kalan sıvı kısma, 600 µl RNase içermeyen % 70 etanol eklenerek nazikçe karıştırıldı ve RNA'yı uygun şartlarda bağlayabilen QIAamp spin kolonuna yüklenerek 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Her seferinde kolon temiz 2 ml'lik tüplere aktarıldı. Kolona 700 µl RW1 tamponu eklendi ve 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolona bağlanan örnekler DNaseI muamelesi için 70 µl RDD (DNaseI tamponu) tamponu içerisinde 10 µl DNaseI (1500 Kunits/units) konulan solüsyon eklenerek oda ısısında 15 dakika bekletildi. Süre sonunda 700 µl RW1 tamponu ile 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt kısım atılarak kolon 500 µl RPE (yıkama) tamponu ile 8000 xg'de 15 saniye ve 3 dakika olmak üzere iki kez yıkanarak santrifüj edildi. Kolon 1 dakika da yüksek hızda çevrildikten sonra temiz tüpe alındı ve RNA 35 µl RNase içermeyen su ile kolondan indirildi.

#### **3.2.2. cDNA Sentezi**

İzole edilen RNA'dan cDNA sentezi RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EU) kiti ile yapıldı. Çizelge 3.3.'de içeriği verilen tüm reaksiyon buz üzerinde hazırlandı. Karışım önce 90 °C'de 1 dakika ısıtıldı, daha sonra buz üzerine alınarak içerisine 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl) ve 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) eklendi ve reaksiyonun 42 °C'de 3 saat gerçekleşmesine izin verildi.

#### **3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), çoğaltılmak istenen gen bölgesi için özel olarak tasarlanan ve uçlarında restriksiyon enzim kesim bölgeleri bulunan primerler ile TC-3000 Personal Thermal Cycler (Techne, ABD) cihazı kullanılarak yapıldı.

**Çizelge 3.3.** cDNA sentez reaksiyonu karışımı

dH <sub>2</sub> O	5 µl
5 X Reaction Buffer	4 µl
dNTP Karışımı 10 mM	2 µl
Random Hexamer Primer 100 µM (0.2 µg/µl)	1 µl
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer 100 µM (0.5 µg/µl)	1 µl
RNA	5 µl

PZR reaksiyonu karışımı her primerden 5 µM, 1 X Long PZR tamponu, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, her biri 0.25 mM olan dNTP karışımı, 2.5 U Long PZR enzim karışımı (ThermoScientific, ABD) ve 0.1 µg/µl kalıp DNA'dan oluştu. Primerler ve PZR şartları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

#### **3.2.4. PZR Ürününün Temizlenmesi**

PZR ürünü klonlamaya uygun olması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya) ile üreticinin tavsiye ettiği şekilde temizlendi. Toplamda 25 µl olan PZR ürünü saf su ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerine 500 µl bağlanma tamponu eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra High Pure Spin Filter Tube kolona yüklendi 13 000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve altta kalan kısım atıldı. Kolona sırasıyla 500 µl ve 200 µl yıkama tamponu eklenerek 13 000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve altta kalan kısım atıldı. Kolon boş olarak 13 000 xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra temiz tüpe alındı ve PZR ürünü 35 µl elüsyon tamponu ile kolondan indirildi.

#### **3.2.5. Jel Elektroforezi**

##### **3.2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi**

Etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jel hazırlayabilmek için 40 ml 1 X TBE çözeltisi içerisine 0,4 g agaroz (Prona Basica le Agarose, EU) eklenerek karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar kaynatıldı. Daha sonra erimiş agaroz çözeltisi oda sıcaklığında ılık hale gelinceye kadar bekletildi ve içerisine 10 ng/ml stok etidyum bromür çözeltisinden 1 µl eklenerek elektroforez tankında katılaşması sağlandı. Elektroforez 1 X TBE tamponu içerisinde, 8 V/cm ile 20-30 dakikada tamamlandı. Ürünler UV ışığı altında görüntülendi. Oluşan DNA bantları moleküler ağırlık belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

##### **3.2.5.2. SDS-PAGE Protein Jel Elektroforezi**

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılan SDS-PAGE protein jeli yükleme ve ayırma jeli olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Eğer Çizelge 3.5.'de verilen konsantrasyonlardan farklı jel konsantrasyonu kullanılacak ise bu konsantrasyonların hesaplanması için <http://www.changbioscience.com/calculator/sdspd.htm> web adresinden faydalanıldı.

**Çizelge 3.4.** Primerler Listesi ve PZR Şartları

Primer İsmi	Primer Dizisi 5'...-3'	Tm (°C)	Kullanılan PZR Programı ve Döngü Sayısı	Ürün Boyu (bp)	Kullanım Amacı	
PARK2 F (Kasap ve ark., 2009)	<u>CCGGATCC</u> GATGATAGTGTGGTCAGGTTCAACT BamHI	52.6	94 °C 5 dk	} 35	1400	Yabani ve mutant <i>Park2</i> genini çoğaltmak
PARK2 R (Kasap ve ark., 2009)	<u>GGAATTC</u> CGCTACACGTCGAACCAGTGGT EcoRI	58.7	94 °C 30sn 57 °C 60sn 72 °C 150sn 72 °C 20 dk			
PARK2 F-pPAL7	AT <u>AAGCTT</u> TGACTTCTATGATAGTGTGGTCAGGTTCAACT HindIII	60.1	94 °C 5 dk	} 35	1400	Ekspresyon çalışması için ( <i>Park2</i> genini pPAL7 vektörüne klonlamak)
PARK2 R-pPAL7	<u>GGAATTC</u> CGCTACACGTCGAACCAGTGGT EcoRI	58.7	94 °C 30sn 57 °C 60sn 72 °C 150sn 72 °C 20 dk			
GFP-F	<u>AAGCTTAAAGCTT</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGG HindIII HindIII	57.2	94 °C 5 dk	} 35	717	Lokalizasyonunu çalışması için (GFP genini çoğaltmak)
GFP-R	<u>GGATCCGGATCC</u> CTGTACAGCTCGTCCATGCCG BamHI BamHI	59.3	94 °C 30sn 57 °C 60sn 72 °C 150sn 72 °C 20 dk			
PARK2 FBam	<u>GGATCCGGATCC</u> ATGATAGTGTGGTCAGGTTCAACT BamHI BamHI	50.8	94 °C 5 dk	} 35	1400	Lokalizasyon çalışması için ( <i>Park2</i> genini çoğaltmak)
PARK2 R (Kasap ve ark., 2009)	<u>GGAATTC</u> CGCTACACGTCGAACCAGTGGT EcoRI	58.7	94 °C 30sn 57 °C 60sn 72 °C 150sn 72 °C 20 dk			
pMalPark3F	<u>GAATTCGAATTC</u> ATGATAGTGTGGTC EcoRI EcoRI	20.6	94 °C 5 dk	} 35	1400	Ekspresyon çalışmasında için ( <i>Park2</i> genini pMAL-c4x vektörüne klonlamak)
pMalPark3R	<u>AAGCTTAAAGCTT</u> CTACACGTCGAACC HindIII HindIII	29.6	94 °C 30sn 54 °C 60sn 72 °C 150sn 72 °C 20 dk			

İki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasına önce ayırma jeli üstten üç cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeyine az miktarda izopropanol pipet ile eklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı ile cam plakalar arası temizlendi ve ayırma jeli eklenerek yükleme tarağı yerleştirildi. Polimerize olan jel tanka konuldu ve SDS-PAGE yürütme tamponu eklendi. Yüklenecek istenen protein çözeltisinin üzerine hacmine göre 4 X yükleme tamponu 1 X olacak şekilde eklendi. Protein çözeltileri 95 °C'de 3 dakika kaynatılarak buz üzerine alındı ve kısa bir santrifüjden sonra mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenerek 180 V'da 60 dakika yürütüldü. Yürütme sonunda jel cam plakalardan çıkarıldı ve 30 dakika sabitleştirici solüsyonda bırakıldı. Daha sonra jel Coomassie mavisi (Bio-Rad, ABD) içeren boyama solüsyonuna alındı ve protein bantları görünür hale gelinceye kadar boyamaya devam edildi (yaklaşık 1 saat kadar). Boyadan çıkarılan jel % 5 asetik asit içeren boya giderici çözelti içerisinde gece boyu bekletildi. Görünür hale gelen protein bantları, molekül ağırlıkları bilinen standart protein bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Jellerin imajları VersaDoc MP4000 cihazı ile alınarak kaydedildi.

### **3.2.6. DNA Parçalarının Agaroz Jelden İzolasyonu ve Saflaştırılması**

% 1'lik agaroz jelde yürütülen kesilmiş DNA parçalarını jelden izole edebilmek için öncelikli olarak etidyum bromür içermeyen bir jel hazırlandı. DNA parçaları bu jel üzerine yüklenirken örneklerden ikişer kez yükleme yapıldı. Örneğin, marker-örnek1-örnek2-boşluk-örnek1-örnek2. Jel uygun voltajda yürütüldükten ve bromofenol mavisi jelin sonuna kadar ilerledikten sonra jel yürütme tankından çıkartıldı ve boşluk olan kısımdan kesilerek yarısı etidyum bromür ile boyamaya alındı. Boyanan parça ile boyanmayan parça bir UV kutusu üzerinde hizalandıktan sonra boyanan parça temel alınarak boyanmayan jel üzerinden DNA parçasının (PZR ürünleri) kesimi yapıldı. Kesilen Jel parçalarından High Pure PCR Product kiti (Roche, Almanya) kullanılarak DNA parçalarının izolasyonu yapıldı (Kasap, 2007).

### **3.2.7. DNA Parçalarının Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi**

Agaroz jelden izole edilen PZR ürünü ve vektörler restriksiyon enzimleri (Fermentas, ABD) ile kesildiler. Tek, ikili ya da üçlü enzim kesimi aynı tüpte gerçekleştirildi ve kesim için üreticinin tavsiye ettiği tampon çözeltiler kullanıldı. Enzimatik kesim reaksiyonları tüm gece 37 °C'de kalacak şekilde gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.5.** SDS-PAGE jel içeriği

<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>Yükleme Jeli</b>	<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>Ayırma Jeli</b>
Jel yüzdesi (%)	4	Jel yüzdesi (%)	12
% 30 Akrilamid / bisakrilamid (mL)	0.51	% 30 Akrilamid / bisakrilamid (mL)	2
1.5 M Tris.HCl pH 8.8 (mL)	0.375	1 M Tris.HCl pH 6.8 (mL)	1.25
% 10 SDS (mL)	0.03	% 10 SDS (mL)	0.05
% 10 APS (mL)	0.03	% 10 APS (mL)	0.05
Temed (mL)	0.003	Temed (mL)	0.002
Distile Su (mL)	2.04	Distile Su (mL)	1.65
Toplam Hacim (mL)	3	Toplam Hacim (mL)	5

### 3.2.8. Etanol Çöktürmesi ile DNA'nın Temizlenmesi

DNA parçaları jelden izole edildikten ya da restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra hacimlerinin 1:10 oranında 3 M sodyum asetat ve 1 ml % 96 etanol eklenerek kuru buzda 20 dakika bekletildi. Bekleme sonunda tüpler 20 dakika 13 000 xg'de + 4 °C'de santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı. Çöken DNA'lara 1 ml % 70 etanol eklenerek 5 dakika 13 000 xg'de + 4 °C'de santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve etanol iyice uçurulduktan sonra çöken DNA'lar saf su ve ya TE tamponu içerisinde çözüldü.

### 3.2.9. DNA Parçalarının (İnsört) Vektör DNA'ya Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonları aşağıdaki karışım hazırlanarak (Çizelge 3.6.) 16 °C'de gece boyu gerçekleştirildi.

### 3.2.10. Kompetent *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Tek koloni şeklinde agar kültürler üzerinde üretilen *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 kodon plus ve *E.coli* DH10B hücreleri 3 ml'lik LB besiyerinde tüm gece 37 °C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra 600 ml LB besiyerine ekildi. 600 ml'lik bu bakteri kültürü yoğunluğu 600 nm'de 0.5 olana kadar (OD<sub>600</sub> = 0.5) 37 °C'de 250 rpm'de çoğalmaya bırakıldı. Buz üzerine alınan hücreler 10 dakika bekletildi ve 5 000 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Hücre peleti üç kez soğuk % 10 gliserol içeren solüsyon ile her seferinde hacim bir önceki hacmin yarısına indirilerek yıkanıp 5 000 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edilerek temizlendi. Üçüncü yıkamanın sonunda hücre çökeleği % 10 gliserol içeren solüsyon ile çözülerek 40 µl'lik alikotlara ayrıldı ve - 80°C'de saklandı (Kasap ve ark., 2008).

### 3.2.11. Kompetent *E.coli* Hücrelerine Transformasyon (Elektroporasyon)

Elektroporasyon, Elektroporator 2510 (Eppendorf, ABD) kullanılarak 10 µF ve 1700 V akım kullanılarak yapıldı. Sıvı azotta içerisinde saklanan 40 µl *E. coli* DH10B ve ya *E. coli* BL21 kodon plus hücreleri buz üzerinde eritildikten sonra içerisine 2 µl ligasyon reaksiyonu eklendi ve bir mikropipet yardımıyla hücreler ligasyon karışımı ile karıştırıldı. Önceden soğutulmuş 1 mm çaplı 100 µl'ye kadar hacmi olan elektroporasyon küvetine (Eppendorf, ABD) konulan karışıma akım uygulandıktan sonra üzerine 500 µl zengin sıvı besiyeri eklendi karışım (üzerine besiyeri konulan hücreler ve ligasyon karışımı) yeni bir



**Çizelge 3.6.** 1:3 oranında kurulan ligasyon reaksiyonu karışımı

<b>Kullanılan Kimyasallar ve Örnekler</b>	<b>Kullanılan Miktarlar</b>
DNA	100 ng (X µl)
Vektör	300 ng (Y µl)
10 X T4 DNA ligaz tamponu	1 µl
T4 DNA ligaz (2,5 ünite/ µl)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	(8-(X+Y)) µl
Toplam	10 µl

tüpe alınarak ve 2 saat 37 °C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler uygun antibiyotiği içeren MH agar besiyerine ekildi ve 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Antibiyotikte büyüme gösteren bakteriler klon olup daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltıldı ve saklamaları alındı. Saklama almak için 850 µl sıvı besiyerine alınan hücreler süspansiyon edildikten sonra içerisinde % 10 olacak şekilde % 60'lık steril gliserol eklendi ve - 80 °C'de saklandı.

### **3.2.12. Alkali Liziz Metodu ile Plazmit DNA İzolasyonu**

Bakterilerden plazmit izolasyonu Macherey-Nagel Plazmit DNA purifikasyon kiti kullanılarak yapıldı (Macherey-Nagel Plazmit DNA purification kit, ABD). Kısaca bakteriler uygun tampon çözeltisi ile liziz edildikten sonra ortam nötral pH'ya getirildi ve hücre debrisleri sentrifüj ile çöktürüldü. Plazmit DNA'sını içeren faz silika bir kolona yüklendi ve tuz, metabolitler ve çözülebilir makro moleküler hücre içerikleri etanol yıkaması ile uzaklaştırıldı. Saf plazmit DNA'sı düşük iyonik güç koşullarında alkalik tampon çözeltisi ile kolondan ayrıldı.

### **3.2.13. *E.coli* Hücrelerinden Endotoksin İçermeyen Plazmit İzolasyonu**

*E.coli* hücrelerinden endotoksin içermeyen plazmit izolasyonu transfeksiyon çalışmalarını yapmak amacı ile Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, ABD) ile üreticinin tavsiyesine uygun olarak yapıldı. Rekombinant plazmiti içeren hücre antibiyotik içeren 100 ml LB besiyerinde tüm gece 37 °C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Büyüyen hücreler 15 dakika 6 000 xg'de + 4 °C'de santrifüj edildi. Çöken hücreler 10 ml P1 (süspansiyon tamponu) tamponunda süspansiyon edildikten sonra 10 ml P2 (patlatma tamponu) tamponu ile patlatılarak oda ısısında 5 dakika bekletildi. Üzerine 10 ml soğuk P3 (nötralizasyon tamponu) tamponu eklenip karıştırılan hücreler QIAfilter Kartuşa yüklenerek oda ısısında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda kartuştan geçirilen hücre liziti 50 ml'lik temiz tüpte toplandı, üzerine 2.5 ml ER tamponu (isopropanol, polyethylene glycol octylphenyl) eklenerek karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu süre içinde QIAGEN-tip 500 kolonu 10 ml QBT tamponu (ekülibrasyon tamponu) ile yıkandı ve lizit kolona yüklenerek kolondan geçirildi. Daha sonra kolon 2 kere 30 ml QC tamponu (yıkama tamponu) ile yıkandı. Endotoksin içermeyen DNA kolondan temiz tüp içerisine 15 ml QN tamponu (kolondan ayırma tamponu) ile indirildi. DNA oda ısısındaki 10 ml izopropanol ile karıştırılarak 30 dakika 15 000 xg'de + 4 °C'de santrifüj edildi. Üste faz

atıldı ve çöken DNA oda ısısındaki endotoksin içermeyen 40 ml % 70 etanol ile 10 dakika 15 000 xg'de santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı ve etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra endotoksin içermeyen plazmit DNA'sı uygun hacimdeki endotoksin içermeyen TE tamponunda çözüldü. DNA konsantrasyonu ölçüldü ve transfeksiyon çalışmalarını yapmak üzere + 4 °C'de saklandı.

### 3.2.14. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında ölçüldü. Ölçüme başlamadan DNA'nın çözüldüğü solüsyon ile cihaz körlendi ve 260 nm dalga boyunda 2 µl DNA örneği ile ölçüm yapıldı.

### 3.2.15. Dizileme ve Dizi Analizi

Klonlanan DNA'ların dizileri İontek firması (İontek Inc., Türkiye) tarafından yapıldı. Elde edilen işlenmemiş datalar önce Chromos (Current Version: 1.6, Technelysium, İngiltere) programında görsel olarak edit edildi daha sonra Vector NTI (İnvitrogen, ABD) programına alınarak analizleri yapıldı.

## 3.3. Klonlamalar

### 3.3.1. pCR2.1-TOPO-Park2 Yabani Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi

Bölüm 3.2.3.1.'de verilen yabani tip *park2* genini çoğaltmak üzere tasarlanan primerler kullanılarak PZR kuruldu. PZR ürünü etidyum bromür içeren % 1 agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında görüntülendi. Doğru büyüklükte olduğu belirlenen PZR ürünü High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği şekilde temizlendi. pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> vektörü TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing (İnvitrogen, ABD) kitinden alınarak kullanıldı. Temizlenmiş *park2* PZR ürünü üreticinin tavsiyesi doğrultusunda vektöre klonlandı. Reaksiyon tüpüne: 2 µl *park2* PZR ürünü, 0.5 µl seyreltik tuz çözeltisi ve 0.5 µl pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (10 ng/µl) vektörü konularak oda ısısında 3 saat bekletildi. Süre sonunda ligasyon ürünü sıvı azotta dondurulmuş elektrokompatent *E.coli* DH10B hücrelerine transforme edildi. Ampisilin (100 µg/ml) içeren MH agar üzerinde büyüyen koloniler tek koloni pasajı ile çoğaltılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitlerin doğrulukları EcoRI - BamHI restriksiyon enzim kesimleri yapılarak belirlendi ve pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Park2 rekombinant vektörü içeren koloni çoğaltıldı ve saklamaya alındı.

### 3.3.2. pcDNA4/TO-Park2 Yabani Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi

Yabani tip *park2* genini pcDNA<sup>TM</sup> 4/TO vektörüne klonlamak için pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO<sup>®</sup>-Park2 rekombinant klonundan faydalanıldı. Bu amaç için 0.5 µg pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO<sup>®</sup>-Park2 ve pcDNA<sup>TM</sup> 4/TO vektörü ayrı tüplerde 2 X Tango tamponu içerisinde 5 ünite EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri (Fermentas, ABD) ile kesildi. Vektörler çift enzim kesimi ile aynı tüp içerisinde üreticinin tavsiyesi doğrultusunda endonüklez kesimine tabi tutuldu. Kesim reaksiyonları % 1 agaroz jelde yürütüldü ve kesilmiş pcDNA<sup>TM</sup> 4/TO vektörü ile pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO<sup>®</sup>-Park2 rekombinant klonundan açığa çıkan *Park2* genini içeren DNA parçası jelden izole edildi. İzolasyon ürünleri etanol çöktürmesi ile temizlendi ve ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon ürününün 2 µl'si elektrokompatent *E.coli* DH10B hücresine transforme edildi ve MH agara (Ampisilin 100 µg/ml) ekildi. Agar üzerinde çoğalan kolonilerden tek koloni pasajı yapıldı ve çoğalan hücrelerden plazmit DNA'sı izole edildi. İzole edilen plazmit DNA'sı EcoRI - BamHI restriksiyon enzim kesimleri yapılarak belirlendi ve pcDNA<sup>TM</sup> 4/TO-Park2-yabani tip rekombinant vektörü içeren koloni çoğaltıldı ve saklamaya alındı.

### 3.3.3. pcDNA4/TO-Park2 Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi

pcDNA4/TO-Park2 mutant tip rekombinant plazmit klonu 104S217 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında AEK88/8 sayı numaralı etik kurul izni alınarak üretilmiş olup Kasap ve arkadaşları tarafından 2009'da yapılan bilimsel makalede bilim dünyasına rapor edilmiştir (Kasap ve ark., 2009). Klona ait bilgi ayrıca Swiss-Prot ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) (erişim numarası:O60260) ve NCBI Data bankalarına (erişim numarası:EF375626.1) da girilmiştir. pCDNA4/TO-Park2 mutant tip rekombinant plazmit klonu laboratuvarımızın envanterinde bulunmaktadır.

### 3.3.4. pPAL7- Park2 Yabani ve Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi

Yabani tip ve mutant Parkin proteininin saflaştırılması amacıyla ticari olarak satılan afinite saflaştırma sistemi olan "Profinity eXact Cloning and Expression Kits" kullanıldı (Bio-Rad, ABD). Yabani ve mutant *park2* genleri pPAL7 vektörüne sub-klonlandı. Yabani ve mutant *Park2* genleri, pcDNA<sup>TM</sup> 4/TO-Park2 yabani tip/mutant plazmit kalıp DNA'sı ve özel dizayn ettiğimiz uçlarında HindIII ve BamHI restriksiyon enzim kesim bölgeleri bulunan primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Oluşan PZR ürünleri etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jelde yürütüldü, UV ışık kaynağı ile görüntüledi ve

klonlamaya uygun olması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya) ile üreticinin tavsiye ettiği şekilde temizlendi. Klonlama işlemi için temizlenen yabancı ve mutant *Park2* genleri PZR ürünleri ve pPAL7 vektörüne HindIII ve EcoRI restriksiyon enzim kesimleri uygulandı. Kesim ürünleri etidyum bromür içermeyen % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği doğrultuda izole edildi. Jelden izole edilen PZR kesim ürünü ve pPAL7 vektörü bir araya getirilerek etanol çöktürmesi ile temizlendi ve ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon karışımının 2 µl'si elektrokompatent *E. coli* DH10B hücresine transforme edildi. MH agara (Ampisilin 100 µg/ml) ekildi. Agar üzerinde çoğalan kolonilerden tek koloni pasajı yapıldı ve çoğalan hücrelerden plazmit DNA'sı izole edildi. İzole edilen plazmit DNA'sı HindIII - EcoRI restriksiyon enzim kesimleri yapılarak doğrulandı ve pPAL7-Park2 yabancı tip/mutant *Park2* genini taşıyan klon belirlendi, çoğaltıldı ve saklamaya alındı.

### **3.3.5. pMAL-c4X-Park2 Yabancı ve Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi**

Yabancı tip ve mutant Parkin'i maltoz bağlanma proteini (MBP) ile füzyon şeklinde tek adımda saflaştırılması amacıyla ticari olarak satılan "pMAL™ Protein Fusion and Purification System" kullanıldı (New England Bio-Labs, ABD). Yabancı ve mutant *park2* genleri pMAL-c4X vektörüne klonlandı. Yabancı ve mutant *Park2* genleri, pcDNA™4/TO-Park2 yabancı tip/mutant plazmit kalıp DNA'sı ve özel dizayn ettiğimiz uçlarında HindIII ve EcoRI restriksiyon enzimi kesim bölgeleri bulunan primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Oluşan PZR ürünleri etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jelde yürütüldü, UV ışık kaynağı ile görüntülendi ve klonlamaya uygun olması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği doğrultuda temizlendi. Klonlama işlemi için temizlenen yabancı ve mutant *Park2* geni PZR ürünleri ve pMal-c4X vektörü ayrı tüplerde HindIII ve EcoRI restriksiyon enzim kesimi uygulandı. Kesim ürünleri etidyum bromür içermeyen % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği şekilde izole edildi. Jelden izole edilen PZR kesim ürünü ve pMal-c4X vektörü bir araya getirilerek etanol çöktürmesi ile temizlendi ve ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon karışımının 2 µl'si elektrokompatent *E. coli* DH10B hücresine transforme edildi. MH agara (Ampisilin 100 µg/ml) ekildi. Agar üzerinde çoğalan kolonilerden tek koloni pasajı yapıldı ve çoğalan hücrelerden plazmit DNA'sı izole edildi. İzole edilen plazmit DNA'sı HindIII - EcoRI

restriksiyon enzim kesimleri yapılarak doğrulandı ve pMal-c4X-Park2 yabani tip/mutant *park2* genini taşıyan klon belirlendi, çoğaltıldı ve saklamaya alındı.

### **3.3.6. pcDNA4/TO-GFP-Park2 Yabani ve Mutant Tip Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi**

Yabani tip ve mutant Parkin'in hücre içerisindeki lokalizasyonunu çalışmak amacıyla proteini GFP proteini ile füzyon olacak şekilde eksprese eden rekombinant plazmit yapıldı. GFP geni, pGFP-N plazmit kalıp DNA'sı ve özel dizayn ettiğimiz uçlarında HindIII ve BamHI restriksiyon enzim kesim bölgeleri bulunan primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Oluşan PZR ürünü etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jelde yürütüldü, UV ışık kaynağı ile görüntüledi ve klonlamaya uygun olması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği doğrultuda temizlendi. Klonlama işlemi için temizlenen GFP genini içeren PZR ürünü ve pcDNA<sup>TM</sup>4/TO vektörüne HindIII ve BamHI restriksiyon enzim kesimi uygulandı. Kesim ürünleri etidyum bromür içermeyen % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği doğrultuda saf olarak izole edildi. Jelden izole edilen PZR kesim ürünü ve pcDNA<sup>TM</sup>4/TO vektörü bir araya getirilerek etanol çöktürmesi ile temizlendi ve ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon karışımınının 2 µl'si 40 µl elektrokompatent *E. coli* DH10B hücresine transforme edildi. MH agara (Ampisilin 100 µg/ml) ekildi. Agar üzerinde çoğalan kolonilerden tek koloni pasajı yapıldı ve çoğalan hücrelerden plazmit DNA'sı izole edildi. İzole edilen plazmit DNA'sı HindIII - BamHI restriksiyon enzim kesimleri yapılarak belirlendi ve pcDNA<sup>TM</sup>4/TO-GFP GFP genini taşıyan klon belirlendi, çoğaltıldı ve saklamaya alındı.

İkinci adımda pcDNA<sup>TM</sup>4/TO-GFP vektörüne yabani ve mutant tip *park2* geni klonlandı. Yabani ve mutant *park2* geni; pcDNA<sup>TM</sup>4/TO -Park2 Yabani tip/mutant plazmit kalıp DNA'sı ve özel dizayn ettiğimiz uçlarında BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimi kesim bölgeleri bulunan primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Oluşan PZR ürünleri etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jelde yürütüldü, UV ışık kaynağı ile görüntüledi ve klonlamaya uygun olması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği doğrultuda temizlendi. Klonlama işlemi için temizlenen yabani ve mutant *park2* PZR ürünleri ve pcDNA<sup>TM</sup>4/TO -GFP vektörüne BamHI ve EcoRI restriksiyon enzim kesimleri uygulandı. Kesim ürünleri etidyum bromür içermeyen % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile üreticinin tavsiye ettiği doğrultuda saf olarak izole edildi. Jelden

izole edilen PZR kesim ürünü ve pcDNA<sup>TM</sup>4/TO-GFP vektörü bir araya getirilerek etanol çöktürmesi ile temizlendi ve ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon karışımının 2 µl'si *E. coli* DH10B hücrelerine transforme edildi ve MH agara (Ampisilin 100 µg/ml) ekildi. Agar üzerinde çoğalan kolonilerden tek koloni pasajı yapıldı ve çoğalan hücrelerden plazmit DNA'sı izole edildi. İzole edilen plazmit DNA'larına doğrulama yapmak amaçlı HindIII - EcoRI ve HindIII – EcoRI - BamHI restriksiyon enzim kesimleri uygulandı ve pcDNA<sup>TM</sup>4/TO-GFP-Park2 yabani tip /mutant GFP-*park2* genini taşıyan klon belirlendi, çoğaltıldı ve saklamaya alındı.

Sonuç olarak bu çalışma sürecinde elde edilen ve laboratuvarımızın envanterine kazandırılan rekombinant plazmit klonlar şunlardır:

1. pCR2.1-TOPO-Park2 yabani tip
2. pcDNA4/TO-Park2 yabani tip
3. pPAL7- Park2 yabani tip
4. pPAL7- Park2 mutant tip
5. pMAL-c4X-Park2 yabani tip
6. pMAL-c4X-Park2 mutant tip
7. pcDNA4/TO-GFP
8. pcDNA4/TO-GFP-Park2 yabani tip
9. pcDNA4/TO-GFP-Park2 mutant tip

Rekombinant plazmit klonlarına ait vektör haritasıları appendiks kısmında verilmiştir. Haritalar Vector NTI (Invitrogen, ABD) programı kullanılarak hazırlanmıştır.

### **3.4. Hücre Kültürü**

#### **3.4.1. Hücre Çizgilerinin Hazırlanması**

##### **3.4.1.1. Hücrelerin Büyütülmesi**

SH-SY5Y hücreleri standart kültür büyütme şartlarında kültüre edildi. Hücreler MEM Earle's (Biochrome, İngiltere), % 10 ısı inaktif tetrasiklin içermeyen FBS (GIBCO, Invitrogene, ABD), 0.1 µg/µl Penisilin/Streptomisin (Biochrome, İngiltere), 2.8 mM L-Glutamin (Biochrome, İngiltere) karışımı içeren besiyerinde 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> atmosfer nemde büyütüldü. Hücre besiyerleri her 3 günde bir yenilendi ve hücre yoğunluğu % 75'e vardığında hücreler subkültüre edildi.

### **3.4.1.2. Hücrelerin Dondurulması**

Hücreler azot tankında yavaş dondurma yöntemi kullanılarak donduruldu. Bu amaçla hazırlanan dondurma besiyeri, % 70 MEM, % 20 FBS ve % 10 DMSO içerdi. Dondurma işlemi öncesi tüm taban yüzeyini kaplamış (% 80 - 90 confluent) hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve iki kez kalsiyum magnezyum içermeyen PBS (Biochrome, İngiltere) solüsyonu ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabı içerisine 1 ml % 0.25 Trypsin / EDTA (Biochrome, İngiltere) solüsyonu eklendi ve solüsyonun iyice yüzeye yayılması sağlanarak yaklaşık 7 - 10 dakika 37 °C'de inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası kültür kabı içerisindeki hücreler 10 ml PBS ile toplandı ve 10 dakika 1 500 xg'de + 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan solüsyon uzaklaştırıldı ve hücrelerin bulunduğu çökelti dondurma besiyeri ile karıştırıldı. Daha önceden hazırlanarak işaretlenmiş olan kryotüp içerisine her tüpe 1 ml gelecek şekilde bölündü. Tüpler - 80 °C'de kyro-freezer saklama kabında (Nalgene, ABD) bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına yerleştirildi.

### **3.4.1.3. Hücrelerin Çözülmesi**

Hücreler azot tankından çıkarıldıktan sonra hızlı çözme yöntemi kullanılarak kryotüpün doğrudan 37 °C'deki su banyosu içerisine daldırılmasıyla çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra çözme besiyerine alınarak içindeki DMSO uzaklaştırıldı. Çözme besiyeri 8 ml MEM içerisine yavaş ve damla halinde eklenmiş 2 ml FBS'den oluşmaktadır. Karıştırılmadan hazırlanan besiyere eriyen hücreler yavaş ve damla halinde eklenerek 10 dakika 1 500 xg'de + 4 °C'de santrifüj edildi. Çöken hücreler antibiyotik içermeyen kültür besiyerinde bir gece büyütüldü. Ertesi gün hücrelerin besiyeri uygun antibiyotik içeren ile değiştirildi ve hücre besiyerleri her üç günde bir yenilendi.

### **3.4.1.4. Hücrelerin Pasajlanması**

Hücre yoğunluğu ~ % 75'e vardığında hücreler buldukları kültür kabından kaldırılarak daha büyük ya da daha fazla sayıda kültür kaplarına ekildi. Kısaca, steril PBS ile yıkanan hücreler yapıştıkları yüzeyden % 0.25 Trypsin / EDTA muamelesi ile kaldırılarak PBS varlığında santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra hücreler büyüdükleri besiyerinde çözülerek uygun kültür kaplarına aktarıldı.



### 3.4.1.5. Hücrelerin Sayılması

Hücreler % 75 yoğunluğa ulaşıldıktan sonra hücre sayım işlemine başlandı. Steril PBS ile yıkanan hücreler yapıştıkları yüzeyden % 0.25 Tripsin muamelesi ile kaldırılarak PBS varlığında 2 000 xg de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1 ml büyüdükleri besiyerinde çözüldü. Homojen olarak karıştırılan hücrelerin 50 µl'si, 50 µl % 0.5 Tripian Blue (Sigma, ABD) ile pipetlenerek iyice karıştırıldı. Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) alkol ile temizlenerek düz bir yüzeye konuldu ve lamel sayım alanı çerçevesinin üzerini örtecek şekilde yerleştirildi. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktanın tam orta noktasından hücre solüsyonu yavaşça sayım alanına pipetlendi. Thoma lamının her iki tarafında bulunan 16 büyük kare içindeki tüm hücreler mikroskopun 20 X objektifi ile sayılarak ayrı ayrı not edildi ve ortalaması alındı. Hücre sayısı hesaplamak için: Sayılan Hücre sayısı x Dilüsyon oranı (2) x 10<sup>4</sup> formülasyonu kullanılarak ml deki hücre sayısı belirlenmiş oldu. Dilüsyon faktörü eşit oranda hücre ve boya karışımından dolayı 2'dir. 0.1 mm<sup>3</sup> : 10<sup>4</sup> ml'dir.

### 3.4.2. İmmün Floresan Mikroskopi

#### 3.4.2.1. Hücrelerin Cover-Sliplere Sabitlenmesi ve İmmunboyanması

İmmünfloresan mikroskopi çalışmalarını gerçekleştirebilmek için hücreler BioCoat poly-D-Lysine cellware 12 mm round cover-slipler (BD, ABD) üzerine ekildi. Hücre yoğunluğu % 75'e ulaştığında cover slipler ince uçlu bir pens yardımı ile kültür kaplarından alınarak bir beher içerisine konulan PBS solüsyonu ile beş kez batırılıp-çıkartılarak yıkandı. Daha sonra hücreler düz bir zemine serilen parafilm üzerine damla olarak konulan solüsyonlar ile muamele edildi. Hücre içerisindeki proteinleri immünboyanma ile işaretlemek için Çizelge 3.7.'de verilen prosedür uygulanmıştır.

Temiz lam üzerine 8 µl moviol solüsyonu damlatıldı. Cover-slip üzerindeki hücreler lamın iç tarafında moviol solüsyonuyla temas edecek ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde 45 derecelik açı ile yerleştirildi. Hücreler oda ısısında karanlıkta kuruması için bekletildikten sonra flouresan mikroskopta incelendi.

### 3.4.3. Elektrotransfeksiyon ile Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması

#### 3.4.3.1. Transfeksiyon

Hücreler % 75 yoğunluğa ulaşıldıktan sonra transfeksiyon işlemine başlandı. Steril PBS ile yıkanan hücreler yapıştıkları yüzeyden % 0.25 Trypsin muamelesi ile kaldırılarak PBS varlığında santrifüj edildi. Çöken hücreler 400 µl MEM Earle's besiyerinde çözüldü ve üzerine 20 µg yabancı ve mutant *parkin* geni klonlanmış endotoksin içermeyecek şekilde hazırlanmış rekombinant plazmit eklenerek elektrotransformasyon kuvvetlerine aktarıldı. Transfeksiyon cihazı (Eppendorf 2510, ABD) ile hücre-vektör karışımına kısa pulslar halinde 260 V akım uygulandı ve karışım antibiyotik içermeyen besiyerine ekildi. Hücrelere kontrol amaçlı, GFP vektörü transfekte edilerek verim belirlendi. Bir sonraki gün besiyerleri vektör antibiyotik içeren besiyeri ile değiştirildi ve besiyeri değişimi her 3 günde bir tekrarlandı. Rekombinant vektörü içeren hücreler antibiyotik varlığında koloni oluştururken direnç geni taşımayan yani vektör almayan hücreler zaman içerisinde ölecekler kayboldular.

#### 3.4.3.2. Tek Hücre Seçimi ve Klon Eldesi

Transfeksiyon sonunda büyüyen tek hücre koloniler cam silindir içinde birbirilerine karışmayacak şekilde tripsin ile kaldırılarak 300 µl besiyeri içeren 96 kuyucuklu kültür tabaklarına aktarıldı Hücre yoğunluğu % 70'e ulaşıldıktan sonra büyüyen hücreler 3 ml besiyeri içeren kültür tabaklarına aktarıldı (Şekil 3.1.). Bu hücrelerden büyüyen koloniler western blot ile tarandıktan sonra pozitif sonuç veren kolonilerin saklamaları alındı.

Transfeksiyon ve sonrasında tek hücrelerin seçimi ve klon eldesi çalışmaları ile oluşturulan stabil hücre hatları şunlardır:

1. SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup>
2. SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup>-Park2 yabancı ve mutant tip
3. SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup>-GFP-Park2 yabancı ve mutant tip.

**Çizelge 3.7.** Proteinleri immunboyama ile işaretleme prosedürü

<b>Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>Kullanılma Sebebi</b>	<b>Muamele Süresi</b>
% 3'lük formaldehit solüsyonu	Hücreleri sabitlemek	30 dakika
PBS	Hücreleri yıkamak	5 dakika 3 kez
50 mM NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	Serbest Radikalleri söndürmek	5 dakika
PBS	Hücreleri yıkamak	5 dakika 3 kez
% 0.5 Triton X-100	Hücre zar yapısını dejenere etmek	2 dakika
PBS	Hücreleri yıkamak	5 dakika 3 kez
1° Antikor	Proteini işaretleme	40 dakika
PBS	Hücreleri yıkamak	5 dakika 3 kez
2° Antikor	Proteinleri işaretleme	40 dakika
PBS	Hücreleri yıkamak	5 dakika 3 kez
Saf su	PBS kaynaklı tuz kristallerini uzaklaştırmak	5 kez batır-çıkart



Şekil 3.1. Kolonizasyon oluşturan hücrelerin büyük kültür kaplarına aktarılması

### **3.5. Protein Analizleri**

#### **3.5.1. Protein Özütlerinin Hazırlanması**

##### **3.5.1.1. SH-SY5Y Hücrelerinden Protein Özütlerinin Hazırlanması**

Ökaryotik hücrelerden protein özütleri kimyasal ve fiziksel olmak üzere yapılacak çalışma doğrultusunda farklı metodlar ve tamponlar kullanılarak hazırlandı. Kimyasal olarak M-Per<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, ABD), 2DE-Rehidrasyon örnek tamponu (8 M üre, % 2 (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, % 0.2 3-10 ampholyte, % 0.001 bromfenol mavisi) ya da DIGE liziz tamponları (30 mM Tris, 7 M üre, 2 M Thioüre, 5 mM Magnezyum Asetat ve % 4 (w/v) CHAPS pH 8) kullanırken fiziksel olarak 26 G'lik insülin iğnesi, Blut Blander (Next Advance, ABD) cihazı ve 0.1 mm cam boncuklar (Glass Beads Next Advance, ABD) kullanıldı.

İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra PBS varlığında hücre kazıyıcı alet (Scraper, ABD) ile kültür kaplarından kaldırılan hücreler 1500 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edilerek yıkandı. Çöken hücrelere üçe bir oranında (v/w) M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, ABD), 5 mM EDTA ve 1 X proteaz inhibitör kokteyl (Roche, Almanya) eklenip karıştırılarak homojen hale getirildi. 26 G'lik insülin iğnesinden 15 kere geçirilen hücreler 15 000 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı fazda kalan protein özütü LoBind tüplerde alikotlar halinde - 80 °C'de saklandı.

2DE-Rehidrasyon örnek tamponu ya da DIGE amaçlı kullanılan liziz tamponu kullanılarak hücreyi kimyasal yolla patlatma yöntemi, fiziksel yöntem ile birleştirilerek kullanıldı. Hücreler PBS ile yıkanıp çöktürüldükten sonra 2DE-Rehidrasyon örnek tamponu ya da DIGE patlatma tamponları eklenerek karıştırılıp homojen hale getirildi. Hücre yoğunluğunun yarısı kadar 0.1 mm cam boncuk ilave edilerek hücreler Blut Blander ile sırasıyla hız kademesi 8 olacak şekilde 5 dakika ve 5 olacak şekilde 3 dakika + 4 °C'de patlatıldı ve 15 000 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı fazda kalan protein özütü LoBind tüplerde (Eppendorf, ABD) alikotlar halinde - 80 °C'de saklandı.

##### **3.5.1.2. E.coli Hücrelerinden Protein Özütlerinin Hazırlanması**

Uygun besiyerinde kültüre edilen *E. coli* hücreleri iki kez soğuk PBS ile 3500 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edilerek yıkandıktan sonra çöken hücreler çalışılacak tampon çözelti ile çözüldü ve 1 X proteaz inhibitör kokteyl (Roche, Almanya) eklenip karıştırılarak homojen hale getirildi. Protein aktivitesinin azalmaması için buz üzerinde

çalışıldı. Ultra sonikatör (Bendelin Sonoplus HD 220, Berlin) ile 15 saniye 6 kez % 50 güç uygulanarak sonik dalgalar yardımı ile bakteri hücreleri parçalandı. Parçalanmış hücre özütleri 15 000 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edilerek sıvı fazda kalan protein özütü LoBind tüplerde alikotlar halinde - 80 °C'de saklandı.

### **3.5.1.3. Nüklear ve Sitoplazmik Protein Özütlerinin Hazırlanması**

İstenilen yoğunluğa ulaşmış hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra PBS varlığında hücre kazıyıcı alet (Scrapper, ABD) ile kültür kaplarından kaldırılan hücreler 1500 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edilerek yıkandı. Çöken hücrelere 500 µl soğuk CREB (cytoplasmic protein extraction buffer), 5 mM EDTA ve 1 X proteaz inhibitör kokteyl (Roche, Almanya) eklenip karıştırılarak homojen hale getirildi. Tüp buz üzerinde 30 dakika bekletildi ve süre sonunda 21 G'lik insülin iğnesinden 15 kere geçirildi. Temiz bir lam üzerine patlatılan hücrelerden çok küçük bir miktar konularak mikroskopta incelendi ve hücre çekirdekleri gözlemlenir. Parçalanmış hücre özütleri 1 000 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı fazda kalan protein özütü LoBind tüpe alınarak stoplazmik protein olarak işaretlendi. Tüpün dibinde kalan nüklear çökelti üzerine 250 µl soğuk CREB eklenerek nazikçe karıştırıldı ve 1 000 xg'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı fazda kalan kısım atıldı ve dipte kalan çökelti 500 µl PSB (Protein Solubilization Buffer) ile homojen hale getirildi ve oda ısısında 16 000 xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Sıvı fazda kalan protein özütü LoBind tüpe alınarak nüklear protein olarak işaretlendi ve alikotlar halinde - 80 °C'de saklandı.

### **3.5.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Lowry Assay)**

Protein miktarını ölçmek için değiştirilmiş Lowry assay (Lowry et al., 1951) olarak bilinmekte olan ve BioRad tarafından RC-DC protein assay adı altında ticari olarak kullanıma sunulan Lowry Assay metodu kullanıldı. Ölçülecek protein özütünün 25 µl'sine 125 µl RC Reagent 1 (tongsten içeren folin ajanı) eklenip vorteks ile karıştırılıp oda ısısında 1 dakika bekletildi. Süre sonunda içerisine 125 µl RC Reagent 2 eklenerek 15000 xg'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çökeleğe 127 µl Reagent A' (250 µl DC Reagent A'ya 5 µl DC Reagent S eklenerek hazırlandı) eklendi ve çözülene kadar karıştırıldı. Homojen karışıma 1 ml DC Reagent B eklenip karıştırıldı ve oda ısısında 15 dakika beklendikten sonra Nanodrop (Thermo scientific, ABD) ile 750 nm'de önceden oluşturulmuş standart eğri ile karşılaştırılarak protein konsantrasyonu belirlendi.

### 3.5.3. Protein Saflaştırma

#### 3.5.3.1. Parkin-Exact Tag Yabani Tip ve Mutant Rekombinant Parkin Proteininin Saflaştırılması

Yabani ve mutant formdaki geni içeren pPAL7-Park2 yabani tip ve mutant rekombinant klonları belirledikten sonra protein saflaştırma aşamasına geçildi. İlk aşamada vektörler *E.coli* BL21Kodon+ ekspresyon suşuna elektrotransformasyon ile aktarıldı. Transformasyon için 40 µl hücre ve 100 ng/ µl klon plazmit kullanıldı. Ampisilin (100 µg/ml) ve kloramfenikol (35 µg/ml) içeren MH agar üzerinde büyüyen koloniler tek koloni pasajı ile çoğaltıldı ve 5 ml antibiyotikli LB-broth besiyerine ekilerek 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Büyüyen kültürün 200 µl'si aynı antibiyotikleri içeren 200 ml LB-sıvı besiyerine aktarıldı. Kültürün optik yoğunluğu 600 nm'de 0.5'e ulaştığında ( $OD_{600} \sim 0,5$  (  $2 \times 10^8$  hücre / ml ) ) 100 ml'si indüklenmemiş olarak işaretlenip 3500 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Geride kalan kültüre son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde IPTG eklendi ve 37 °C'de 3 saat daha inkübe edildi. Hücreler 3 500 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Çöken hücreler Profinity eXact Protein Purification System (Bio-Rad, ABD) kitinde bulunan 100 mM sodyum fosfat pH 7.2 yıkama/bağlanma tamponunun 300 µl'si ile çözülerek homojen hale getirildi. Protein aktivitesinin azalmaması için buz üzerinde çalışıldı. Ultra sonikatör (Bendelin Sonoplus HD 220, Berlin) ile 15 saniye 6 kez % 50 güç uygulanarak sonik dalgalar yardımı ile bakteri hücreleri parçalandı. Parçalanmış hücre özütleri 15 000 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edilerek üst kısım temiz bir tüpe alınan işlenmemiş protein özütü saflaştırma çalışmaları için kullanıldı. Saflaştırma çalışması için Profinity eXact Mini Spin kolonu kullanıma hazırlandı. Kolonlar 500 µl 100 mM sodyum fosfat pH 7.2 yıkama/bağlanma tamponunun ile iki kez yıkandıktan sonra 300 µl işlenmemiş protein özütü kolona eklenerek 5 saat + 4 °C'de rocking platformda proteinin kolona bağlanması sağlandı. Kolona bağlanmayan enzim uzaklaştırıldıktan sonra kolon iki kez 500 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Kolona bağlanan enzimi saf olarak kolondan ayırmak için 200 µl içerisinde 0.1 M sodyum florid pH 7.2 bulunan 100 mM sodyum fosfat pH 7.2 tamponu kullanıldı. Birkaç kere tekrar eden kolondan ayırma işleminden sonra elde edilen fraksiyonlar protein jel elektroforezinde yürütüldü ve western blot taraması yapıldı.

### 3.5.3.2. Parkin-MBP Tag Yabani Tip ve Mutant Rekombinant Parkin Proteininin Saflaştırılması

Yabani ve mutant formdaki geni içeren pMal-c4X-Park2 yabani tip ve mutant rekombinant klonları belirledikten sonra protein saflaştırma aşamasına geçildi. Transformasyon için 40 µl hücre ve 100 ng/µl klon plazmit kullanıldı. Ampisilin (100 µg/ml) ve kloramfenikol (35 µg/ml) içeren MH agar üzerinde büyüyen koloniler tek koloni pasajı ile çoğaltıldı ve 5 ml antibiyotikli zengin sıvı besiyerine ekilerek 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Büyüyen kültürün 200 µl’si aynı antibiyotikleri içeren 200 ml zengin sıvı besiyerine aktarıldı. Kültürün optik yoğunluğu 600 nm’de 0.5’e ulaştığında ( $OD_{600} \sim 0,5$  ( $2 \times 10^8$  hücre/ ml) son konsantrasyonu 0,3 mM olacak şekilde IPTG eklendi ve 37 °C’de 3 saat daha inkübe edildi. Hücreler 3 500 xg’de 15 dakika + 4 °C’de santrifüj edildi. Çöken hücreler 200 µl kolon tamponu (20 mM Tris.HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT ve 100 µM ZnSO<sub>4</sub>) ile çözülerek homojen hale getirildi. Protein aktivitesinin azalmaması için buz içerisinde çalışıldı. Ultra sonikatör (Bendelin Sonoplus HD 220, Berlin) ile 15 saniye 6 kez % 50 güç uygulanarak sonik dalgalar yardımı ile bakteri hücreleri parçalandı. Parçalanmış hücre özütleri 15 000 xg’de 15 dakika + 4 °C’de santrifüj edilerek üst kısım temiz bir tüpe alınan işlenmemiş protein özütü saflaştırma çalışmaları için kullanıldı. Saflaştırma çalışması için pMal™ Protein Fusion and Purification System (New England BioLabs, ABD) içerisinde bulunan amiloz rezin kullanıma hazırlandı. Amiloz rezinin 200 µl’si 500 µl kolon tamponu ile iki kez yıkandıktan sonra 200 µl işlenmemiş protein özütü ve 200 µl kolon tamponu kolona eklenerek 30 dakika + 4 °C’de rocking platformda proteinin kolona bağlanması sağlandı. Kolona bağlanmayan enzim uzaklaştırıldıktan sonra kolon iki kez 500 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Kolona bağlanan enzimi saf olarak kolondan ayırmak için 200 µl içerisinde % 20 sükröz bulunan kolon tamponu kullanıldı ve oda ısısında 15 dakika rocking platformda bekletildi. Birkaç kere tekrar eden kolondan ayırma işleminden sonra elde edilen fraksiyonlar protein jel elektroforezinde yürütüldü ve western blot taraması yapıldı.

### 3.5.4. Western Blotlama

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra jel nitroselüloz / PVDF membrana transfer edilerek hedef protein için analiz edildi. Western Blot için yarı kuru transferi sağlayan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponunun



içerisine alınarak 10 dakika bekletildi. Süre sonunda sırasıyla iki kat Whatman kağıdı, membran, 7 cm'lik jel ve tekrar iki kat Whatman kağıdı şeklinde sıralandı ve 15 V sabit voltajda 30 dakikada süreyle uygulandı. Transfer sonunda membran üzerindeki proteinler Ponceau S ile boyanarak transfer verimi kontrol edildi. Saf su ile Ponceau S boyası uzaklaştırıldıktan sonra membran % 5 bloklama tamponu ile oda ısısında 1 saat çalkalanarak bloklandı. Süre sonunda membran 3 kez TBST solüsyonu ile (15 dk, 5 dk, 5 dk) çalkalanarak yıkandı. Membran üreticinin tavsiye ettiği oranda TBST içerisinde hazırlanan birincil antikör (Çizelge 3.8.) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda membran 3 kez TBST solüsyonu ile (15 dk, 5 dk, 5 dk) çalkalanarak yıkandı. İkincil antikorda (Çizelge 3.8.) belli oranda TBST içerisinde hazırlandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran 3 kez TBST solüsyonu ile (15 dk, 5 dk, 5 dk) çalkalanarak yıkandı. Görüntüleme yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans metodu (Life Science Inc. ABD) kullanıldı. Bunun amaçla eşit oranda alınan Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi (Bio-Rad, ABD) karıştırılarak membran üzerine yayıldı ve membran yüzeyine teması sağlandı. Fazla sıvı bir peçete ile emildi ve membran plastik stretch film ile sarılarak Hypercassette (Amersham, Biosciences) içerisine yerleştirildi. Karanlık odada membran üzerine oluşan ışığı algılayabilecek bir hiper duyarlı X-ray filmi yerleştirildi ve sinyalin film üzerine yansımaları için bir süre bekletildi. Daha sonra oluşan sinyal, film 3 dakika HyperFilm developer solüsyonunda, 30 saniye saf suda ve 1 dakika HyperFilm fiksleme solüsyonunda yıkandıktan sonra görünür hale getirildi.

### **3.5.5. *In Vitro* Ubikuitinasyon Assay**

Yabani ve mutant MBP-Parkin füzyon proteininin E3 ubikuitin ligaz aktivitesini belirlemek için ubikuitinasyon assay reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon karışımını hazırlamak için kullanılan enzimler, tamponlar ve kimyasalların bazıları Boston Biochem (ABD) firmasından tedarik edildi. Ubikuitinasyon reaksiyon tampon çözeltisi 50 mM Tris.HCl pH 8.8, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> içermektedir. Reaksiyon için kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.9.'da verilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımının 10 µl'si reaksiyonun hemen başında 0. saat örneği olarak ayrılıp 4 X SDS-PAGE yükleme tamponu ile karıştırılarak kontrol grubu kullanıldı. Reaksiyon karışımının kalan kısmı 32 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler % 12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü, Parkin ve ubikuitin antikoru ile western blot taraması yapıldı

**Çizelge 3.8.** Western Blot analizinde kullanılan antikorların listesi

<b>1° Antikor</b>	<b>2° Antikor</b>
Parkin (PRK8) Mouse, (SantaCruz Biotechnology, ABD)	Rabbit anti-Mouse (Bio-Rad, ABD)
Aktin (C-2), Mouse, (SantaCruz Biotechnology, ABD)	Rabbit anti-Mouse
Ubiquitin, Rabbit, (Cell Signaling, ABD)	Donkey anti-Rabbit (Bio- Rad, ABD)
TetR monoclonal Ab, Mouse, (Clontech, ABD)	Rabbit anti-Mouse
GFP, Mouse (Clontech, ABD)	Rabbit anti-Mouse, Texas Red (Invitrogene, ABD)

**Çizelge 3.9.** *In vitro* Ubikuitinasyon Assay için kullanılan reaksiyon karışımı

<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>Kullanılan Miktarlar</b>	
20 X E1 Enzim solüsyonu (5 µM)	1 µl	Boston Biochem, İngiltere
10 X Ubikuitin solüsyonu (50 mg/ml)	2 µl	Boston Biochem, İngiltere
UbcH7 (E2) (100 µM)	0.5 µl	Boston Biochem, İngiltere
Saf MBP-Parkin protein 1.8 µg/µl	2 µl	Çalışma ürünü
10 X Mg-ATP solüsyonu 10 mM	1 µl	Boston Biochem, İngiltere
Reaksiyon tampon çözeltisi	13.5 µl	Tarafımızca hazırlandı
Toplam	20 µl	

### **3.6. Kullanılan Proteomiks Teknikleri**

#### **3.6.1. 2DE- Jel Elektroforezi**

Ökaryotik hücreler toplanıp protein özütleri hazırlandıktan sonra konsantrasyonu ölçülerek 2DE jel elektroforezi ile ayırma tabi tutuldu. Örneklerin birinci boyuttaki ayırımları 11 cm'lik pH 5-8 IPG stripler (pH 3-10 ve pH 5-8 ReadyStrip, BioRad) kullanılarak yapıldı. Öncelikle her bir örnekten 500 µg protein alınarak toplam hacmi 300 µl olacak şekilde üzerlerine 2DE rehidrasyon örnek tamponu eklendi. Ayrıca bu karışıma son konsantrasyonları % 1 TBP ve % 0.2 amfolit (striplerin pH aralığına uygun) eklenerek örneklerimiz birinci boyutta fokuslanmaya hazır hale getirildi. Örnekler fokuslama kaplarına konularak üzerlerine uygun stripler dikkatlice yerleştirildi. İzoelektrik fokuslama cihazında (IEF cell, BioRad, ABD) bir saat pasif rehidrasyonun ardından striplerin kurummasını ve örneğin buharlaşmasını engellemek amacıyla 2-3 ml kadar mineral yağı eklendi ve gece boyu aktif rehidrasyona (50 V) tabi tutuldu. Rehidrasyon işleminden sonra izoelektrik odaklamaya geçildi. Proteinleri emmiş IPG stripler PROTEAN IEF (BioRad, ABD) odaklama tabakasına alınarak strip üzerindeki proteinler adım adım artan voltaj programı uygulanarak 20 °C' de odaklamaya tabi tutuldu (250 volt: 20 dk, 4000 volt: 2 saat lineer, 4000 volt: 2,5 saat, hızlı ve toplamda 14 kilowatt/saat gücünde). Fokuslama sonrasında stripler 2DE stripleri yıkama tamponu I (6M üre, 0.375M Tris.HCl pH8.8, % 2 SDS, % 20 gliserol, % 2 (w/v) DTT) ve 2DE stripleri yıkama tamponu II (6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, % 2 SDS, % 20 gliserol, % 2.5 (w/v) iodoasetamid) çözeltileri içerisinde 30 dakika süreyle yıkandı. % 12 SDS poliakrilamid jellere yerleştirilerek elektroforeze tabi tutuldu (35 mA 30 dk, 48 mA 5 saat + 16 °C'de). Elektroforez sonrasında proteinler % 40 metanol, % 10 asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edildi ve SyproRuby (BioRad, ABD) boyası içerisinde gece boyu boyandı. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi. Jellerin analizleri PDQuest Advanced programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter otomatize robotik sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi.

#### **3.6.2. Difference Gel Electroporesis (DIGE)**

SH-SY5Y hücrelerinden protein özütleri DIGE liziz tamponu ve cam boncuklar yardımı ile hazırlandı. DIGE öncesi protein özütlerinin pH'ları pH kâğıtları kullanılarak 8'e ayarlandı. Proteinleri Cy2, Cy3 ya da Cy5 flouresan boyalar ile işaretlemek için CyDye DIGE Fluor Cy5 Labeling Kit (GE Healthcare, ABD) kullanıldı. Stok 400 pmol/µl

hazırlanan boya ların 1 µl'si 100 µg protein ile karıştırıldı ve karanlıkta buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Süre sonunda son konsantrasyonu 10 µmol olacak şekilde lizin eklenerek reaksiyon durduruldu ve karanlıkta buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Örneklerin üzerine hacmi kadar DIGE 2 X örnek tamponu (8 M üre, 130 mM DTT, 4 % w/v CHAPS, 2 % w/w amfolit) eklendi ve karanlıkta buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Aynı jel üzerinde yürütmeyi planladığınız farklı flouresan boyalar ile işaretlenmiş örnekler karıştırıldı. Bu aşamadan sonra rutin fokuslama ve 2DE protokolü takip edildi.

### **3.6.3. 2DE-Temelli Fosfoproteomiks**

Hücre kültürlerinin yoğunlukları % 75'e ulaştığında yabani ve mutant Parkin proteininin sentezlenebilmesi için ortama 1 µg/ml tetrasiklin ilavesi yapıldı. 24 saat süren inkübasyon sonrasında hücreler soğuk PBS ile 3 kez yıkandı ve 50 nM serin/treonin fosfotaz inhibitörü olan kalikulin A eklenmiş serum içermeyen besiyerinde 45 dakika inkübe edildi. Fosfoproteomiks çalışması için yukarıda anlatıldığı gibi DIGE patlatma tamponu ve 0.1 mm cam boncuklar kullanılarak protein özütleri yapıldı. Yukarıdaki tarif edilen protokole ek olarak DIGE patlatma tamponuna % 1 fosfotaz inhibitör kokteyl 2 ve 3 (Sigma Aldrich, ABD) eklendi. Birinci ve ikinci boyutta ayrımlar için rutin 2DE protokolü takip edildi. Birinci boyutta 1 mg/ml protein özütü 11 cm, pH 5-8 striplere emdirilerek ayrıldı. İkinci boyut ayırım için ise 11 cm % 12 Bis-Tris Criterion XT Precast jeller kullanıldı. Fosfoproteomiks çalışmalarında moleküler ağırlık standardı olarak PeppermintStick Fosfoprotein (Molecular Probes, ABD) kullanıldı.

#### **3.6.3.1. Fosfoproteinlerin Pro-Q Dimond ile Boyanması**

İkinci boyutta ayırımdan sonra jeller özel boyama kaplarına alınarak detayları Çizelge 3.10.'da verilen Pro-Q Dimond boyama prosedürü uygulandı. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi. Jellerin analizleri PDQuest Advanced programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter otomatize robotik sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.10.** Fosfoproteinlerin Pro-Q Diamond boyası ile boyanma prosedürü

	<b>Kullanılan Kimyasal Çözeltiler</b>	<b>Tris-Glisin Jelleri İçin</b>
Adım 1: Fiksasyon	% 50 Metanol % 10 asetik asit	100 ml, 30 dakika 100 ml, gece boyu
Adım 2: Yıkama	Ultra saf su	100 ml, 10 dakika 3 kez
Adım 3: Boyama	Pro-Q Dimond boyası	60 ml, 60-90 dakika
Adım 4: Boyanın çıkarılması	% 20 Asetonitril 50 mM sodyum asetat pH4	80-100 ml, 30 dakika 3 kez
Adım 5: Yıkama	Ultra saf su	100 ml, 5 dakika 2 kez

### 3.6.4. Jel İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi (In-Gel Digestion)

SyproRuby boyası ile boyanmış protein bantları poliakrilamid jelden Spot-cutter otomatize robotik sistem (BioRad, ABD) ile kesilerek 96 kuyucuklu kesim tabaklarına yerleştirildi. 96 kuyucuklu kesim tabaklarından alınarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınan jel parçaları 500 µl % 40 asetonitril ve % 60 amonyum bikarbonat (50 mM pH 8.0) çözeltisi ile 15 dakikalık periyotlarla jel parçaları renksiz hale gelene kadar yıkandı. Temizleme çözeltisi pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve jellerin üzerine dehidrasyonu sağlamak amacı ile 200 µl asetonitril eklenerek jeller oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda solüsyon pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve jeller speed-vakum cihazı ile sıvı kısım uzaklaşana kadar 50 °C'de 2 500 xg hızda çevrilerek kurutuldu. Protein redüksiyonu için jellerin üzerine 100 µl 10 mM DTT eklendi ve 80 °C'de 30 dakika bekletildi. Ardından tüplere protein alkilasyonu için 100 µl 50 mM iyodaasetamid eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika karanlıkta bekletildi. Tüplere eklenen DTT ve iyodaasetamitin fazlası bir pipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve jel parçaları iki defa 500 µl 50 mM amonyum bikarbonat ile yıkandı. Yıkama çözeltisi pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Jel parçaları üzerine 200 µl asetonitril eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında dehidre edildi. Asetonitril uzaklaştırılıp jeller speed-vakum cihazı ile 10 dakika 50 °C'de 2 500 xg hızda çevrilerek kurutuldu. Jeller üzerine 200 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklendi ve bu şekilde rehidre olmaları sağlandı. Asetonitril ile dehidrasyon ve amonyum bikarbonat çözeltisi ile rehidrasyon işlemi bir kez daha tekrarlandı. Jel içerisinde sıkışmış halde bulunan proteinleri peptitlerine ayırabilmek için jel üzerine 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde hazırlanmış son konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde 50 µl tripsin solüsyonu eklendi ve jeller gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. Tüm gece süren tripsinizasyon sonrası tüpler 15 saniye yüksek hızla çevrildi. İçerisine 50 µl % 1 formik asit ve % 2 asetonitrilden oluşan ekstraksiyon çözeltisi eklendi ve vorteks ile 30 dakika boyunca karıştırıldı. Sıvı kısım temiz bir tüpe alınarak speed-vakum cihazı ile yaklaşık 30 dakika 45 °C'de 2 500 xg hızda çevrilerek kurutuldu. Çökelek 5 µl % 1 formik asitte çözülerek analize hazır hale getirildi.

### 3.7. Analizlerde Kullanılan Programlar

*Park2* geni istenilen vektörlere rekombinant DNA teknolojisi kullanarak klonladıktan sonra dizilendi ve dizilenen genin analizi Chromos (Current Version: 1.6, Technelysium, İngiltere) programı kullanılarak yapıldı. Clustel W programı ile ise yabancı tip ve mutant Parkin proteinleri amino asit düzeyinde karşılaştırılarak analiz edildi (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). ConSurf analizi ile Parkin proteininin domainleri üzerinde bulunan aminoasitlerin renklere yansıtılmış kodlanmış modeli oluşturuldu. Oluşturulan vektör haritaları ve primerler Vector NTI (İnvitrogen, ABD) programı ile dizayn edildi. Western blot analiz sonuçları ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, ABD) programı kullanılarak oluşturuldu. 2DE Jellerin analizlerinde PDQuest Advanced programı (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Peptitler jellerden izole edilip tripsin enzimi ile kesildikten sonra LC-MS/MS cihazı (Waters Inc., ABD) ile belirlendi. Protein tanımlamalarında Uniport veribankası kullanıldı ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Belirlenen proteinler Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) ve Mascot programı ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) kullanılarak hastalık ile ilişkilendirildi ve analiz edildi. Kononikal yolak analizi (2000-2012 Ingenuity Systems, Inc., ABD) sonucu regüle olan proteinlerin ilişkilendirildiği yolaklar tespit edildi.



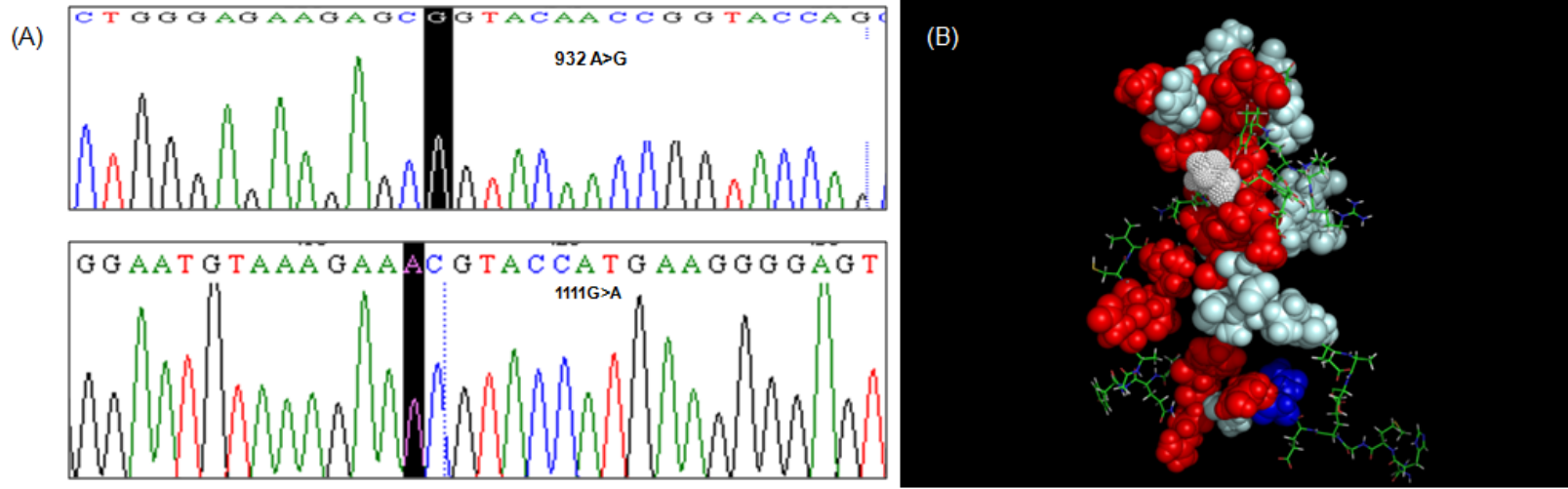
## 4. BULGULAR

### 4.1. Yabani ve Mutant Parkin Proteinlerinin Hücre Kültüründe İfade Edilmesi

#### 4.1.1. Mutant *Park2* Geninin Eldesi

*Park2* geninde mutasyon taşıyan örnek 2006-2009 yılları arasında yapılmış 104S217 nolu Tübitak projeye başvuran genç bir Parkinson hastasının *park2* genine ait mutant bir formudur (Kasap ve ark., 2009). Genin dizi ve mutasyon analizleri Kasap ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada ayrıntılı olarak verilmiştir. Kısaca, hastanın tam-boy çoğaltılmış *Park2* geninde üç adet sessiz mutasyon [429 (C > T), 513 (G >A) ve 667 (C > T)], ve iki adet yanlış anlamlı mutasyon [932 (A >G); Gln311→Arg ve 1111 (G > A); Ala371 →Thr] saptanmıştır. Özellikle yanlış anlamlı mutasyonların protein üzerindeki lokasyonlarına bakıldığında bu mutasyonların IBR domaininde oldukları görülmüştür. Bu mutasyonların Parkin üzerinde evrimsel açıdan korunmuş amino asitleri değiştirip değiştirmediğini anlayabilmek için gerçekleştirilmiş olan ConSurf analizi (Kasap ve ark., 2007) ve modelleme çalışmalarında mutasyonlardan birinin korunmuş bölgede (Q311R) diğerinin ise değişken bölgede (A371T) oldukları görülmüştür (Şekil 4.1.). Korunmuş bölgede olan amino asit değişimi pozitif yüklü bir amino asidin (Q) pozitif yüklü bir aminoaside (R) değişimi iken değişken bölgedeki amino asit değişimi hidrofobik küçük bir amino asidin (A) polar yüksüz büyük bir amino aside (T) değişimi şeklinde olmuştur. Parkin üzerindeki mutasyonların % 50 (Lucking et al., 2000) kadarının hastalıkla ilişkilendirildiği düşünülecek olunursa sorulacak sorulardan bir tanesi Q311R ve A371T çift mutasyonların hastalıkla ilişkili olup olmayacağının belirlenmesidir.

Ancak elimizde yabani tip *Park2* genine ait herhangi bir klon, dizi analizi datası bulunmamaktaydı. Bu amaçla sağlıklı genç bir bireyden kan alarak lökositlerinden tam boy yabani tip *Park2* gen formu elde edildi ve dizi analizi yapıldı. Çalışmanın detayları ve elde edilen sonuçların analizi aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Mutant Parkin proteinindeki mutasyonların Chromos (Current Version: 1.6, Technelysium, İngiltere) programı ile gösterimi ve ConSurf analizi. A. İşlenmemiş DNA dizi analizi datası ve Parkin proteininde belirlenmiş yanlış anlamalı mutasyonlar. B. Parkin proteininin ConSurf analiz sonuçlarının Parkin IBR domaini üzerine yansıtılmış renklerle kodlanmış modeli. Beyaz diziler yüksek oranda değişken iken kırmızı diziler yüksek oranda korunmuştur. Mavi dizi korunmuş bölgede bulunan Gln 311 >Arg mutasyonunu gösterirken, beyaz tırtıklı dizi yüksek oranda değişken bölgede bulunan Ala 371 >Thr mutasyonunu göstermektedir (Kasap ve ark., 2007)

#### **4.1.2. Yabani Tip *Park2* Geninin Eldesi, Agaroz Jelde Görüntülenmesi ve Dizi Analizi**

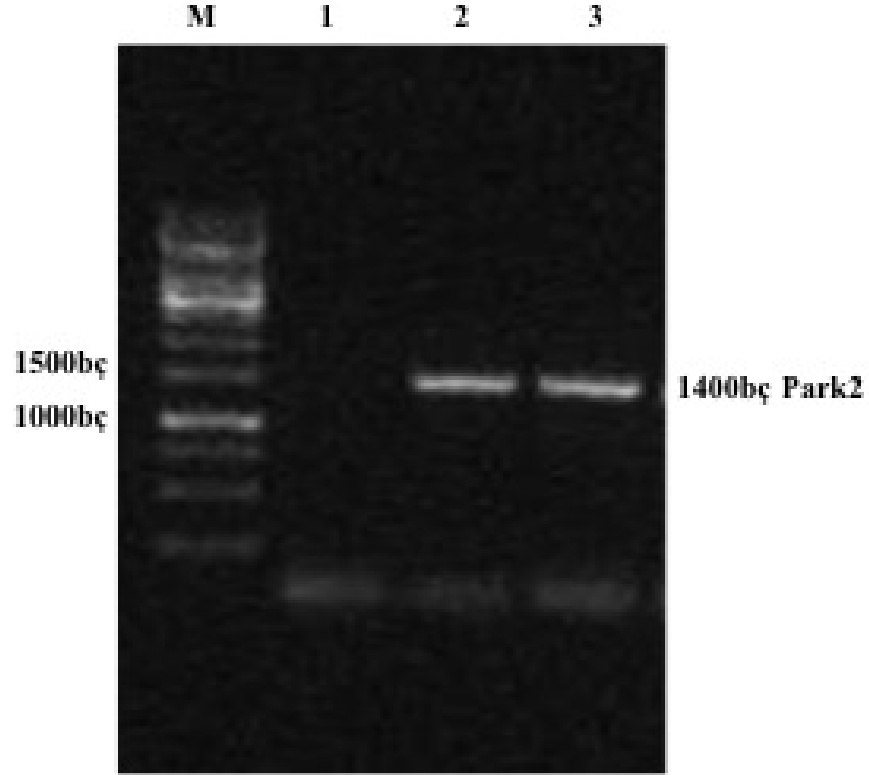
Ticari olarak satılan RNA izolasyon kiti (Qiagen, ABD) ile sağlıklı bireyin lökositlerinden tüm RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyondan hemen sonra tüm RNA'lar oligodT ve random hexamer primer karışımı kullanılarak cDNA'ya (Fermentas, ABD) çevirildi. cDNA'ları kalıp olarak kullanıldı ve tasarladığımız spesifik Parkin primerleri kullanılarak tam boy *Park2* genini çoğaltabilmek için PZR reaksiyonu kuruldu. Elde edilen *park2* gen ürünü agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.2.). Sağlıklı bireye ait PZR ürünü PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile temizlenerek dizi analizi için ticari bir firmaya (İontek İnc, Türkiye) gönderildi.

Dizilenen yabani tip *Park2* nükleotid dizisi in siliko olarak protein dizisine çevrildi, çoklu dizi analizi programı kullanılarak önceden tarafımızca bulunmuş olan mutant dizi ile karşılaştırıldı ve farklılıklar kutu içerisinde gösterildi (Şekil 4.3.).

Sonuç olarak sağlıklı bireyden elde edilen yabani tip *Park2* geninde herhangi bir mutasyon belirlenmedi ve çalışmalarımızda bu gen ürünü mutant forma karşı kontrol olarak kullanıldı.

#### **4.1.3. Yabani Tip *Park2* PZR Ürününün pCR2.1-TOPO Vektörüne Klonlanması**

Amacımız kontrollü ekspresyon yapabilmek için yabani tip *Park2*'yi pCDNA4/TO vektörüne klonlamaktı. Her ne kadar PZR için dizayn ettiğimiz primerler EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimlerinin tanıyacağı kesim bölgeleri içerse de bunların test tüpü içerisinde çift enzim ile kesilmesi ve kesilen ürünün klonlanması deneylerinde başarısız olundu. Bundan dolayı yabani tip *Park2* geni PZR ile çoğaltıldıktan sonra öncelikli olarak pCR2.1-TOPO vektörüne klonlandı daha sonra buradan aşağıda detayı anlatıldığı gibi pCDNA4/TO vektörüne alt klonlama yapıldı. pCR2.1-TOPO vektörünü kullanmak; çift enzim kesiminin başarılı bir şekilde olduğunu doğrulamak ve diğer vektörlere alt klonlama yapmak açısından işimizi kolaylaştırdı. Oluşturulan rekombinant plazmite pCR2.1-TOPO-Park2 yabani tip adı verildi. Klonu doğrulamak amaçlı yapılan restriksiyon enzim kesim reaksiyonu agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 4.4.).



**Şekil 4.2.** *Park2* genini içeren PZR ürününün agaroz jel görüntüsü M. DNA belirteci (1kb DNA ladder Fermentas, ABD), 1. Negatif Kontrol, 2. PZR ürünü mutant *Park2* geni, 3. PZR ürünü yabani tip *Park2* geni

```

Parkin      MIVEVRFNSSHGFFVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGV PADQLRVIFAGKELRNDWTVQNC D 60
Mutant      MIVEVRFNSSHGFFVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGV PADQLRVIFAGKELRNDWTVQNC D 60
*****

Parkin      LDQQSIVHIVQRPWRKQEMNATGGDDPRNAAGGCEREPQSLTRVDLSSSVLPGDSVGLA 120
Mutant      LDQQSIVHIVQRPWRKQEMNATGGDDPRNAAGGCEREPQSLTRVDLSSSVLPGDSVGLA 120
*****

Parkin      VILHTDSRKDSPAGSPAGRSIYNSFYVYCKGPCQRVQPGKLRVQCSTCRQATLTLTQGP 180
Mutant      VILHTDSRKDSPAGSPAGRSIYNSFYVYCKGPCQRVQPGKLRVQCSTCRQATLTLTQGP 180
*****

Parkin      SCWDDVLI PNRM SGECQSPHCPGTSAEFFFKCGAHPTSDKETSVALHLIATNSRNITCIT 240
Mutant      SCWDDVLI PNRM SGECQSPHCPGTSAEFFFKCGAHPTSDKETSVALHLIATNSRNITCIT 240
*****

Parkin      CTDVRSFVLVFCNSRHVICLDCFHLYCVTRLNDRQFVHDPQLGYSLPCVAGCPNSLIKE 300
Mutant      CTDVRSFVLVFCNSRHVICLDCFHLYCVTRLNDRQFVHDPQLGYSLPCVAGCPNSLIKE 300
*****

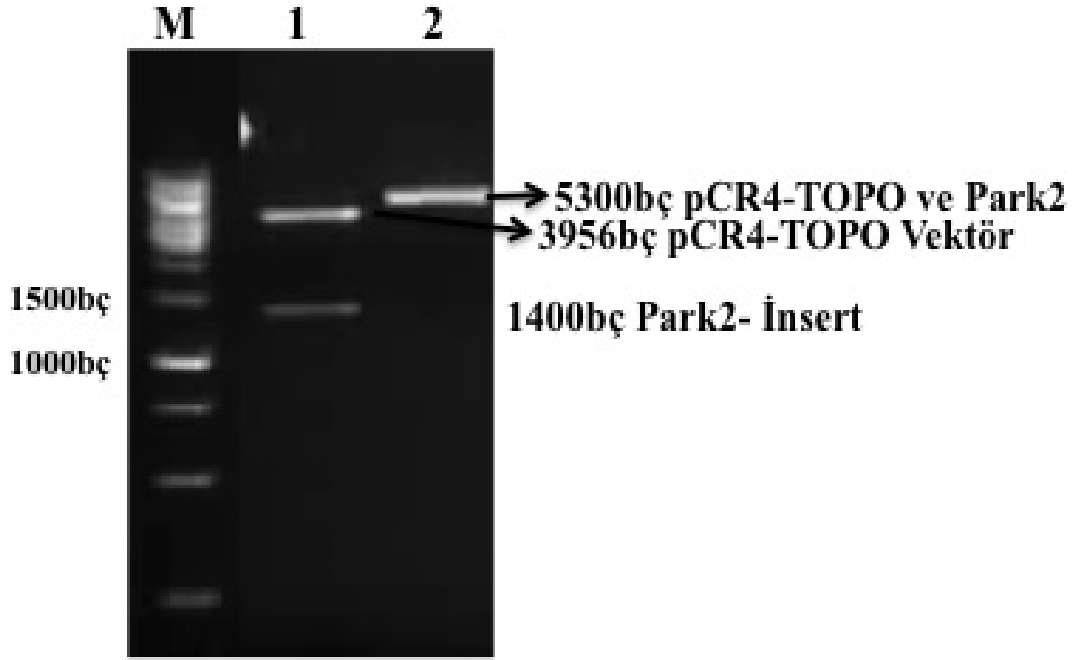
Parkin      LHHFRILGEEQYNRYQQYGAECCVLQMGVLCPRPGCGAGLLPEPDQRKVTCEGGNGLGC 360
Mutant      LHHFRILGEEQYNRYQQYGAECCVLQMGVLCPRPGCGAGLLPEPDQRKVTCEGGNGLGC 360
*****:*****

Parkin      GFAFCRECKEAYHEGEC SAVFEASGTTTQAYRVDERAAEQARWEAASKETIKKTKPCPR 420
Mutant      GFAFCRECKEAYHEGEC SAVFEASGTTTQAYRVDERAAEQARWEAASKETIKKTKPCPR 420
*****:*****

Parkin      CHVPEKNGGCMHMKCPQPQCRLEWCWNCGEWNRVCMGDHWF DV 465
Mutant      CHVPEKNGGCMHMKCPQPQCRLEWCWNCGEWNRVCMGDHWF DV 465
*****

```

**Şekil 4.3.** Clustel W analizi sonucu yabancı tip ve mutant Parkin protein dizilerinin karşılaştırılmalı analizi. Kutu içerisine alınan diziler Gln 311 >Arg ve Ala 371 >Thr değişimleridir (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).



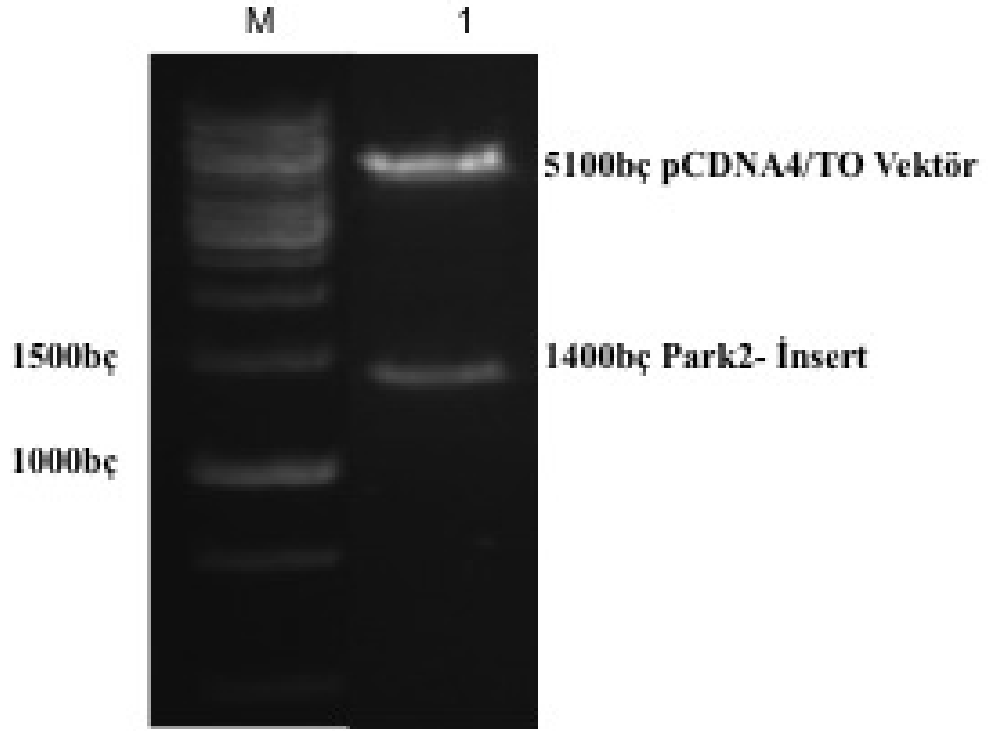
**Şekil 4.4.** pCR2.1-TOPO-Park2 yabancı tip rekombinant vektörün EcoRI ve SacI enzimleri kesimi agaroz jel görüntüsü M. DNA belirteci (1kb DNA ladder Fermentas, ABD), 1. pCR2.1-TOPO-Park2 yabancı tip klon EcoRI kesimi, 2. pCR2.1-TOPO-Park2 yabancı tip klon SacI kesimi

#### 4.1.3.1. Yabani Tip *Park2* Geninin pCDNA4/TO Vektörüne Alt-Klonlanması

pCR2.1-TOPO-*Park2* yabani tip rekombinant plazmiti EcoRI ve BamHI enzimi ile kestikten sonra elde edilen *park2* gen ürünü agaroz jelden izole edildi ve izolasyon ürünü aynı enzimler ile kesilen pCDNA4/TO vektörüne klonlandı. Oluşturulan bu yeni rekombinant vektöre ise pCDNA4/TO-*Park2* yabani tip adı verildi (Şekil 4.5.). *Park2* genine ait mutant formun klonunu ise (pCDNA4/TO-*Park2* mutant) Kasap ve arkadaşları tarafından yukarıda bahsettiğimiz gibi 104S217 nolu TÜBİTAK projesinde oluşturulmuştur.

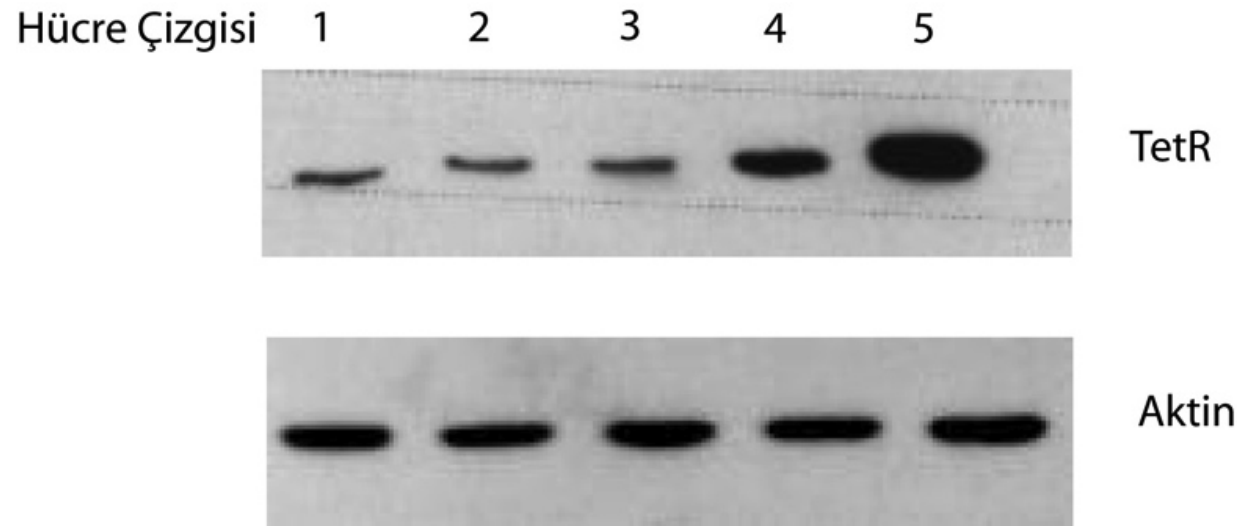
#### 4.1.4. SH-SY5Y TetR<sup>+</sup> Stabil Hücre Hattının Oluşturulması

Çalışmalarımızda memeli hücrelerinde tetrasiklin kontrolü altında gen ekspresyonuna izin veren T-REx sistemi (İnvitrogen, ABD) kullanıldı. Bu sistemi kullanarak geliştirilen hücre hatlarında herhangi bir proteinin hücre üzerindeki etkisi karşılaştırmalı olarak çalışılabilir. Bunun için protein eksprese edilmeden önce ve eksprese edildikten sonra hücre örnekleri almak yeterli olmaktadır. Ancak SH-SY5Y hücrelerinin T-REx sistemi ile uyumlu TetR<sup>+</sup> hücre hattı ticari olarak satılmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda TetR<sup>+</sup> kararlı hücre hattı oluşturuldu. TetR<sup>+</sup> hücre hattı oluşturmak için TetR represör proteinini kodlayan pCDNA6/TR vektörünü kullanıldı. Öncelikli olarak pCDNA6/TR vektörü *E.coli* hücrelerinde çoğaltıldı, endotoksin içermeyecek şekilde hazırlandı ve SH-SY5Y hücrelerine transfekte edildi. Bu vektör üzerinde blastasidin direnç geni taşıdığı için transfeksiyon sonrası alındığı hücrelere blastasidin direnci kazandırmaktadır. Ancak vektörü alan her hücre almış olduğu vektörü genomuna entegre edememektedir. Bu nedenle transfeksiyon sonrasında hücreler blastasidin ile bir seçime tabi tutuldu ve sadece vektörü alıp genomuna entegre eden hücreler kültür tabakları içerisinde büyümelerini sürdürebildi. Yeterince zaman verildikten sonra büyüyen hücreler koloni oluşturdular. Bu koloniler daha büyük kültür tabaklarına alınarak TetR proteinini eksprese edip etmedikleri açısından test edildiler. Seçilen koloniler arasında koloni # 5'in TetR proteinini yüksek seviyede eksprese ettiği görüldü (Şekil 4.6.). Oluşturulan bu yeni hücre çizgisine TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y adı verildi. Bu hücre hattı çoğaltıldı, pasajlandı ve saklamaları alınarak laboratuvarımızın envanterine kazandırıldı.



**Şekil 4.5.** pCDNA4/T-Park2 yabani tip rekombinant vektörün EcoRI ve BamHI enzimleri kesimi agaroz jel görüntüsü. M. DNA belirteci (1kb DNA ladder Fermentas, ABD), 1. pCDNA4/TO-Park2 yabani tip klon





**Şekil 4.6.** Farklı hücre hatlarının TetR antikoruna ile western blot taraması

#### **4.1.5. SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup>-Park2 Yabani Tip ve Mutant Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması**

Oluşturulan TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y hücreleri bir sonraki aşamada Parkin proteinini kontrollü eksprese eden stabil hücre hattı oluşturmak için kullanıldı. Bu amaç için pcDNA4/TO-Park2 yabani tip ve mutant rekombinant vektörleri kullanıldı. Bu vektörler *E.coli* hücresinde çoğaltıldı, endotoksin içermeyecek şekilde hazırlandı ve TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y hücrelerine transfekte edildi. pCDNA4/TO vektörü üzerinde zeosin geni taşıdığı için transfeksiyon sonrası alındığı hücelere zeosin direnci kazandırmaktadır. TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y hücrelerinin blastasidin direncine, pCDNA4/TO vektöründen gelen zeosin direnci de eklenince hücre seçimi bu iki antibiyotik ile yapıldı. Beş haftalık süre boyunca kültür tabaklarında büyüyen ve ölen hücrelerin durumu ve koloni oluşturmaları mikroskop ile takip edildi (Şekil 4.7.).

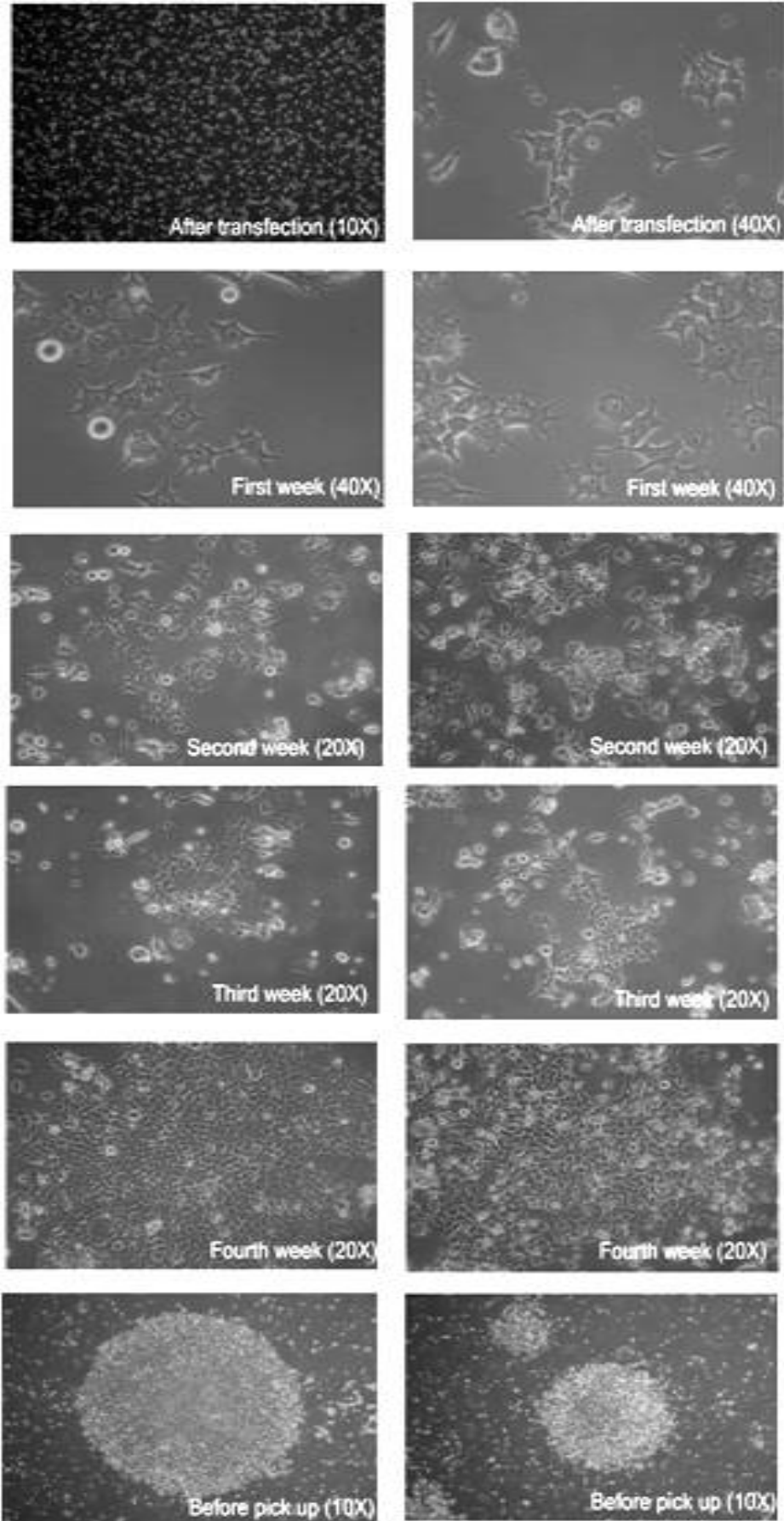
Büyüyen kolonilerden hangilerinin yabani tip ve mutant formdaki Parkin'i sıkı bir kontrol altında eksprese ettiği bilinmediğinden koloniler tek tek Parkin ekspresyonu için tarandı. Bu sistemin çalışma prensibi tetrasiklin kontrolüne bağlıdır. Büyüme besiyerine tetrasiklin eklenmediği sürece Parkin eksprese edilmezken ortama tetrasiklin eklendiğinde Parkin eksprese edilmektedir. Parkin antikoru ile western blot taraması sonucunda en yüksek seviyede ve en kontrollü Parkin ekspresyonunu yapan koloniler seçildi ve bu yeni hücre çizgilerine SH-SY5Y-PARK2 mutant ve SH-SY5Y-PARK2 yabani tip adı verildi. Bu hücre hatları çoğaltıldı, pasajlandı ve saklamaları alınarak laboratuvarımızın envanterine kazandırıldı (Şekil 4.8.).

#### **4.2. Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerinin Karakterizasyonu**

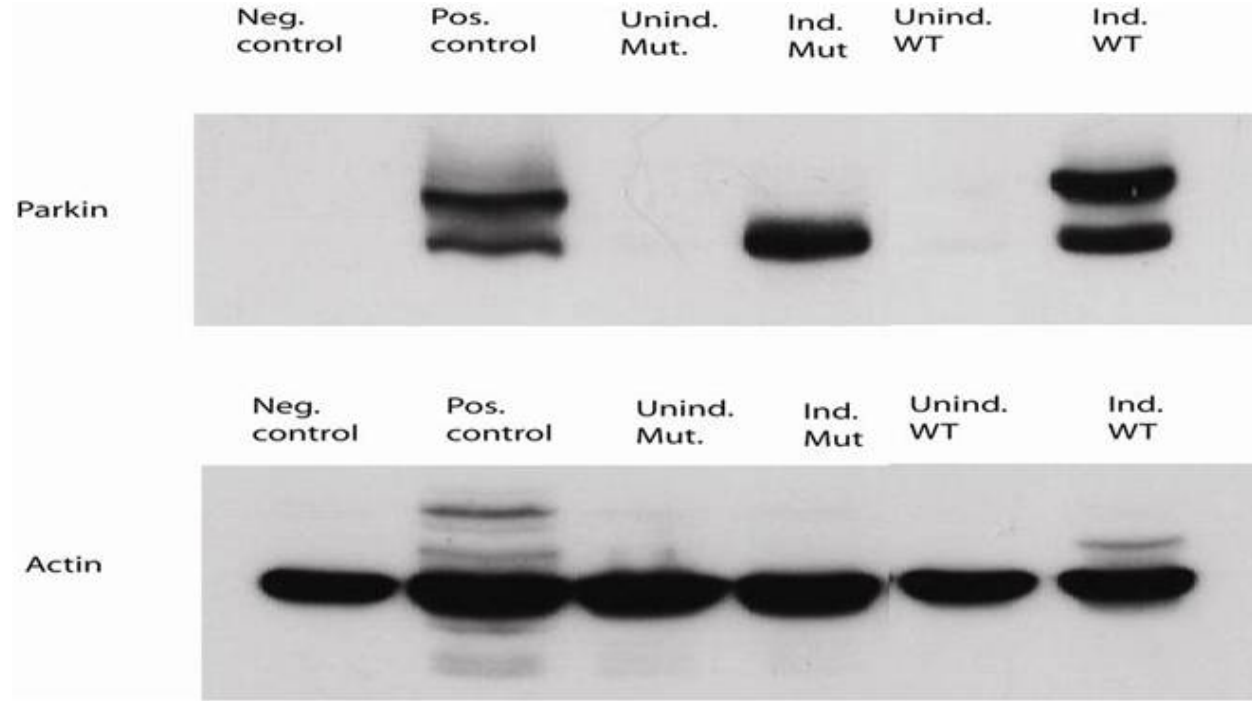
Parkin proteini üzerindeki mutasyonların proteinin fonksiyonunu nasıl etkilediğini, mutant formun yabani tip forma göre ne gibi farklılıklar gösterdiğini ve PH oluşumunda etken faktör olup olmadığını anlayabilmek için moleküler seviyede karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

##### **4.2.1. Yabani ve Mutant Tip Parkin Proteinlerinin Post-Translasyonel Modifikasyonları**

Hücrelerde yapılan Parkin ekspresyon analizinde yabani tip forma ait iki adet, mutant forma ait bir adet protein bandı western blot üzerinde görüldü. Bu gözlem Kasap ve



**Şekil 4.7.** SH-SY5Y-PARK2 mutant ve SH-SY5Y-PARK2 yabani tip hücrelerin farklı zamanlarda taranması ve seçilmesi



**Şekil 4.8.** Western blot metodu ile tetrasiklin indüksiyonu öncesi ve sonrası Parkin proteininin yabani tip ve mutant formlarının ekspresyonlarının gösterilmesi. Jeldeki her bir kuyucuğa eşit miktarda protein yüklendiğini göstermek için (10 µg / kuyucuk) membran anti-aktin antikoruna ile de muamele edilmiştir.

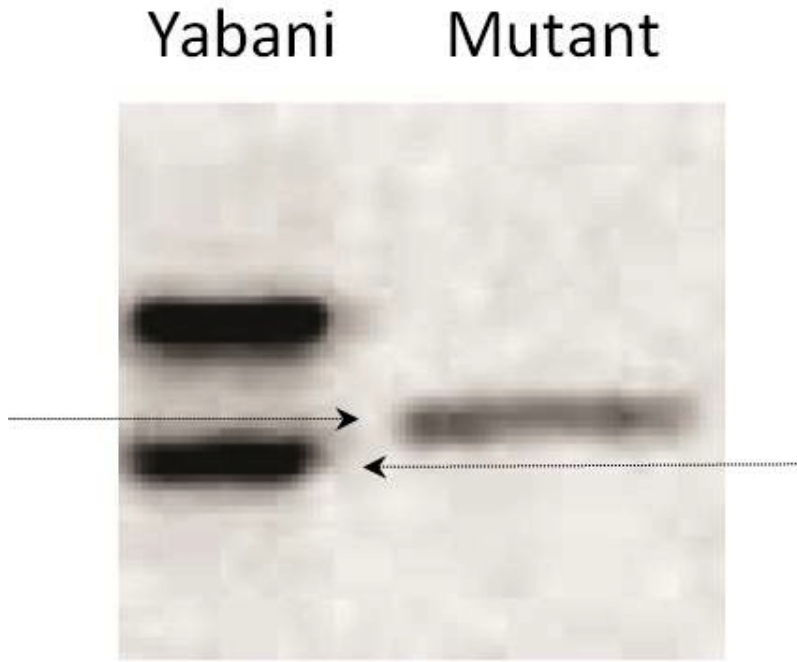
arkadaşlarının HeLa hücrelerinde gördüğü formlar ile uyuşmaktadır (Kasap ve ark., 2009). Western blot üzerinde üst bant olarak görülen form 52 kDa olup tam boy Parkin proteininin moleküler ağırlığına denk gelmektedir. Altta görülen ve yabancı tip proteine ait ikinci bant ise 42 kDa ağırlığında olup translyasyon sonrası değişime işaret etmektedir. Yapılan literatür taramasında yabancı tipe ait bu form gözlemlenmiş ve bu formun tam boy parkin proteininin kaspaz I tarafından kesilmesi ile oluştuğu belirtilmiştir (Şekil 4.8.) (Kahns et al., 2002).

Yabancı tip Parkin proteinine ait düşük moleküler ağırlıktaki protein bandı ile mutant Parkin'e ait protein bandı PTM açısından değerlendirilmek istendi. Bu amaçla proteinler % 8-15 gradient jelde yürütüldü ve western blot metodu ile incelendi. (Şekil 4.9.). Analizlerimiz sonucunda mutant Parkin proteininin yabancı tip Parkin proteinine göre jel üzerinde farklı bir noktaya ilerlediği ve bu farkın da moleküler ağırlıktaki artıştan kaynaklandığı gösterildi.

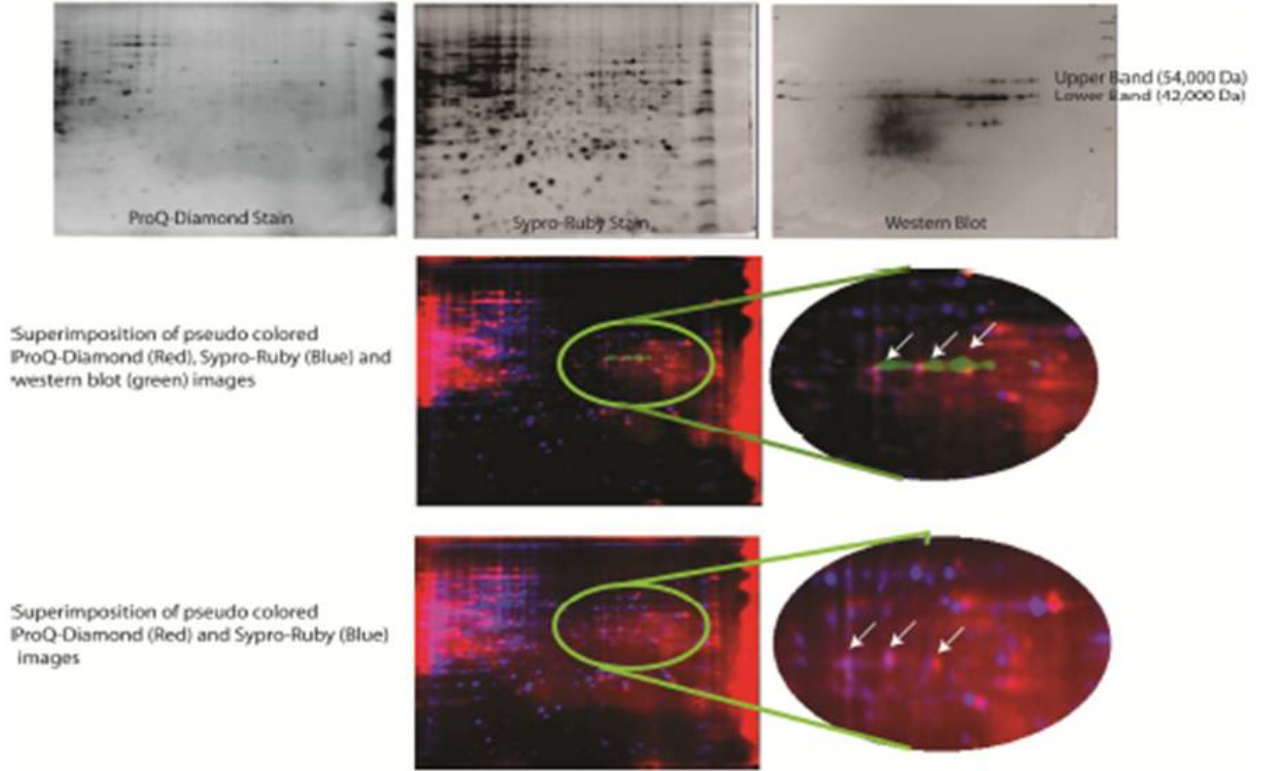
Yabancı tip ve mutant Parkin protein bantları arasındaki moleküler ağırlık farkının düşük olması mutant proteinin fosforile olduğuna işaret etmektedir. Ancak sülfilasyon nitrozilasyon gibi değişiklikler de moleküler ağırlıkta fosforilasyondan kaynaklanan kaymalara benzer değişimlere neden olmaktadır. Bundan dolayı jel üzerindeki değişimin fosforilasyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için fosfoproteinlere özel bir boyama gerçekleştirildi. Bu amaç için hazırlanan iki adet gradient jelde hem yabancı tip hem de mutant Parkin proteinleri ayrıldı. Jellerden biri western blotlama için kullanırken diğeri fosforile olmuş proteinleri görünür kılmak için fosfoprotein boyası (ProQ-Diamond, Invitrogen, ABD) ile boyandı. Elde edilen görüntüler üst-üste getirildi. Çıkan sonuç bize mutant Parkin proteinin fosforile olabileceğini düşündürdü. Aynı deney daha belirgin sonuçlar verebileceği ümidi ile 2DE jel sistemi üzerinde tekrarlandı. Sonuçlar sitoplazmik fraksiyonlarda yabancı tip ve mutant Parkin proteinleri arasında fosforilasyon açısından fark olduğunu açıkça gösterdi (Şekil 4.10.).

#### **4.2.2. Stabilite Farklılıkları**

Proteinlerin hücre içerisindeki miktarları ve ne kadar süre ile hücre içerisinde kaldıkları da önemlidir. Hücrede normalde bulunması gerektiğinden daha kısa süre tutulan ve parçalanarak ortadan kaldırılan bir protein görevini gerektiği gibi yerine getiremediği gibi, normalden daha uzun süre parçalanmadan kalan bir proteinde hücre stresine ve ölümüne neden olabilir. Bu açıdan bakıldığında sorulan soru yabancı tip ve mutant Parkin proteinlerinin hücre içerisindeki miktarları ve yarı ömrü arasında bir fark olup olmadığıdır.



**Şekil 4.9.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin % 8-15 gradient jel üzerindeki western blot görüntüsü.



**Şekil 4.10.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinleri fosforilasyon profillerinin 2DE-jel elektroforezi ile western blot, ProQ-Diamond ve Sypro-Ruby boyamaları karşılaştırmalı analizi. Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerini içeren protein özütleri eşit oranda karıştırılıp 2DE-jel elektroforezine tabi tutuldu (pH 5-8). Aynı şartlar altında üretilen jellerden birisi anti-Parkin antikoru ile blotlanırken diğeri ProQ-Diamond ve ardından Sypro-Ruby boyaları ile boyandı. Süperimpozisyon sonrası mutant formunda olan Parkin proteininin fosforile olduğu gözlemlendi (Yeşil renkli spotlar).

Bunu belirleyebilmek için SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup>-Park2 yabani ve mutant tip kontrollü protein ekspresyonuna izin verecek stabil hücre hatları kullanıldı. Hücre içerisinde çok fazla miktarda Parkin'in olması yarı ömür çalışmasında proteinin doygunluğa ulaşmasından dolayı yıkımını izlemeye izin vermemektedir (gösterilememiş data). Bu nedenle öncelikle Parkin'i hücre içerisinde ne kadar süre eksprese etmemiz gerektiği belirlendi. Hücreler farklı sürelerle yabani tip ve mutant Parkin'i eksprese etsinler diye 1µg/ml tetrasiklin ile indüklendi ve Parkin antikoru ile ekspresyon profili belirlendi (Şekil 4.11 (A)). Yapılan çalışmada 10 saatlik indüksiyon süresinin protein ekspresyonunu görebilmek için yeterli olduğu ve bu süre içerisinde proteinin doygunluğuna ulaşılmadığına karar verildi. Başka bir ifadeyle 10 saat süreli eksprese edilen Parkin'in yıkımı takip edilebilmekteydi. Bu amaçla Parkin ekspresyonu için hücreler 10 saat tetrasiklin ile indüklendikten sonra, tetrasiklin ortamdan besiyeri değiştirilerek uzaklaştırıldı. Protein sentezini durdurmak için ortama sikloheksamid ilavesi yapıldı. Sikloheksamid hücrede yeni protein sentezini önlerken var olan proteinlerin yıkımını etkilemez. Mutant ve yabani tip Parkin yıkımını takip etmek için değişik zaman aralıklarında örnekler alındı ve western blotlama yardımı ile protein yıkımı takip edildi. Aynı membran strip edildikten sonra aktin antikoru ile de tekrar blotlamaya tabi tutuldu (Şekil 4.11 (B)).

Sonuçlar mutant Parkin proteinin yabani tip Parkin proteinine göre daha stabil olduğunu gösterdi. Yabani tip Parkin'in 48. ve 72. saat örneklerinde çok az miktarda bulunduğu (yok denecek kadar az), mutant proteinin ise önemli miktarda bulunduğunu gösterildi.

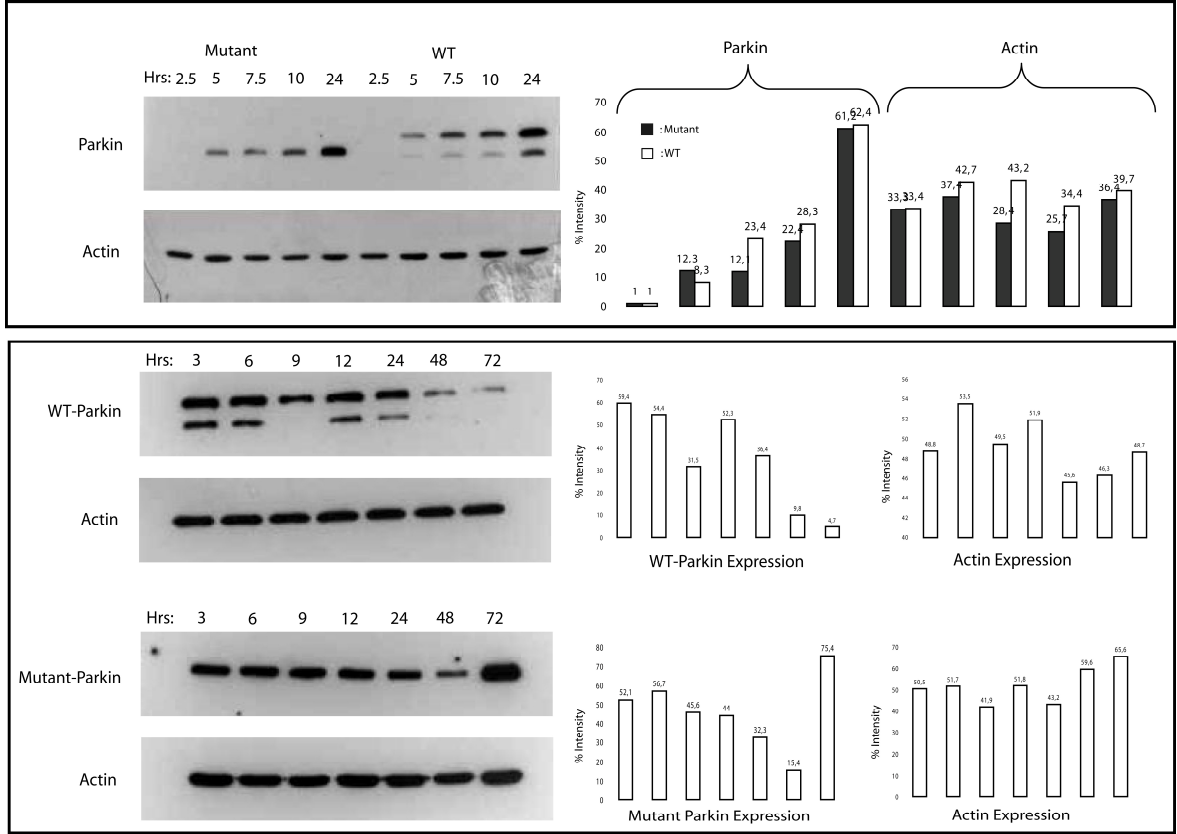
#### **4.2.3. Lokalizasyon Farklılıkları**

Mutant ve yabani tip Parkin proteinleri arasında hücresel lokalizasyon açısından farklar olup olmadığını anlayabilmek için iki tip çalışma gerçekleştirildi. İlk çalışmada Parkin'in sitoplazmik ve nükleer formları arasında fark olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı. İkinci çalışmada ise immünfloresan mikroskop kullanılarak yabani tip ve mutant Parkin proteinleri arasında lokalizasyon farkı olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı.

##### **4.2.3.1. Mutant ve Yabani Tip Parkin Proteinlerinin Sitoplazmik ve Nükleer Protein Formları**

Literatürde var olan bilgi Parkin'in hücre çekirdeğine giderek orada da görev yaptığıdır (Kao, 2009a). Bu nedenle sorulan sorulardan ilki mutant formun da çekirdeğe gidip gitmediğidir. Bu soruya cevap verebilmek için yabani tip ve mutant Parkin eksprese eden SH-SY5Y hücrelerinden sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu yapıldı. Western





**Şekil 4.11.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin hücre içerisindeki kararlılıklarının karşılaştırılması. A. Yabani tip ve mutant Parkin proteininin farklı indüksiyon sürelerinde hücre içerisindeki miktarının western blot ile gösterimi. B. Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin 10 saat indüksiyon sonrası farklı sürelerde CHX muamelesi sonucu hücre içerisindeki miktarlarının western blot ile gösterimi (Deney iki kez tekrar edilmiştir).

blotlama yöntemi kullanılarak bu iki protein izolatı arasında herhangi bir farklılık olup olmadığı gözlemlenmeye çalışıldı (Şekil 4.12.).

Sonuç olarak hücre çekirdeğine giden yabancı tip Parkin'in sitoplazmik formuna göre translyasyon sonrası modifikasyon (PTM) geçirdiği görüldü. Mutant formdaki Parkin'de ise çekirdeğe giden formu ile gitmeyen formu arasında translyasyon sonrası modifikasyon açısından net bir fark görülmedi. İlginç olan çekirdeğe giden yabancı tip ve mutant Parkin proteinleri arasındaki farklılıktı. Çekirdeğe giden yabancı tip Parkin net bantlar verirken, mutant Parkin merdiven şeklinde çoklu bantlar vermekte idi. Çoklu bantların varlığı mutant parkinin poliubikinite olabileceğine işaret etmektedir. Ancak poliubikuitinasyonu göstermek için LC-MS/MS tarzı deneylerin yapılması şarttır. Bu çalışma kapsamında bu deneyler yapılamadı.

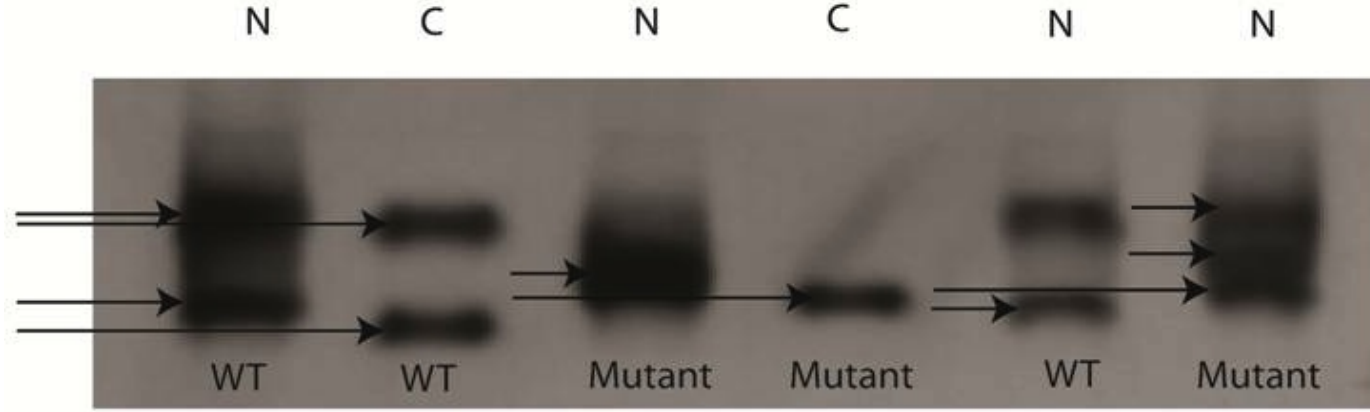
İkinci olarak Parkin'in yabancı tip ve mutant formları arasındaki lokalizasyon farkını kantitatif olarak belirleyebilmek için immünfloresan tabalı deneyler yapıldı. Hücreler cam cover-slipler üzerinde büyütüldü, fikse edildi, monoklonal anti parkin antikoru ve texas red konjige edilmiş ikincil antikor ile muamele edildi ve parkin lokalizasyonunu belirleyebilmek için floresan mikroskop ile incelendi (Şekil 4.13.).

SH-SY5Y hücreleri morfolojik olarak küçük hücreler olduklarından immünfloresan boyamalarımız Parkin lokalizasyonu hakkında net bir bilgi vermedi. Zaman zaman çekirdek çevresinde yoğunlaşan, zaman zaman da hücrenin bütününe yayılmış bir dağılım profili hem yabancı tip hem de mutant Parkin proteinleri için gözlemlendi (Şekil 4.13.). Birbirleriyle çelişen bu bilgiler sağlıklı olmadığından dolayı lokalizasyon çalışması Parkin'i yeşil floresan proteini (GFP) ile konjuge edilerek hücre içerisindeki dağılımı takip edilerek yapıldı.

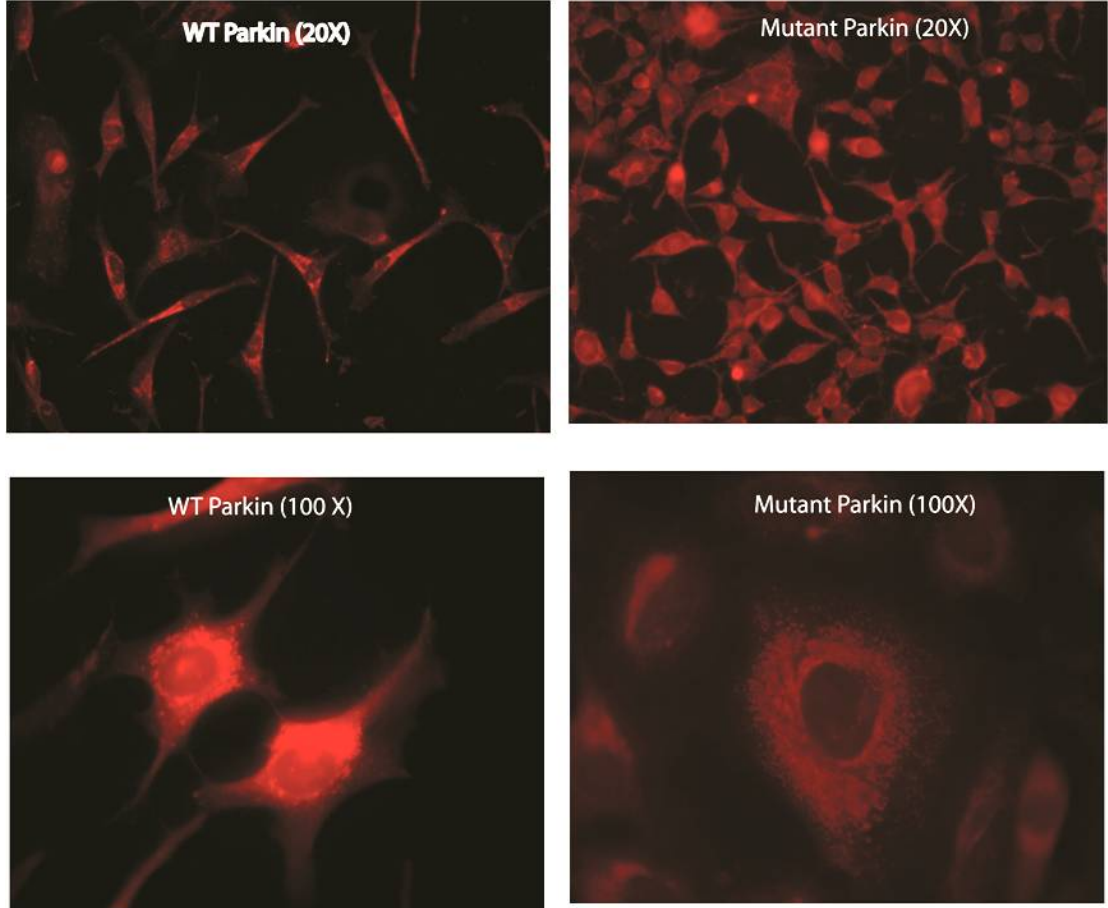
#### **4.2.3.2. pcDNA4/TO-GFP-Park2 Yabancı Tip ve Mutant Rekombinant Plazmit ile Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması**

Çalışmanın bu kısmında GFP-Parkin füzyon proteinini kontrollü eksprese edebilecek stabil bir hücre hattı yapıldı. Bu amaçla önce yeşil floresan proteinine ait GFP geni PZR ile pGFP-N (Clontech, ABD) vektöründen çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünü pCDNA/4TO vektörüne klonlandı (Şekil 4.14.). Böylece istenilen herhangi bir proteinin lokalizasyonunu çalışmaya fırsat verecek yeni bir rekombinant vektör elde edildi.

Sonraki aşamada bu yeni GFP-PCDNA/4TO rekombinant vektöründeki GFP geninin karboksi ucuna (-COOH) *Park2* geni klonlandı (Şekil 4.15 A ve B).



**Şekil 4.12.** Yabani tip ve mutant Parkin'in sitoplazmik (C) ve nükleer (N) formlarının western blot yöntemi ile karşılaştırılması. WT: Yabani tip



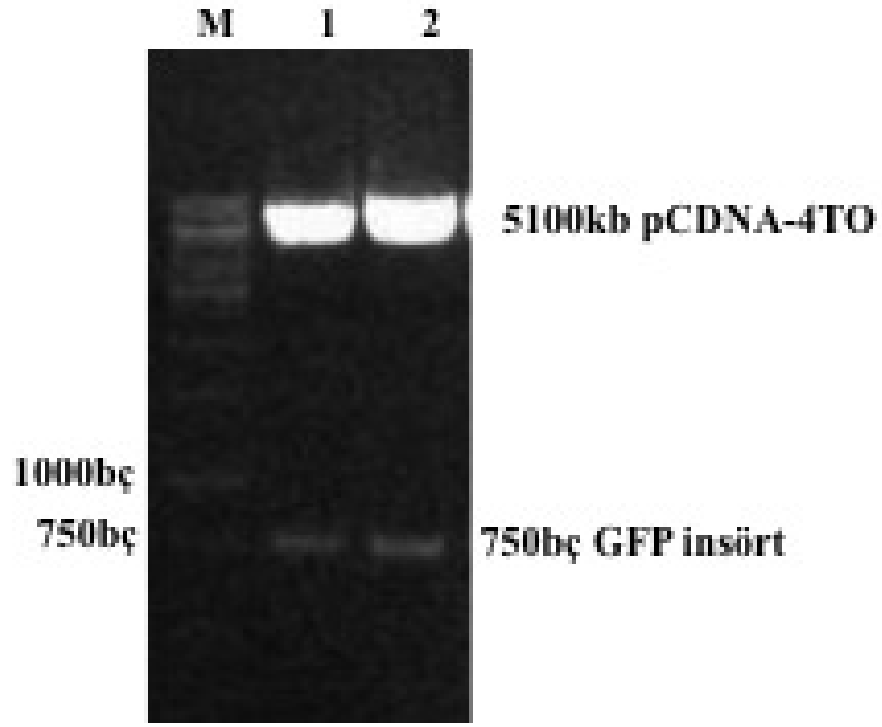
**Şekil 4.13.** Yabani tip ve mutant Parkin'in SH-SY5Y hücrelerindeki lokalizasyonlarını belirlemek amacı ile yapılan immunfloresan çalışmalar

Elde edilen pCDNA4/TO-GFP-Park2 yabani tip ve mutant rekombinant plazmitleri (vektör haritası Ek 1’de verilmiştir) *E. coli* hücresinde çoğaltıldı, endotoksin içermeyecek şekilde hazırlandı ve TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y hücrelerine transfekte edildi. Hücreler zeosin ve blastasidin antibiyotikleri varlığında seçime tabi tutuldu ve GFP-Parkin füzyon proteinini tetrasiklin kontrolü altında güçlü bir şekilde eksprese edebilen hücre çizgileri belirlendi. Oluşturulan bu yeni hücre çizgisine SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup>-GFP-Parkin<sup>+</sup> adı verildi. Kontrol olması açısından aynı hücrelerde yukarıda açıklandığı gibi anti Parkin antikoru ile Texas Red boyaması yapıldı (Şekil 4.16.).

Yapılan floresan mikroskopi çalışmaları sonucunda yabani tip ve mutant Parkin arasında lokalizasyonları açısından anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Yabani tip Parkin’in büyük çoğunluğu sitoplazmada lokalize olurken çok az bir kısmı çekirdekte lokalize olmakta, bunun aksine mutant Parkin’in büyük çoğunluğun çekirdekte lokalize olmaktadır çok az bir kısmı sitoplazmada lokalize olmaktadır.

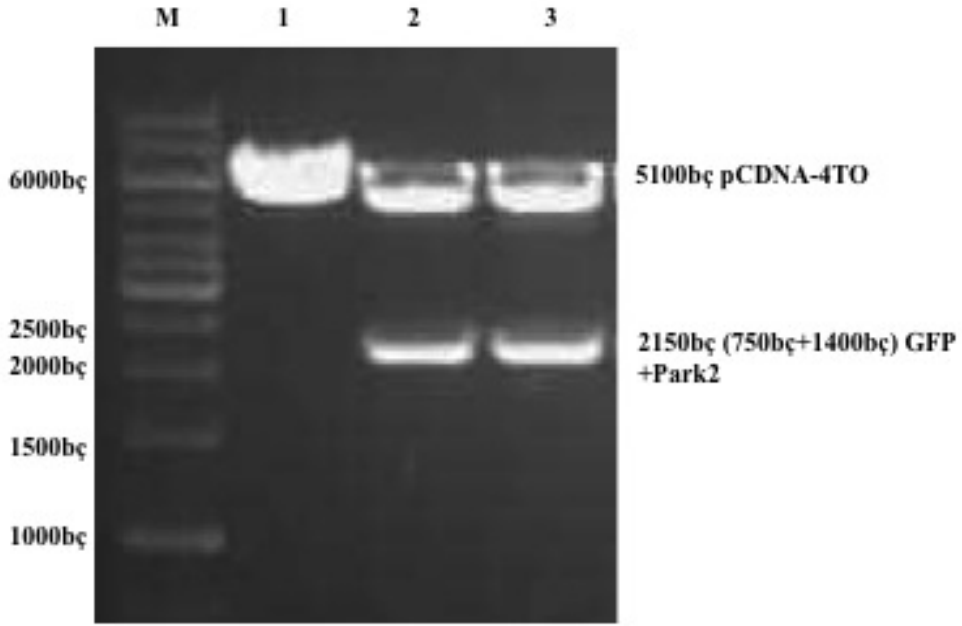
#### **4.2.4. Aktivite Farklılıkları**

Parkin proteini E3-ubikitin ligaz aktivitesi gösteren bir proteindir (Hampe, et al., 2006). Parkin proteini üzerindeki mutasyonların Parkin aktivitesini etkileyip etkilemediğini görmek hastalığın patogenezi anlamı açısından önemlidir. Bu nedenle karakterizasyon çalışmalarının bir parçası olarak daha önceden bilinmeyen ve ilk kez laboratuvarımızda tespit edilmiş olan mutasyonların Parkin aktivitesini etkileyip etkilemediği çalışıldı. Bu amaç için Parkin’i eksprese etmek ve saflaştırmak gerekmektedir. Literatürde rekombinant olarak eksprese edilen ve saflaştırılan Parkin proteininin aktivitesini koruduğuna dair yayınlar mevcuttur (Hampe et al., 2006; Matsuda et al., 2006). Bu yayınlarda Parkin proteini veya mutant formları S-tag, His-tag veya Mal-tag sistemleri kullanılarak saflaştırılmıştır (Chaugule et al., 2011). Bu çalışmada yabani tip ve mutant Parkin’i saflaştırmak için iki farklı sistem denendi (Bkz. Materyal-Metod). Kullandığımız ilk sistemde de parkin proteini tag free olarak Profinity eXact tag üzerinden elde edilmeye çalışıldı (Bkz 4.2.4.1.). Tag free sistemin başarısız olması nedeniyle daha önceden literatürde kullanılmış Maltoz Bağlama Proteinine (MBP) füzyon yapılarak saflaştırmayı sağlayan pMAL<sup>TM</sup> Protein Fusion and Purification sistemini kullanıldı (NEB, ABD).

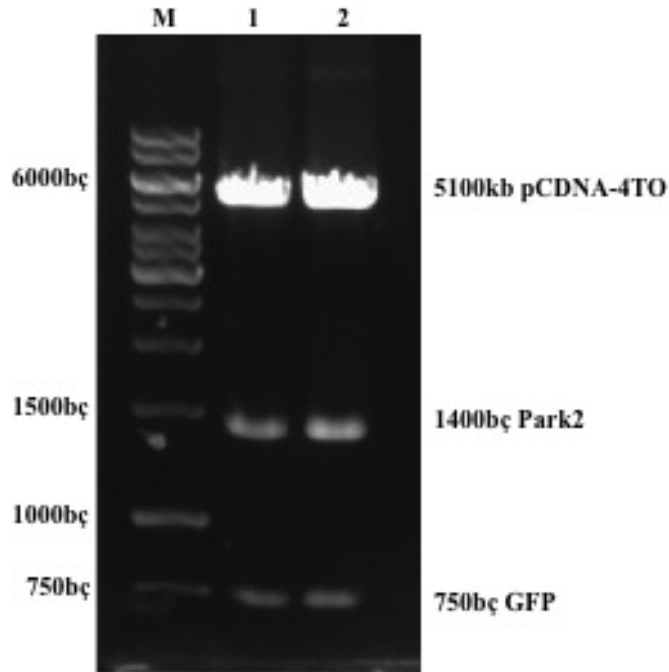


**Şekil 4.14.** pCDNA4/TO-GFP klon plazmitlerin BamHI-HindIII enzimleri kesimlerinin agaroz jel görüntüsü M. DNA belirteci (1kb DNA ladder Fermentas, ABD), 1. pCDNA4/TO-GFP klon plazmit #1, 2. pCDNA4/TO-GFP klon plazmit# 2

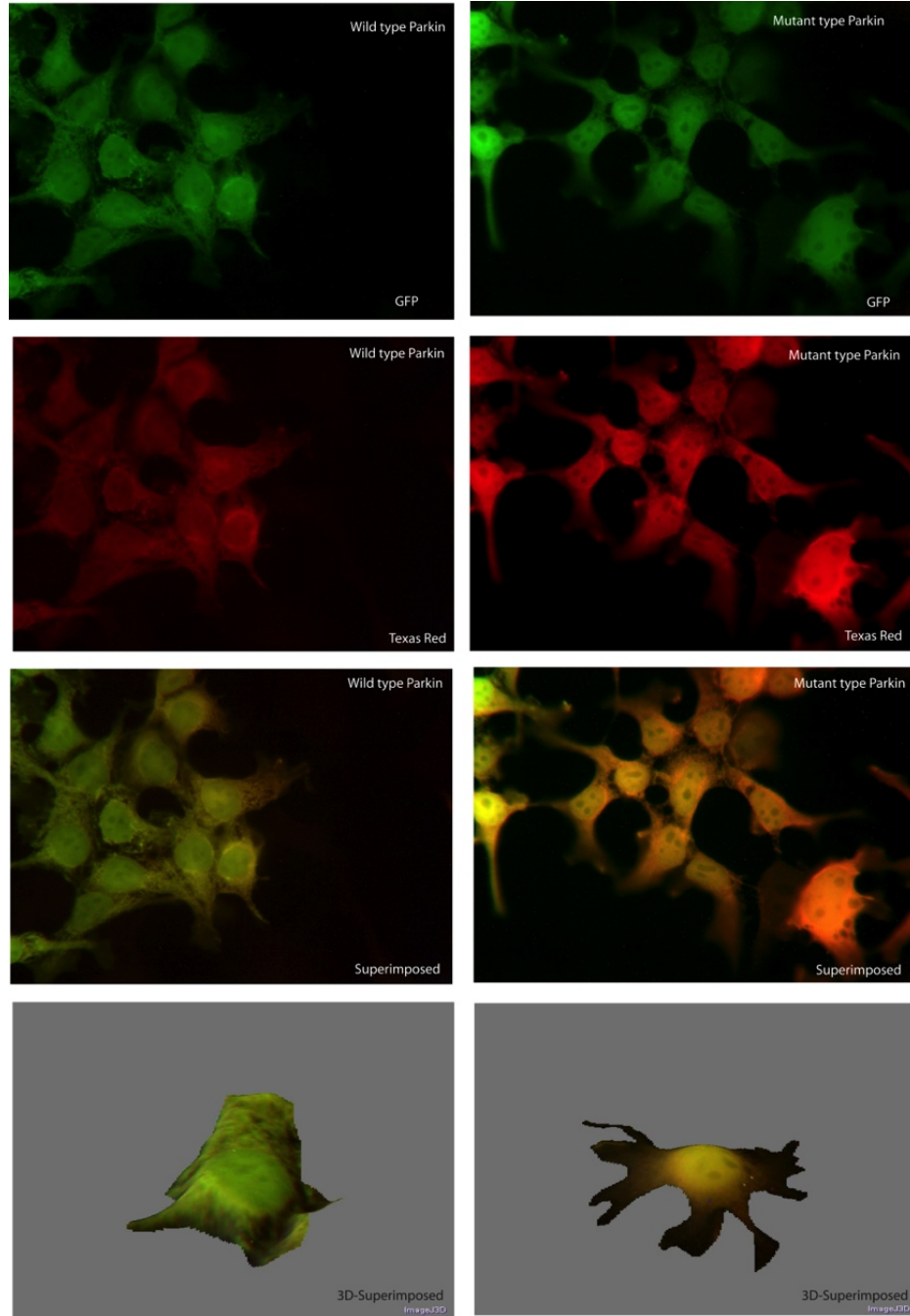
A



B



**Şekil 4.15.** GFP-pCDNA4TO-Park2 yabancı tip ve mutant klon plazmitlerin EcoRI-HindIII-BanHI enzimleri kesimlerinin agaroz jel görüntüsü. (A) M.Marker DNA ladder 1kb (Fermantas,ABD) 1. pCDNA-4TO EcoRI kesimi, 2. pCDNA4/TO-GFP-Park2 mutant tip plazmit EcoRI-HindIII kesimi, 3. pCDNA4/TO-GFP-Park2 yabancı tip plazmit EcoRI-HindIII kesimi. (B) M. Marker DNA ladder 1kb (Fermantas,ABD), 1. pCDNA4/TO-GFP-Park2 yabancı tip plazmit EcoRI-HindIII-BamHI kesimi, 2. pCDNA4/TO-GFP-Park2 mutant tip plazmit EcoRI-HindIII-BamHI kesimi



**Şekil 4.16.** pGFP-Parkin-yabani tip ve pGFP-Parkin-mutant klonlarını tetrasiklin altında kontrollü eksprese eden SH-SY5Y hücrelerinde Parkin lokalizasyonunun hem GFP-filtresi ile hem de Texas Red ile görüntülenmesi. Wild type: Yabani tip, Mutant type: Mutant tip



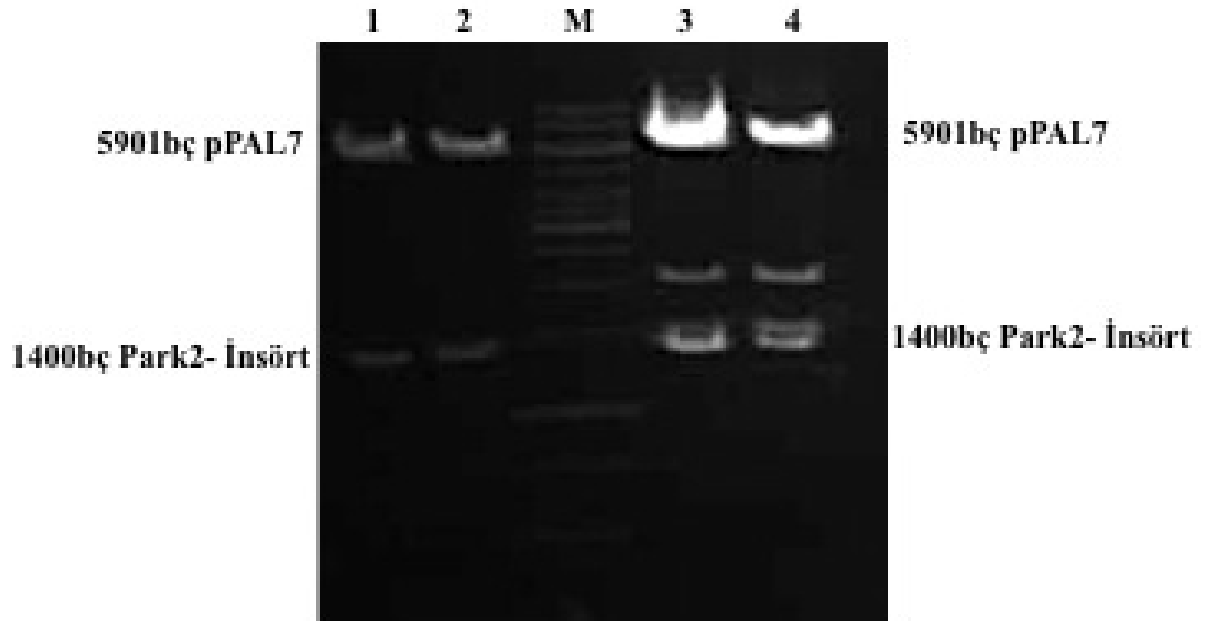
#### 4.2.4.1. pPAL7-Park2 Klonundan İfade Edilen Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteininin Saflaştırılması

Yabani tip ve mutant Parkin'in E3-ubikitin ligaz aktivitelerini ve varsa farklarını göstermek amacı ile proteinler eksprese edilip, saflaştırmaya çalışıldı. Tag-free rekombinant Parkin proteini elde edebilmek için Profinity eXact tag-free rekombinant protein ekspresyon sistemi (BioRad, ABD) kullanıldı. Bu sistemin çalışması durumunda saflaştırılmak istenen proteinin N- ucuna 8 kD'luk Profinity eXact Tag adı verilen bir polipeptit eklenmekte ve afinite purifikasyonu sırasında tag kolon üzerinde kesilerek tag-free rekombinant protein tek adımda saflaştırılmaktadır. Bu amaçla yabani tip ve mutant *Park2* geni PZR metodu ile EcoRI-HindIII uçları taşıyan primerler kullanarak çoğaltıldı ve bu PZR ürünleri EcoRI-HindIII endonukleazları ile kesime tabi tutulup aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan pPAL7 vektörüne ligasyon yaparak yerleştirildi. Oluşturulan bu yeni rekombinant vektörlere pPal7-Park2 yabani tip ve pPal7-Park2 mutant vektörü adı verildi (vektör haritası Ek 2'de verilmiştir) (Şekil 4.17.).

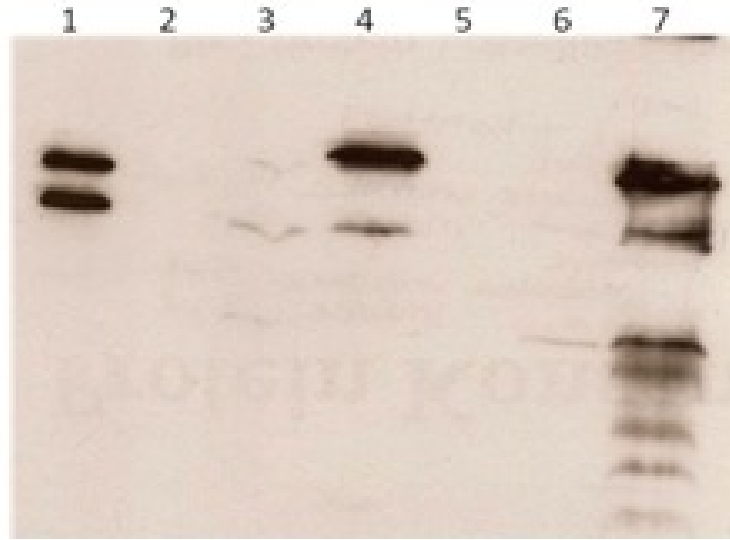
Rekombinant pPAL7-Park2-yabani tip ve pPAL7-Park2-mutant vektörleri bir protein ekspresyon suşu olan *E. coli* BL21 (DE3)-codon plus hücrelerine transforme edildi. Seçilen bir koloni zengin sıvı besiyerinde OD<sub>600</sub> ~ 0.5 olana kadar büyütüldü, kültüre IPTG ekleyerek Parkin protein sentezi indüklendi. Hücrelerden tüm protein özütü ve membran fraksiyonu protein özütü hazırlandı. Western blot yöntemi kullanarak IPTG ile indüklenmiş ve indüklenmemiş proteinlerin çözülmüş sitoplazmik ve çözülmemiş membran protein formları anti-Parkin antikoru ile Parkin ekspresyonu açısından incelendi (Şekil 4.18.).

Sonuç olarak indüklenmiş hücrelerden çözülebilir formda Parkin'in sentezlendiği görüldü. Daha sonra bu protein Profinity eXact purification rezin ile saflaştırılmaya çalışıldı. Parkin proteini saflaştırma kolonuna bağlanmak istense de protein her seferinde bağlanmadan yıkamalar sırasında kolondan ayrıldı (Şekil 4.19.). Bu çalışmayı birçok kez tekrar etmemize ve proteinin kolona bağlanma parametrelerini değiştirmemize rağmen protein kolona bağlanmadı.

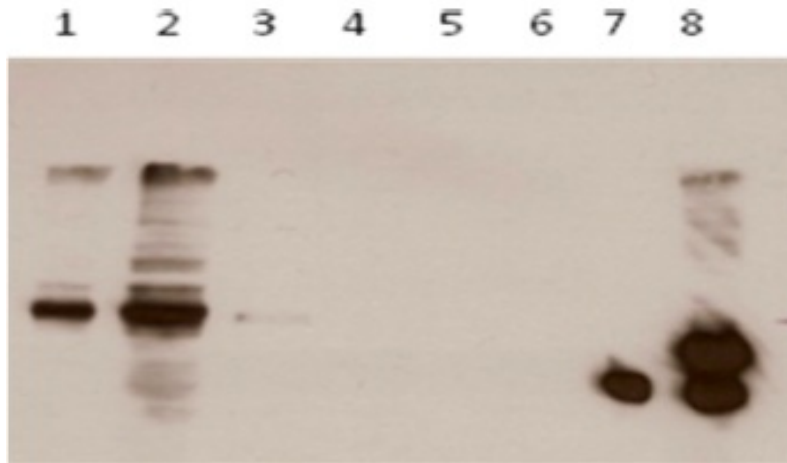
Alternatif bir yaklaşım olarak, Parkin proteinini saflaştırmak için pMAL™ Protein Fusion and Purification sistemini (NEB Inc., ABD) kullanılmaya karar verildi.



**Şekil 4.17.** pPAL7-Park2 yabani tip ve mutant klon plazmitlerin EcoRI-HindIII enzimleri kesimlerinin agaroz jel görüntüsü. 1. *E. coli* DH10B hücresinden izole pPAL7-Park2 mutant tip plazmitin EcoRI-HindIII kesimi, 2. *E. coli* DH10B hücresinden izole pPAL7-Park2 yabani tip plazmitin EcoRI-HindIII kesimi, 3. Marker DNA ladder 1kb (Fermantas, ABD), 4. *E. coli* BL21Kodon+ hücresinden izole pPAL7-Park2 mutant tip plazmitin EcoRI-HindIII kesimi, 5. *E. coli* BL21Kodon+ hücresinden izole pPAL7-Park2 yabani tip plazmitin EcoRI-HindIII kesimi



**Şekil 4.18.** İndüklenmemiş ve indüklenmiş pPAL7-yabani tip plazmiti içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden hazırlanan protein özütlerinin çözülebilir ve çözülemez formlarının Parkin antikoruna ile western blot taraması. (1) Pozitif kontrol (yabani tip Parkin ekspres eden SY5Y total protein ekstraktı). (2) Boş kuyucuk. (3) IPTG indüklenmemiş *E. coli* BL21 tüm protein özütü (4) IPTG ile indüklenmiş *E. coli* BL21 tüm protein özütü. (5) Boş kuyucuk. (6) IPTG ile indüklenmemiş *E. coli* BL21 membran fraksiyonu. (7) IPTG ile indüklenmiş *E. coli* BL21 membran fraksiyonu.



**Şekil 4.19.** Profinity eXact Tag–Parkin yabani tip rekombinant protein saflaştırma denemesi sonrası anti-Parkin antikoruna ile yapılan western blot taraması. 1. Total protein özütündeki Parkin, 2. Kolona bağlanmayan proteinlerle birlikte gelen Parkin, 3. Yıkama fraksiyonu 1 ile birlikte gelen Parkin, 4. Yıkama fraksiyonu 2 ile birlikte gelen Parkin, 5. Elüsyon fraksiyonu 1 ile birlikte gelen Parkin, 6. Elüsyon fraksiyonu 2 ile birlikte gelen Parkin, 7. Pozitif kontrol mutant Parkin, 8. Pozitif kontrol yabani tip Parkin.

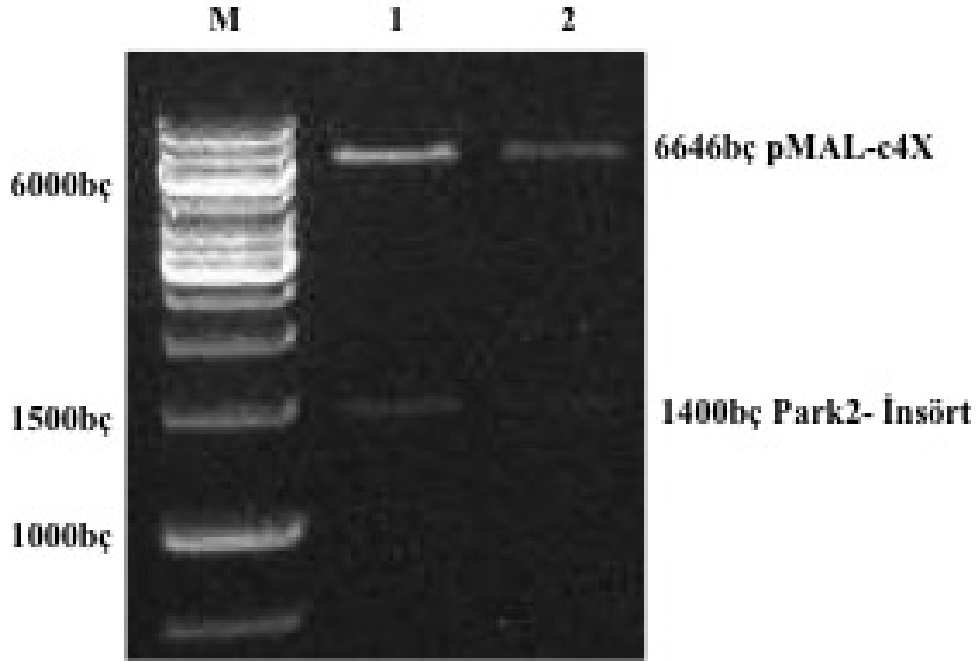
#### 4.2.4.2. pMal-c4X-Park2 Klonundan İfade Edilen Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteininin Saflaştırılması

Maltoz Bağlama Proteini (MBP) bağımlı rekombinant protein ekspresyon sisteminde hedef proteinin N- ucuna MBP proteini füzyon edilmektedir ve MBP proteini aracılığı ile hedef protein amiloz kolona bağlanarak saflaştırılmaktadır. Bu amaçla yabani tip ve mutant *Park2* geni PZR metodu ile EcoRI-HindIII uçları taşıyan primerler kullanarak çoğaltıldı ve bu PZR ürünleri EcoRI-HindIII endonukleazları ile kesime tabi tutulup aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan pMal-c4X vektörüne ligasyon yaparak yerleştirildi. Oluşturulan bu yeni rekombinant vektörlere pMal-c4X -Park2 yabani tip ve pMal-c4X-Park2 mutant vektörü (vektör haritası Ek 3'te verilmiştir) adı verildi (Şekil 4.20.).

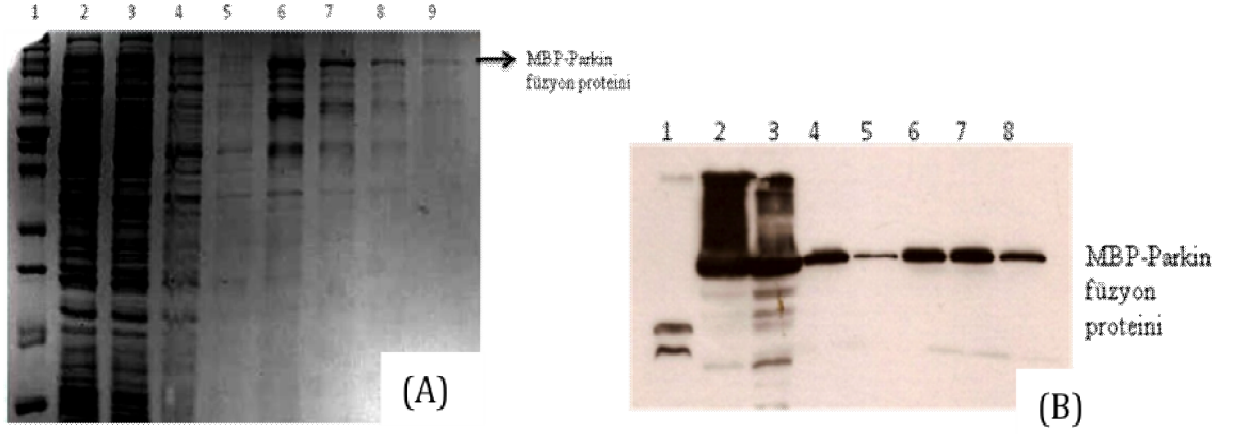
Rekombinant pMAL-c4X-Park2 yabani tip ve pMAL-c4X-Park2 mutant vektörleri bir protein ekspresyon suşu olan *E. coli* BL21 (DE3)-codon plus hücrelerine transforme edildi. Seçilen bir koloni zengin sıvı besiyerinde OD<sub>600</sub> ~ 0.5 olana kadar büyütüldü, kültüre IPTG ekleyerek Parkin protein sentezini indüklendi. Eksprese ettiğimiz füzyon MBP-Parkin mutant ve füzyon MBP-Parkin yabani tip proteinleri amiloz rezinde tek bir adımda saflaştırdığımızı hem % 12 SDS-PAGE jelinde hem de anti-Parkin antikoru kullanarak western blot taraması ile gösterildi (Şekil 4.21.). Saf proteinler *in vitro* ubiquitinasyon assay çalışmaları için kullanıldı.

#### 4.2.4.3. *In vitro* Parkin Ubikuitin Aktivitelerinin Ölçülmesi

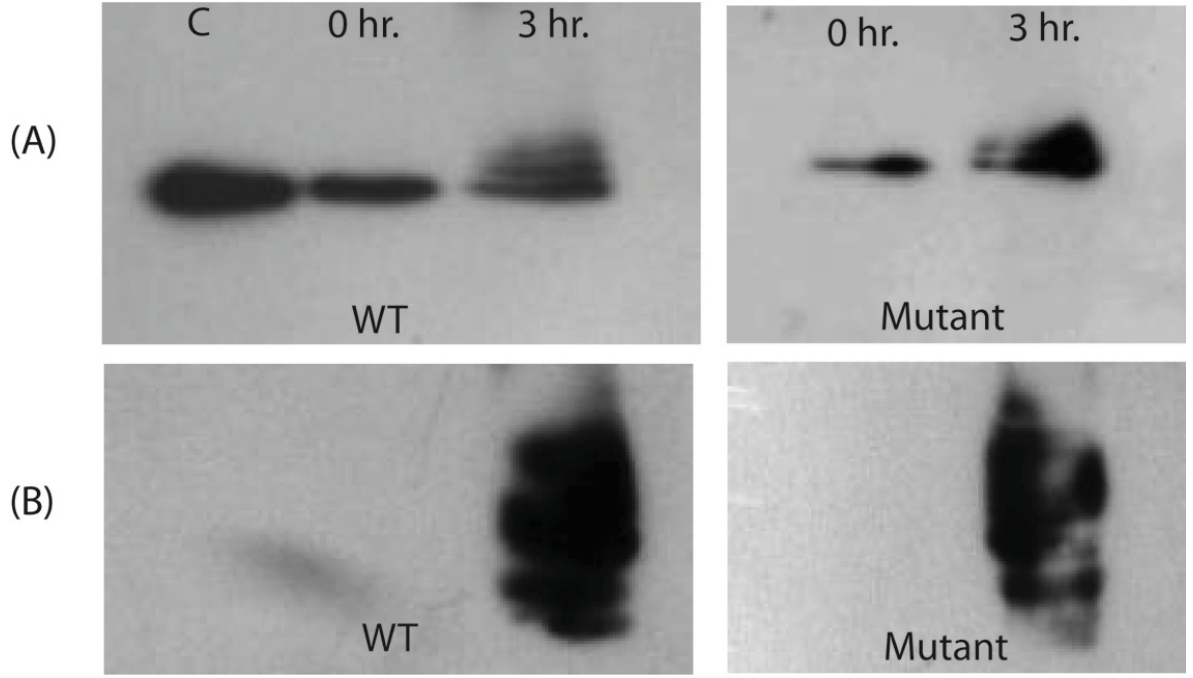
Yabani tip ve mutant Parkin arasında aktivite farkı olup olmadığını belirleyebilmek için *in vitro* Parkin aktivite ölçüm deneyleri yapıldı. Bu amaçla saflaştırılan Yabani tip ve mutant MBP-Parkin'i literatürde tarif edildiği gibi *in vitro* ubikitinilasyon reaksiyonlarında kullanıldı (Hampe et al., 2006). Üç saatlik inkübasyon sonrasında reaksiyonları SDS-PAGE elektroforezine tabi tutuldu ve anti-Parkin antikoru ile western blot taraması yapıldı. Sonuçlar görüntüledikten sonra (Şekil 4.22-A), membrana bağlanan antikoları uzaklaştırdık ve anti-ubikitin antikoru ile tekrar western blot taramasına tabi tutuldu (Şekil 4.22-B). Üç saatlik inkübasyon sonrasında yapılan western blot analizi MBP-Parkin füzyon proteininin ubikuitine olmuş formlarının varlığını gösterdi (Merdiven şeklinde yükselen bantlar).



**Şekil 4.20.** *E. coli* DH10B hüresinden izole pMAL-c4X-Park2 yabani tip ve mutant rekombinant plazmitlerin EcoRI-HindIII enzimleri kesimi agaroz jel görüntüsü. 1. Marker DNA ladder 1kb (Fermantas, ABD) 2. pMAL-c4X-Park2 mutant tip plazmit EcoRI-HindIII kesimi, 3. pMAL-c4X-Park2 yabani tip plazmit EcoRI-HindIII kesimi.



**Şekil 4.21.** MBP-Parkin protein saflaştırması % 12 SDS PAGE jeli ve western blot görüntüleri (A) 1. Marker Protein unstain protein ladder (Fermantas, ABD), 2. Tüm protein özütü, 3. Kolona bağlanmayan proteinler, 4. Yıkama fraksiyonu 1, 5. Yıkama fraksiyonu 2, 6. Elüsyon fraksiyonu 1, 7. Elüsyon fraksiyonu 2, 8. Elüsyon fraksiyonu 3. (B) Saflaştırma sonrası yapılan Western blot sonucu. 1. Pozitif kontrol, yabancı tip Parkin, 2. Tüm protein özütündeki Parkin, 3. Kolona bağlanmayan proteinlerle birlikte gelen Parkin, 4. Yıkama fraksiyonu 1 ile birlikte gelen Parkin, 5. Yıkama fraksiyonu 2 ile birlikte gelen Parkin, 6. Elüsyon fraksiyonu 1 ile birlikte gelen Parkin, 7. Elüsyon fraksiyonu 2 ile birlikte gelen Parkin, 8. Elüsyon fraksiyonu 3 ile birlikte gelen Parkin.



**Şekil 4.22.** *In vitro* yabani tip ve mutant Parkin proteinlerin ubikitilasyon aktivitesi ölçümlerinin western blot ile gösterimi. A. Mutant ve yabani tip proteinlerin 0. ve 3. saatlerdeki aktivitelerinin Parkin antikoruna ile gösterimi. B. Mutant ve yabani tip proteinlerin 0. ve 3. saatlerdeki aktivitelerinin ubikuitin antikoruna ile gösterimi. C: Kontrol-MBP-Parkin proteini.

#### **4.2.5. Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerini Eksprese Eden SH-SY5Y Hücrelerinin Proteomlarının Analizleri**

Karakterize ettiğimiz mutant ve yabani tip Parkin formlarının hücre üzerindeki etkilerini moleküler seviyede gözlemleyebilmek için Proteomiks çalışmaları yapıldı.

##### **4.2.5.1. Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerini Stabil Olarak Eksprese Eden SH-SY5Y Hücrelerinin Proteom Profillerinin 2DE-DIGE Metodu Kullanılarak Karşılaştırılmalı Analizlerinin Yapılması**

Bu çalışmada kontrollü olarak yabani tip ve mutant Parkin ekspresyonları yapan SH-SY5Y hücrelerinin protein profilleri DIGE (Difference Gel Electrophoresis) tekniği kullanarak karşılaştırıldı. DIGE tekniği 2DE-temelli bir tekniktir ve bu teknikte proteinler üç farklı floresan boya ile işaretlenip (Cy2, Cy3 ve Cy5) 2DE jel üzerinde ayırma tabi tutulur. Bu tekniğin klasik 2DE tekniğine olan avantajı, farklı floresan boylarla işaretlenen proteinlerin tek bir havuzda toplandıktan sonra tek bir strip ve jel üzerinde ayırma tabi tutulmasıdır. Böylelikle klasik 2DE-jel elektroforezinde sıklıkla görülen jel'den jel'e olan varyasyon engellenmiş olunur ve alınan sonuçlar çok daha güvenilirdir. Tasarlanılan beş farklı deneyde hangi protein örneğinin hangi floresan boya ile işaretlendiği Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelgede kısaca verilen deneylere ait detaylar aşağıda verilmiştir:

Deney # 1. Bu deneyin amacı hücre içerisinde ekspresyonu indüklenmiş yabani tip Parkin proteininin hücrenin proteomunu nasıl etkilediğini araştırmaktır. Bu amaçla yabani tip Parkin ekspresyonu yapan hücrelerin tüm proteinleri Cy3 floresan boyası ile, Parkin ekspresyonu yapmayan hücrelerin tüm proteinleri ise Cy5 floresan boyası ile işaretlendi. Normalizasyon yapabilmek amacı ile iki örnekten eşit miktarda alınan proteinler karıştırılarak Cy2 floresan boyası ile işaretlendi. Ayrı ayrı Cy3, Cy5 ve Cy2 ile işaretlenen protein örnekleri birleştirildikten sonra 2DE-jel elektroforezine tabi tutuldu.

Deney # 2. Bu deneyde 1. deneyde yapılan işlem mutant Parkin proteini eksprese eden hücreler için yapıldı. Bu deneyin amacı ekspresyonu indüklenmiş mutant Parkin proteininin hücre proteomunu nasıl etkilediğini araştırmaktır.

Deney # 3. Bu deneyin amacı yabani tip ve mutant Parkin proteinlerini eksprese eden hücre proteomlarını karşılaştırmaktır. İndüklenmiş yabani tip ve mutant Parkin



**Çizelge 4.1.** DIGE deneyine ait deney tasarımının özet olarak verilmesi.

<b>DENEY #</b>	<b>CY2</b>	<b>CY3</b>	<b>CY5</b>
1	*YT <sup>+</sup> -indüklenmiş ve indüklenmemiş karışım	YT <sup>+</sup> -indüklenmiş	YT <sup>+</sup> -indüklenmemiş
2	*Mut <sup>+</sup> - indüklenmiş ve indüklenmemiş karışım	Mut <sup>+</sup> -indüklenmiş	Mut <sup>+</sup> -indüklenmemiş
3	YT <sup>+</sup> - Mut <sup>+</sup> - indüklenmiş karışım	YT <sup>+</sup> -indüklenmiş	Mut <sup>+</sup> -indüklenmiş
4	YT <sup>+</sup> - Mut <sup>+</sup> - indüklenmemiş karışım	YT <sup>+</sup> -indüklenmemiş	Mut <sup>+</sup> - indüklenmemiş
5	Mut <sup>+</sup> -indüklenmemiş	*TetR <sup>+</sup> indüklenmiş	YT <sup>+</sup> - indüklenmemiş

\* YT<sup>+</sup>: Yabani Tip Parkin proteinini tetrasiklin kontrolü altında eksprese edebilen SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup> hücrelerden elde edilen total proteinler. Mut<sup>+</sup> : Mutant Parkin proteinini tetrasiklin kontrolü altında eksprese edebilen SH-SY5Y-TetR<sup>+</sup> hücrelerden elde edilen total proteinler. TetR<sup>+</sup>: SY5Y-TetR<sup>+</sup> hücrelerden elde edilen total proteinler

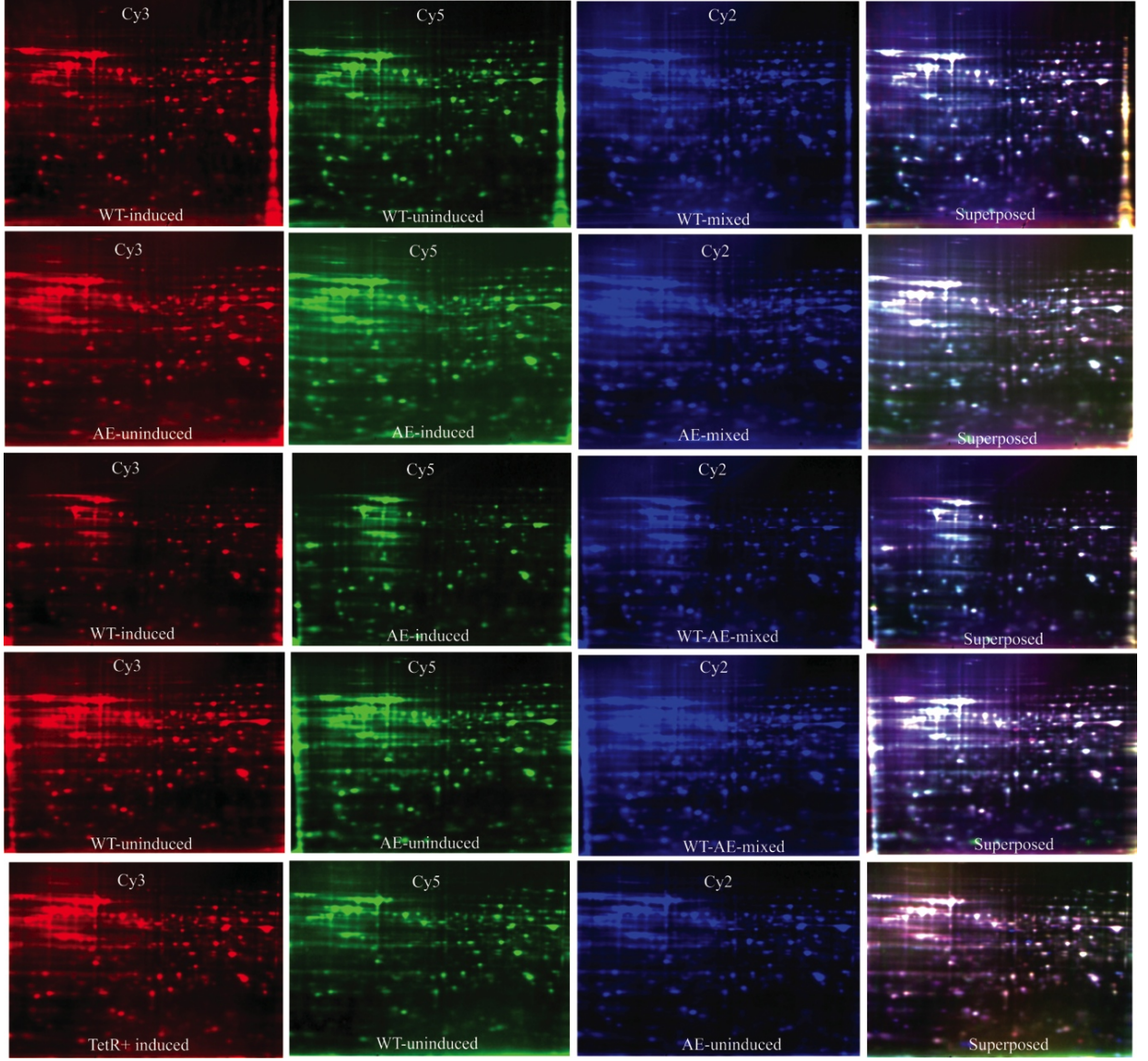
proteinlerini içeren protein özütleri sırasıyla Cy3 ve Cy5 floresan boyası ile ayrı ayrı işaretlendi. Normalizasyon yapabilmek amacı ile iki örnekten de eşit miktarda protein alınarak karıştırıldı ve karışım Cy2 floresan boyası ile işaretlendi. Tüm işaretli proteinler birleştirildikten sonra 2DE-jel elektroforezine tabi tutuldu.

Deney # 4. Bu deneyde 3. deneyde yapılan işlem indüklenmemiş yabani tip ve mutant Parkin proteini eksprese eden hücreler için yapıldı.

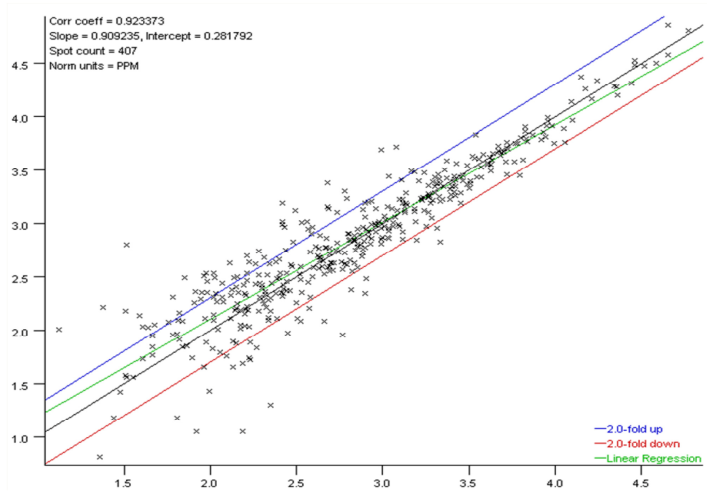
Deney # 5. Bu deneyin amacı ise TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen tüm protein profilinin; indüklenmemiş yabani tip ve mutant Parkin ekspresyonunu yapan hücrelerin tüm protein profilleriyle aynı olup olmadığını göstermektir. İndüklenmemiş yabani tip Parkin ekspresyonu yapan hücrenin tüm proteinleri Cy5 floresan boyası ile, mutant Parkin ekspresyonu yapan hücrenin tüm proteinleri ise Cy2 floresan boyası ile işaretlendi. *park2* genini içermeyen TetR<sup>+</sup> SH-SY5Y hücreleri tüm proteinleri ise Cy3 floresan boyası ile işaretlendi. Tüm işaretli protein örnekleri bir araya getirilerek 2DE-deneyi yapıldı (Şekil 4.23.). Şekil 4.23.'de elde edilen jel görüntüleri ve bunların superimpose halleri verilmiştir.

Elde edilen imajlar PDQuest Advance yazılımı yardımı ile manuel olarak analiz edildi. Jeller üzerinde yaklaşık 500 adet eşleştirilebilir protein spotu belirlendi (Elde edilen overall mean coefficient değeri: 35). Protein spotları dağılım grafikleri incelendiğinde jellerin birbirleri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.24.). Bu sonuç yapılan deneylerde jelden jele olan varyasyonun yok denecek kadar az olduğunu gösterdi. İki kat regülasyon kriteri göz önüne alınarak yapılan istatistiksel analizde normalizasyon sonrası 28 protein spotunda anlamlı değişim bulundu. Bu protein spotlarını isimlendirebilmek için yürütülen preparatif jel ve belirlenen spotların pozisyonları Şekil 4.25.'de verilmiştir.

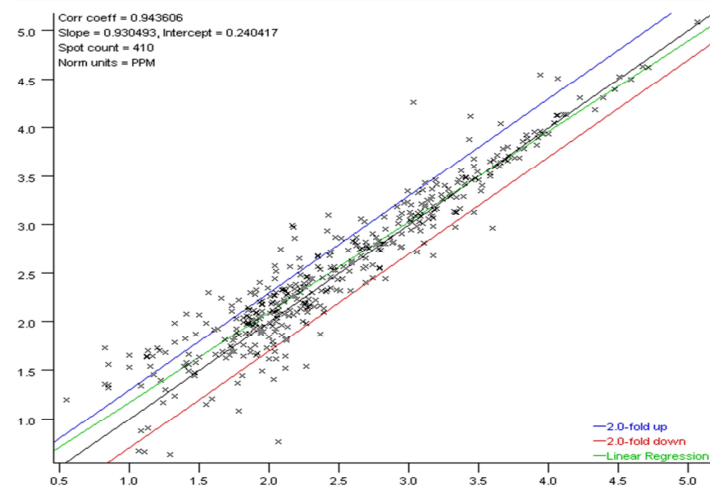
Bu proteinler ekspresyon seviyeleri farklılık gösteren proteinler olup istatistiksel anlam ifade etmektedirler. Belirlenen bu proteinler otomatik spot kesim cihazı (Exquest Spot Cutter, Bio-Rad, ABD) ile kesildi. Proteinleri in gel tripsin metodu kullanılarak tripsin enzimi ile peptitlerine ayrılarak jelden izole edildi ve LC-MS/MS cihazı (Waters Inc., ABD) ile tanımlandı. Elde edilen datanın yakından incelenmesi ile tanımlanan bu proteinlerin bir kısmının mitokondriyal, bir kısmının ise nüklear ve ya sitoplazmik proteinler olduğu belirlendi (Şekil 4.26.). Çizelge 4.2. de tanımlanan proteinler ve bu proteinlerin regüle edildikleri hücre tipi verilmiştir.



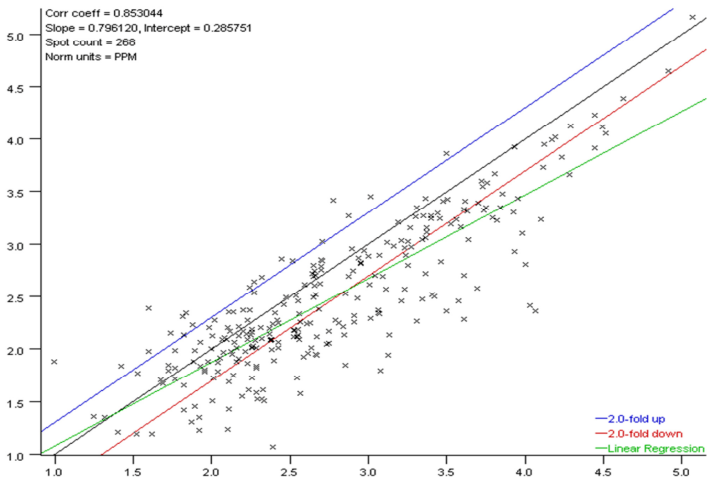
**Şekil 4.23.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerini eksprese eden SH-SY5Y hücre protein özütlerinin farklı floresan boyalarla işaretlenmesi sonrası bir araya getirilerek yapılan deneylerden elde edilen 2DE jel imajları.



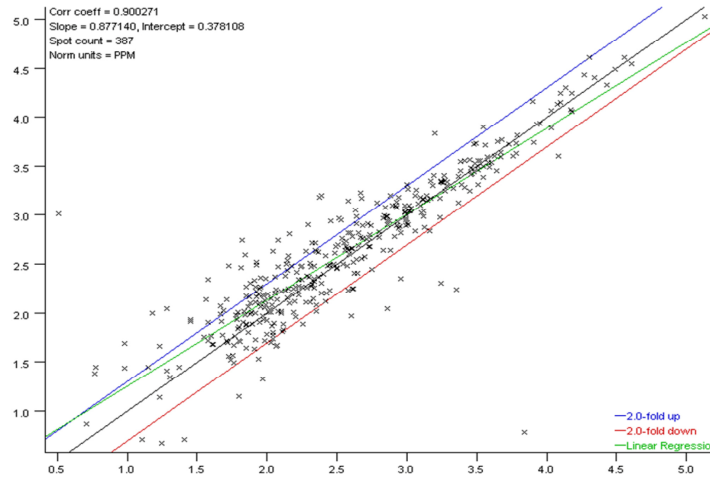
WT induced vs WT uninduced



Mutant induced vs Mutant uninduced

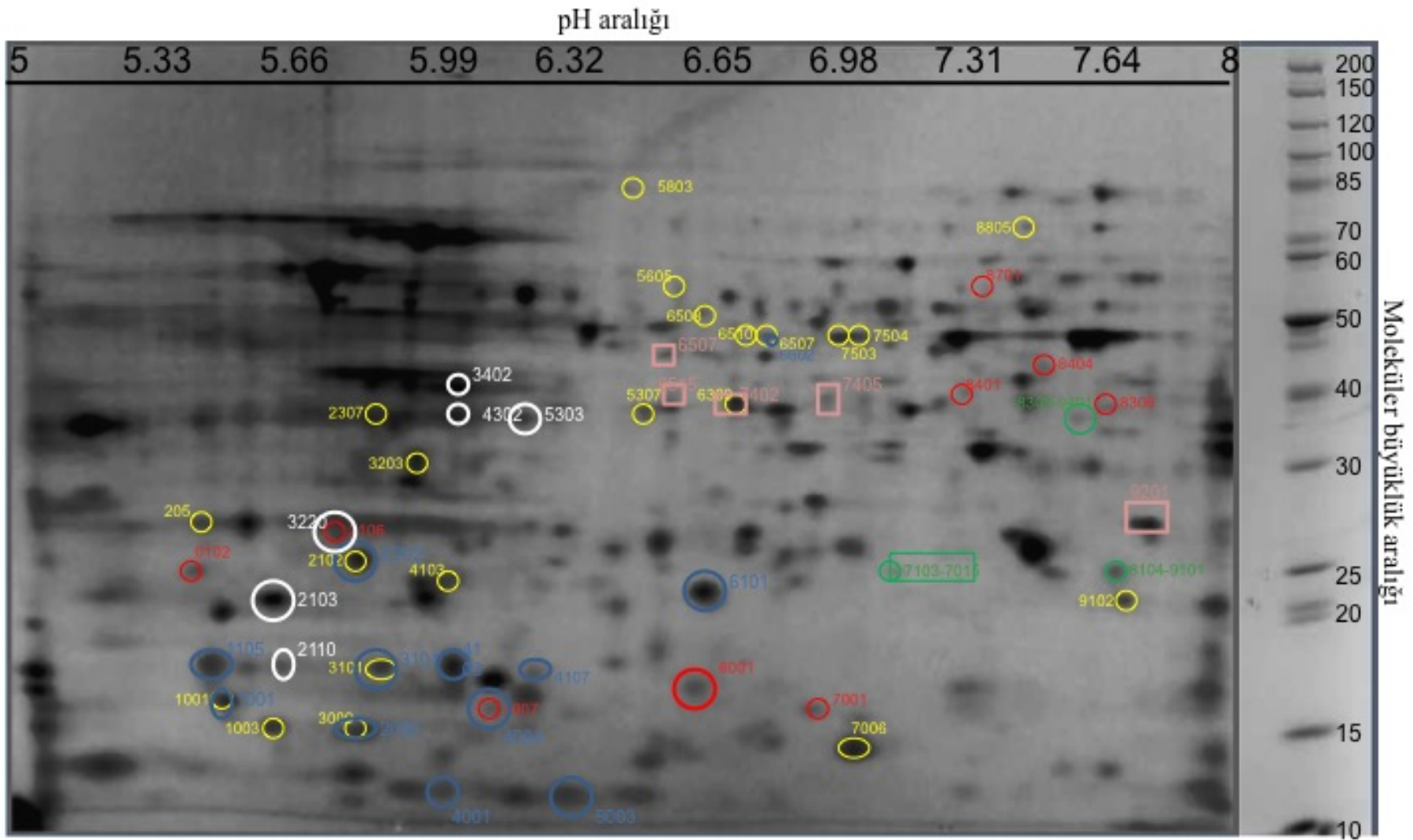


WT induced vs Mutant induced

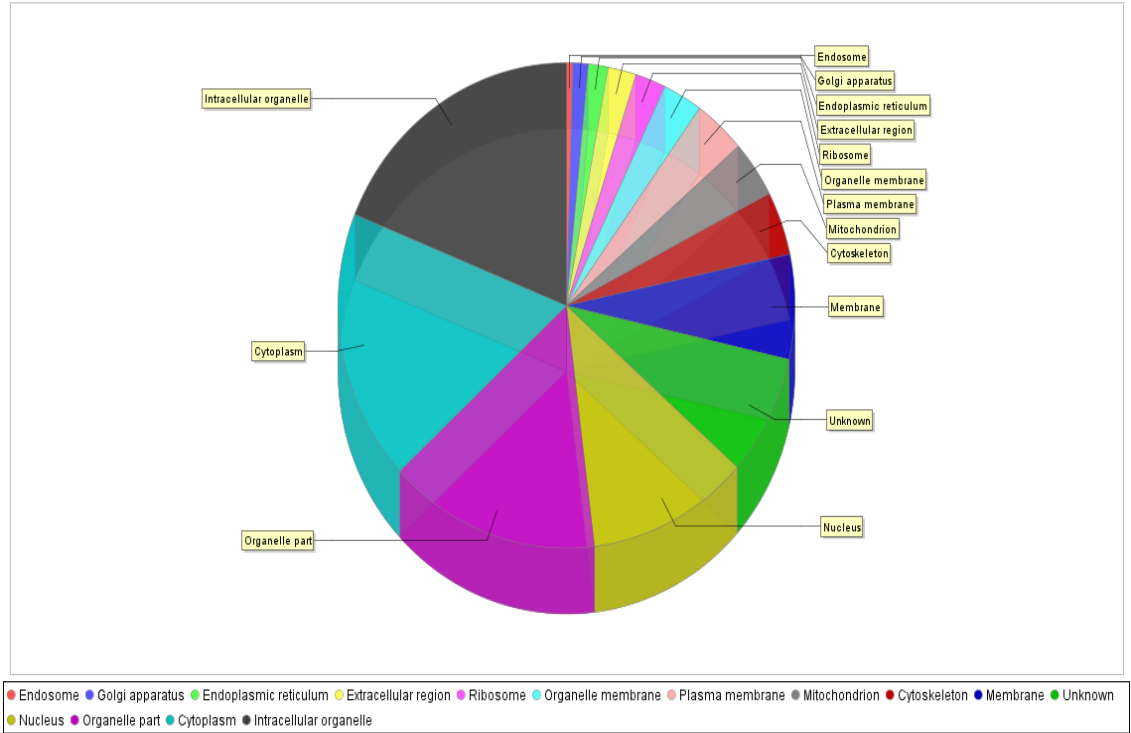


WT uninduced vs Mutant uninduced

Şekil 4.24. Jel üzerindeki protein spotlarının dağılım eğrileri (Scatter Plot)



Şekil 4.25. PDQest analiz sonucunda istatistiksel olarak ifadelerinde farklılıklar gösteren spotlar.



Şekil 4.26. Belirlenen proteinlerin hücre içi lokalizasyonları.

**Çizelge 4.2.** LC-MS/MS analizi sonrası tanımla regüle olmuş proteinler, bu proteinlerin görevleri ve lokalizasyonları verilmiştir.

Gen simgesi ve Tanımlanan Proteinler	Swiss-Prot Ulaşım numarası	Moleküler Ağırlık (kDa)	YT indüklenmiş ile YT indüklenmemiş karşılaştırıldığında	Mut. indüklenmiş ile Mut. indüklenmemiş karşılaştırıldığında	YT indüklenmiş ile Mut. indüklenmiş karşılaştırıldığında	YT indüklenmemiş ile Mut. indüklenmemiş karşılaştırıldığında	Görevi	Hücre içindeki yeri
PDCD5, Programlı hücre ölüm proteini 5	O14737	14					Apoptozis	S ve N
PSMD10, 26S proteozom ATPaz olmayan regülatör altünite 10	O75832	24		artmış			26S proteozom toplandığında şaperon gibi davranmaktadır	S ve N
S10AB, Protein S100-A11	P31949	12			Mutantta artmış		Keratinositlerin farklılaşma ve kornifikasyonunu kolaylaştırır	S ve N
PARK7, Protein DJ-1	Q99497	20					Hücreleri oksidatif stress ve ölüme karşı korumaktadır. Parkinson hastalığı ile ilişkilidir.	S, N ve M
ROAA, Heterojen nükleer ribonükleoprotein A/B	Q99729	36	artmış				ss-RNA'ya bağlanır, transkripsiyonun pozitif regülasyonunu sağlar	S ve N
RBM4, RNA-bağlanma proteini 4	Q9BWF3	40				artmış	RNA başlanma faktörü olarak pre-mRNA'nın alternative splicingi ve translasyonun düzenlenmesini sağlar	S ve N
TBCA, Tübilin-spesifik şaperon A	O75347	13		artmış			Tübilin katlanma yolağında rol alır ve stres ile indüklenir	S

ENOA, Alfa-enolaz	P06733	47		artmış			Glikoliz, büyüme kontrolü, hipoksia toleransı ve alerjik cevapta rol alır	S ve N
UCHL1, Ubikuitin karboksi-uçlu hidrolaz izozim L1	P09936	25		artmış			Ubikuitin-protein hidrolaz olarak ubikuitin öncülünün ve ubikuitinlenmiş proteinlerin proseslenmesinde görev görür	S ve ER
KCRB, Kreatin kinaz B-tip	P12277	43					Dokularda iskelet kası, kalp, beyin ve spermatozoa gibi büyük ve dalgalanan enerji talepleri gibi enerji transdüksiyonunda görev görür	S
PLAK, Junction plakogloblin (Katanin gama)	P14923	82	artmış				Yaygın junctional plak proteindir ve hücre adezyonunda görevlidir	S
STMN1, Statmin	P16949	17			Mutantta artmış		Mikrotübüllerin biraraya gelmesini engelleyip, dağılımını arttırmaktadır. Norogenesisde axon formasyonunda görev görmektedir.	S
TCPA, T-kompleks protein 1 altünite alfa	P17987	60		artmış			Moleküler Şaperondur. <i>In vitro</i> da aktin ve tubilin katlanmasında rol oynamaktadır.	S
1433B, 14-3-3 protein beta/alfa	P31946	28		artmış			Geniş spektrumda hem genel hem de özel sinyal yollarında adaptör protein olarak bulunmaktadır.	S
EIF3I, Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 3 altünite I	Q13347	37					Protein sentezinin başlangıç kısmında görev görmekte	S
IPYR, İnorganik pirofosfataz	Q15181	33		artmış			Diphosphate + H <sub>2</sub> O = 2 phosphate Difosfat metabolic prosesinde ve protein translasyonunda	S



							tRNA aminoaçilasyonda görev görür	
STML2, Stomatibenzeri protein 2	Q9UJZ1	39						S
ATP5H, ATP sentaz altünite d	O75947	18					Kompleks V'de ATP Üretimi	Mit
OAT, Ornitine aminotransferaz	P04181	49				artmış	Amino asit biyosentezinde; L-prolin biyosentezinde görev görür	Mit
ACADM, Orta-zincir spesifik asetil-CoA dehidrogenaz	P11310	47	artmış				Lipit metabolizmasında; Mitokondriyal yağ asidi beta oksidasyonu	Mit
VDAC1, Voltaj-bağımlı anyon-seçici kanal protein 1	P21796	31	artmış				Mitokondri dış membranında kanal oluşturarak küçük hidrofilik moleküllerin difüzyonunu sağlar. Plazma membranında ise hücre hacminin düzenlenmesi ve apoptoz ile ilişkilidir.	Mit. Dış Membran Hücre Membranı
AL1B1, Aldehid dehidrogenaz X	P30837	57		azalmış			Alkole bağlı asetaldehit detoksifikasyonu, kortikosteroid metabolizması, biyojenik aminler, nörotransmitterler ve lipit peroksidasyon metabolizmasında rol alır	Mit
ES1, ES1 protein homoloğu	P30042	28	artmış					Mit
MCCB, Metilkrotonil-CoA karboksilaz beta zinciri	Q9HCC0	61	artmış				Amino Asit degradasyonu; L-lösin degradasyonunda görev almaktadır	Mit

CS010, UPF0556 protein C19orf10 (Interlökin-25)	Q969H8	19	artmış					Katlanmamış protein cevabı olarak protein aktivite sinyalinin aktivasyonunda rol almaktadır.	ER Golgi intermediate compartment
DJB11, DnaJ homolog alt aile B üye 11	Q9UBS4	41		azalmış				Co-Şaperon görevi vardır. HSPA5ATPase aktivitesini uyarmaktadır.	ER- Lumen
GALK1, Galaktokinaz	P51570	42					artmış	Galaktoz metabolizmasının majör enzimidir	S
LGUL, Lactoylglutasyon lyase (Galaksilaz I)	Q04760	21	azalmış					TNF ile indüklenmiş NF-kappa-B transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol almaktadır.	S

*S: sitoplazmik, N: nükleer, ER: endoplazmik retikulum, Mit: mitokondri, YT: Yabani Tip*

Elde edilen datanın detaylı analizi proteinlerin regülasyon düzeylerini sayısal olarak gösterdi (Çizelge 4.3.).

**Çizelge 4.3.** Çizelge 4.2.'de tanımlanan proteinlerin regülasyon düzeylerinin rakamsal ifadesi

Swiss-Prot #	Grup Adı	Regülasyon oranı (İnd/unind)	Protein Adı
Q99729	YT indüklenmiş (ind) ile YT indüklenmemiş (unind) karşılaştırıldığında	3.76	Heterojen nüklear ribonükleoprotein A/B
P11310	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	2.56	Orta-zincir spesifik asetil-CoA dehidrogenaz
Q9HCC0	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	2.4	Metilkrotonil-CoA karboksilaz beta zinciri
P21796	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	2.32	Voltaj-bağımlı anyon-seçici kanal protein 1
Q969H8	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	2.1	UPF0556 protein C19orf10 (Interlökin-25)
P14923	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	1.92	Junction plakogloblin (Katanin gama)
P30042	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	1.81	ES1 protein homoloğu
Q04760	YT ind ile YT unind karşılaştırıldığında	0.31	Lactoylglutatiyon lyase Galaksilaz I
O75347	Mut. ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	9.17	Tübilin-spesifik şaperon A
P09936	Mut.ind ile Mut. unind	<b>8.49</b>	<b>Ubikuitin karboksi-uçlu hidrolaz</b>

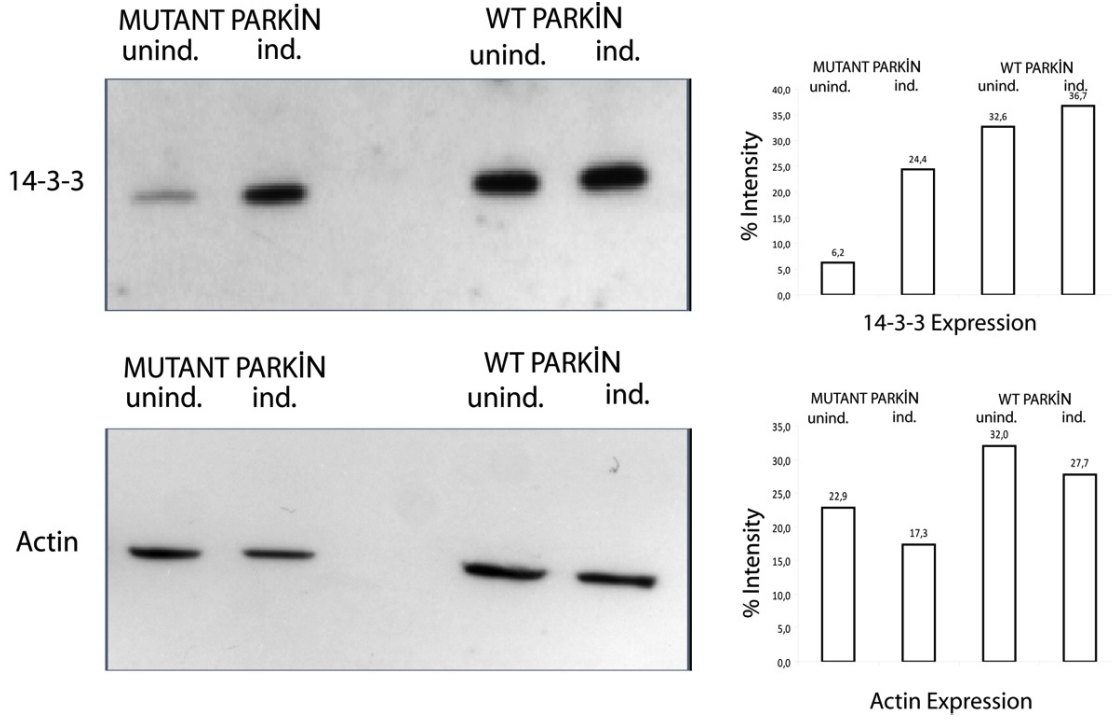
	karşılaştırıldığında		<b>izozim L1 (UHL1)</b>
P31946	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	<b>6.48</b>	<b>14-3-3 protein beta/alpha</b>
O14737	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	5.45	Programlı hücre ölüm proteini 5
Q15181	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	5.12	Inorganik pirofosfataz
P16949	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	4.37	Statmin
P06733	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	3.25	Alfa-enolaz
P17987	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	2.96	T-kompleks protein 1 altünite alfa
P30837	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	0.48	Aldehid dehidrogenaz X
Q9UBS4	Mut.ind ile Mut. unind karşılaştırıldığında	0.47	DnaJ homolog alt ünite B üye 11

2DE-DIGE imajlarının analizleri sonucunda Çizelge 4.3’de verilen proteinlerin ifadelerinde ciddi oranda regülasyonlar olduğu gözlemlendi. Bu belirlenen regülasyonların doğruluğunun test edilebilmesi için western blot metodu kullanıldı. Regüle olan proteinler arasından 14-3-3 (Swiss-Prot # P31946) ve UCH-L1(Swiss-Prot # P09936) proteinleri regülasyon seviyelerindeki yüksek farklılık dolayısı ile seçildi. Yapılan western blot analizinde 14-3-3 proteininin beklenildiği gibi mutant Parkin eksprese eden hücrelerde 5.2 kat daha fazla eksprese olduğu belirlendi (Şekil 4.27.). Aynı şekilde western blot analizi UCH-L1 proteininin de beklenen şekilde mutant Parkin eksprese eden hücrelerde daha fazla eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 4.28.). Bu sonuç DIGE deneyinin güvenilirlik derecesinin yüksek olduğunun bir kanıtıdır.

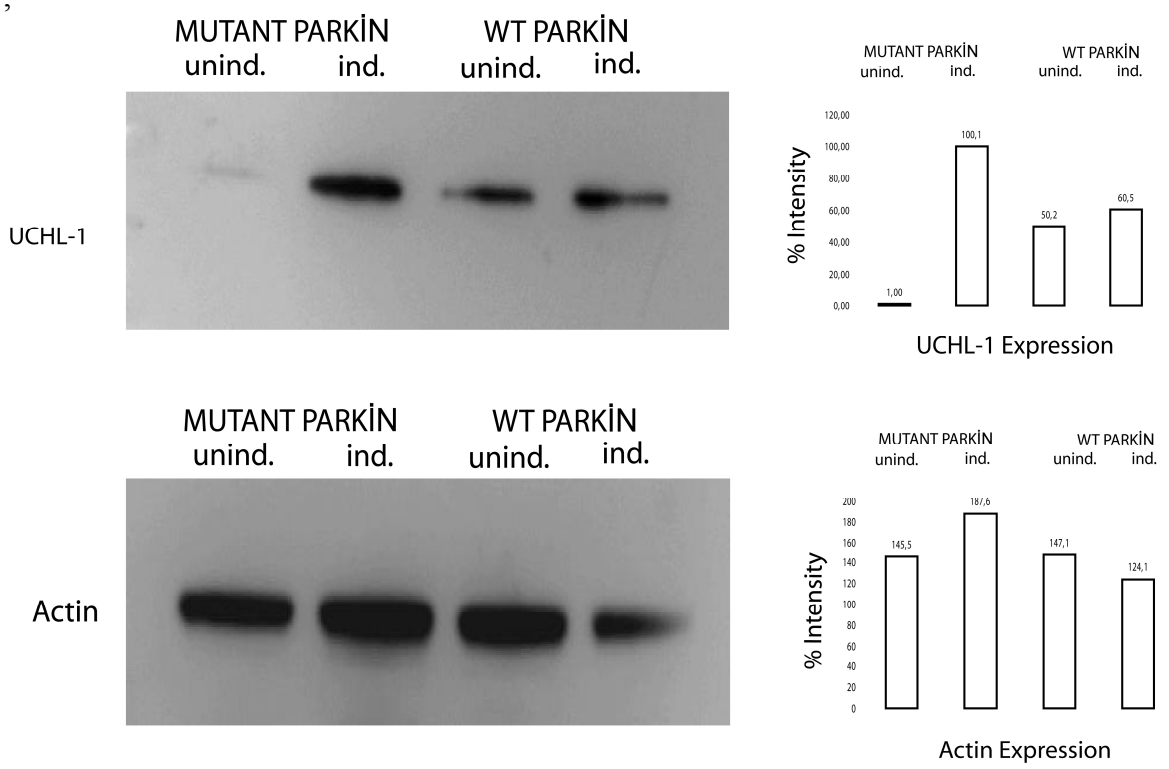
Parkin proteininin mitofaji ile ilişkisi ve Parkinson Hastalığının mitokondriyel dejenerasyonla ilişkisi bilindiğinden dolayı belirlenen proteinlerin her birinin beklenen lokalizasyona sahip olduğu düşünüldü. Ancak bu proteinler arasında özellikle endoplazmik retikulum ve ER-Golgi ara kompartmanı (ER- Golgi intermediate compartment: ERGIC) hücre kompartmanlarında rol alan proteinlerinde belirlenmiş olması Parkin proteininin bilinen yolların dışında başka yollarda da görev alabileceğine işaret etti. Literatürden elde ettiğimiz bilgiler belirlediğimiz proteinlerden bazılarının parkin ile ilişkili olduğunu göstermekte idi (Çizelge 4.4.).

Ancak belirlediğimiz diğer bazı proteinlerin parkin ile ilişkisi literatürde rapor edilmemiştir ve bu proteinlerin Parkin’e ait yeni substratlar olabileceklerini düşünmekteyiz. Bu düşünceyi doğrulamak amaçlı yapılan canonical yolk analizinde elde edilen protein datasının 2 farklı hastalık ile ilişkili olduğu görüldü. Bu hastalıklardan ilki Parkinson Hastalığı, diğeri de Multiple Sclerosis idi (Şekil 4.29.).

Regüle olan proteinler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarabilmek için IPA analizleri yapıldı. IPA analizleri sonuçları bulunan proteinlerin üç farklı protein ağında görev aldığını gösterdi. Bunlardan ilki hücreler arası sinyal ve etkileşim yolları (Şekil 4.30.), ikincisi transkripsiyonun düzenlenmesi yolları (Şekil 4.31.) ve üçüncüsü ise mitokondriyal metabolizma yolları (Şekil 4.32.) idi. Bu üç ağın birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan protein yolları arasındaki etkileşimler şekilde verilmiştir. (Şekil 4.33)



**Şekil 4.27.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin ekspresyonunun indüklendiği ve indüklenmediği hücrelerden elde edilen protein özütleri ile 14-3-3 proteininin western blot taraması. Aktin western blotu internal kontrol amacı ile yapılmıştır.



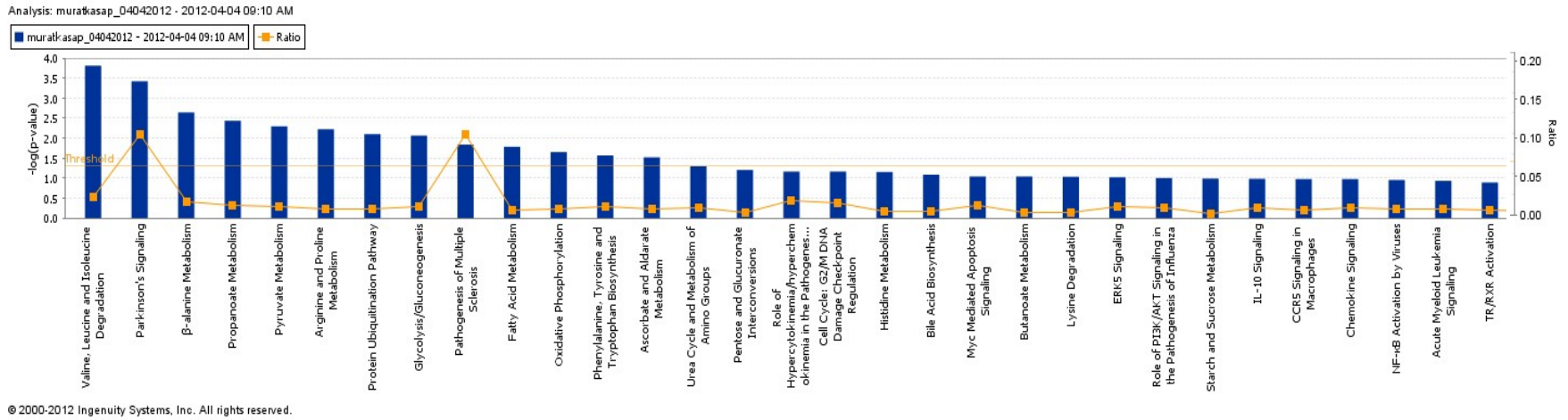
**Şekil 4.28.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin ekspresyonunun indüklendiği ve indüklenmediği hücrelerden elde edilen protein özütleri ile UCH-L1 proteininin western blot taraması. Aktin western blotu internal kontrol amacı ile yapılmıştır.

**Çizelge 4.4.** Literatürde Parkin ile ilişkisi belirlenerek çalışılan proteinler ve 2DE-DIGE analizi sonucu bulunan proteinlerin karşılaştırmalı tablosu

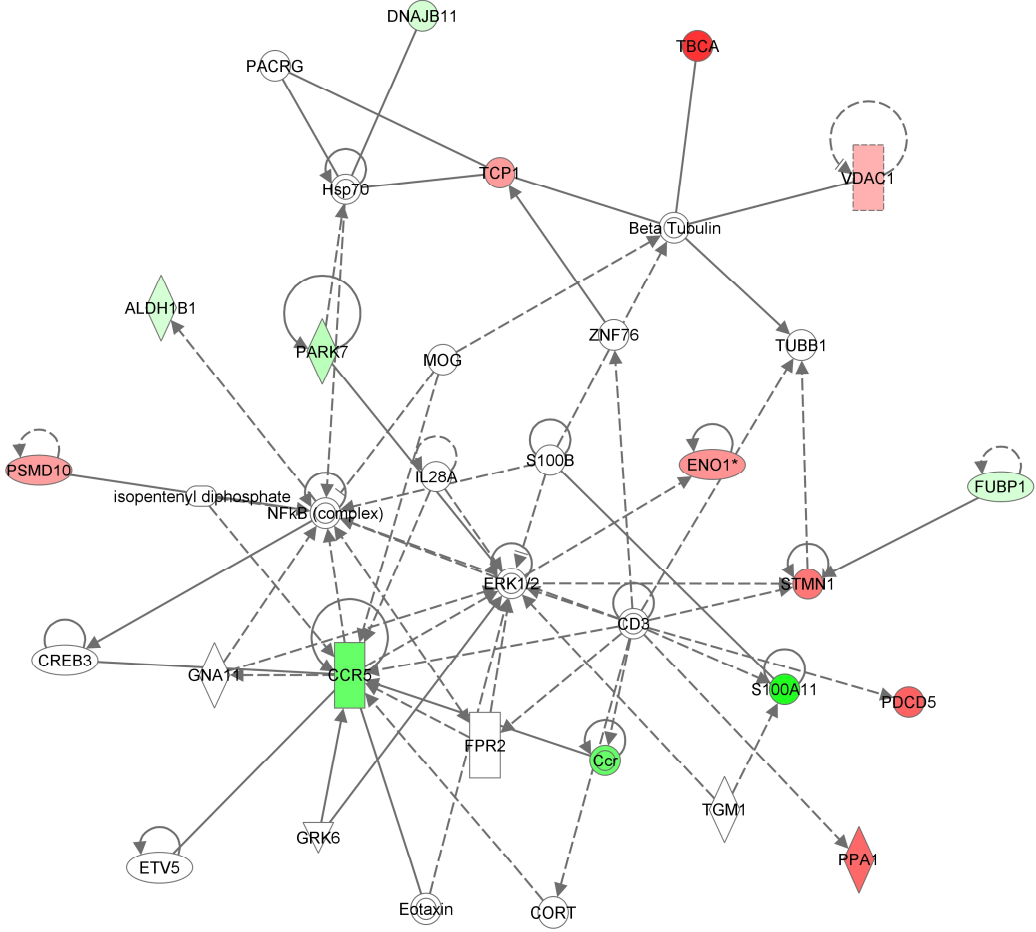
<b>Protein ismi</b>	<b>Overeksprese Parkin sonucu ekspresyonu değişmiş proteinler</b>	<b>Referanslar</b>
<b>HNRNP</b> <b>Heterojen nüklear ribonükleoprotein</b>	HNRNPK Parkin indüklenmiş hücrelerde 9.1 kat azalmış	Davison et al., 2009
	HNRNPA/B yabani tip Parkin indüklenmiş hücrelerde 3.76 kat artmış	2DE-DIGE çalışmamız
	HNRPD ve HNRDL Mutant Parkin indüklenmiş hücrelerde artmış	2DE-Fosfoproteomiks çalışmamız
<b>Ubikuitin karboksüçlü hidrolaz izozim L1</b> <b>UCH-L1</b>	Ekspresyon seviyesi belirtilmemiş	Davison et al., 2009
	Parkin KO farelerde ekspresyonu artmış	Periquet et al., 2005
	PD hasta beyininde ekspresyonu azalmış	Choi et al., 2004
	Mutant Parkin indüklenmiş hücrelerde 8.49 kat artmış	2DE-DIGE çalışmamız
<b>14-3-3 protein</b>	ζ/d formu MPTP fare – mitokondri SN'da azalmış	Jin et al., 2005
	ζ/d formu Parkin KO farelerde ekspresyonu azalmış	Periquet et al., 2005
	ζ ve ε formaları ekspresyon seviyesi belirtilmemiş	Davison et al., 2009
	Parkin indüklenmiş hücrelerde görülmemiş	Davison et al., 2009
	α/β formu mutant Parkin indüklenmiş hücrelerde 6.48 kat artmış	2DE-DIGE çalışmamız
<b>Vimentin</b>	PRDX6 Parkin indüklenmiş hücrelerde hiç görülmemiş	Davison et al., 2009



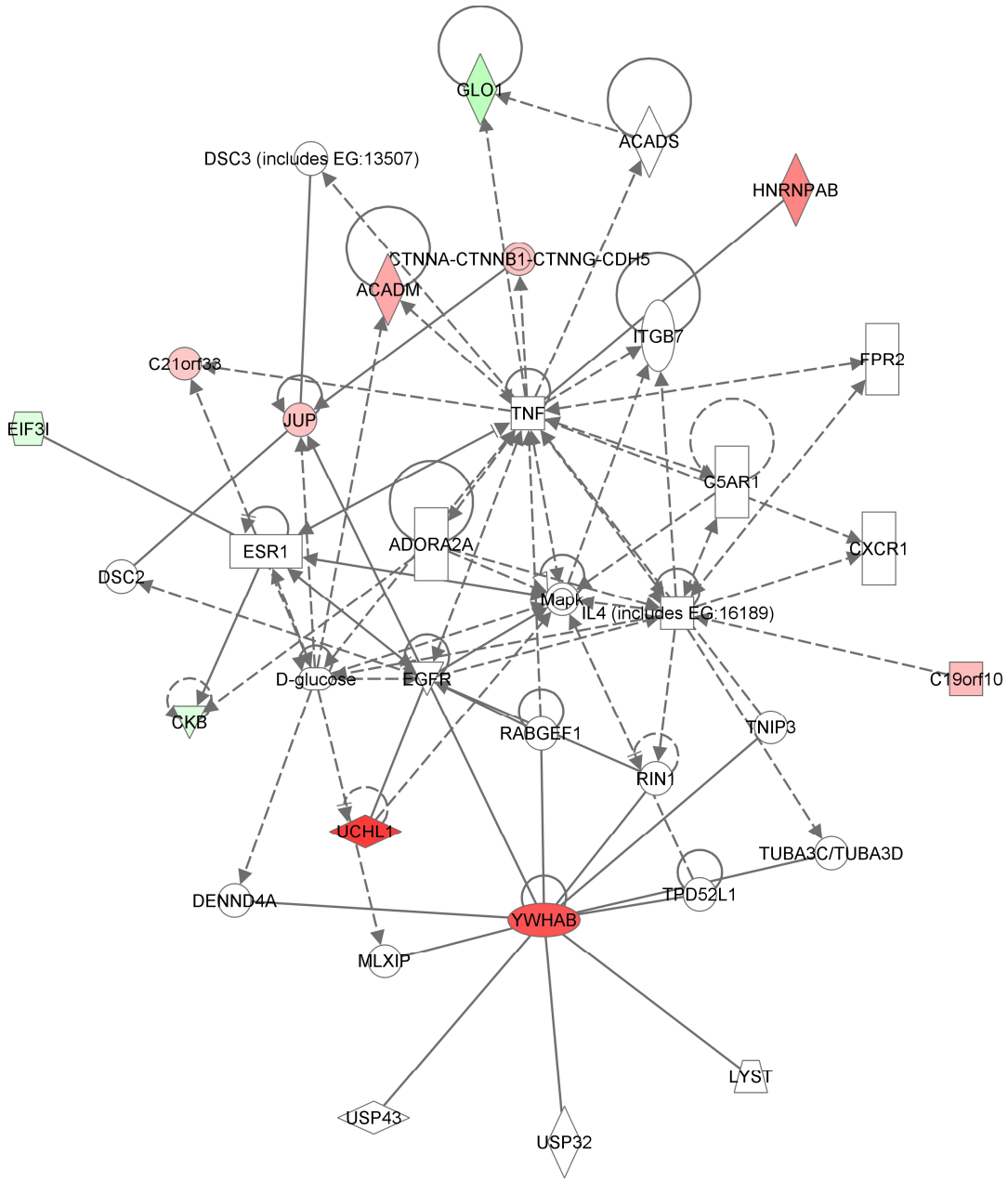
	Mutant Parkin indüklenmiş hücrelerde azalmış	2DE-Fosfoproteomiks çalışmamız
<b>Peroksiredoksin</b>  <b>PRDX</b>	PRDX2 PH hasta beyininde SN artmış	Basso et al., 2004
	Subunit D: PH hasta beyininde SN artmış	Basso et al., 2004
	PRDX3 yaban tip Parkin indüklenmiş hücrelerde artmış	2DE-Fosfoproteomiks çalışmamız
<b>ATP sentaz altünite d</b>  <b>ATP5H</b>	Düşük kalorili beslenen yaşlı fare beyininde azalmış	Poon et al., 2006
	Subunit alfa: yaban tip Parkin indüklenmiş hücrelerde artmış	2DE-Fosfoproteomiks çalışmamız
	Subunit d: Mutant Parkin indüklenmemiş hücrelerde yabani tip Parkin indüklenmemiş hücrelere oranla artmış	2DE-DIGE çalışmamız
<b>Alfa Enolaz</b>  <b>ENO1</b>	A30P-mutant alfa-sinüklein mutant fare beyinlerinde artmış	Poon et al., 2005
	Mutant Parkin indüklenmiş hücrelerde artmış	2DE-DIGE çalışmamız
<b>T-kompleks protein I</b>  <b>TCAP</b>	Parkin KO farelerde Ekspresyon seviyesi fazlaşmış	Periquet et al., 2005
	Mutant Parkin indüklenmiş hücrelerde artmış	2DE-DIGE çalışmamız



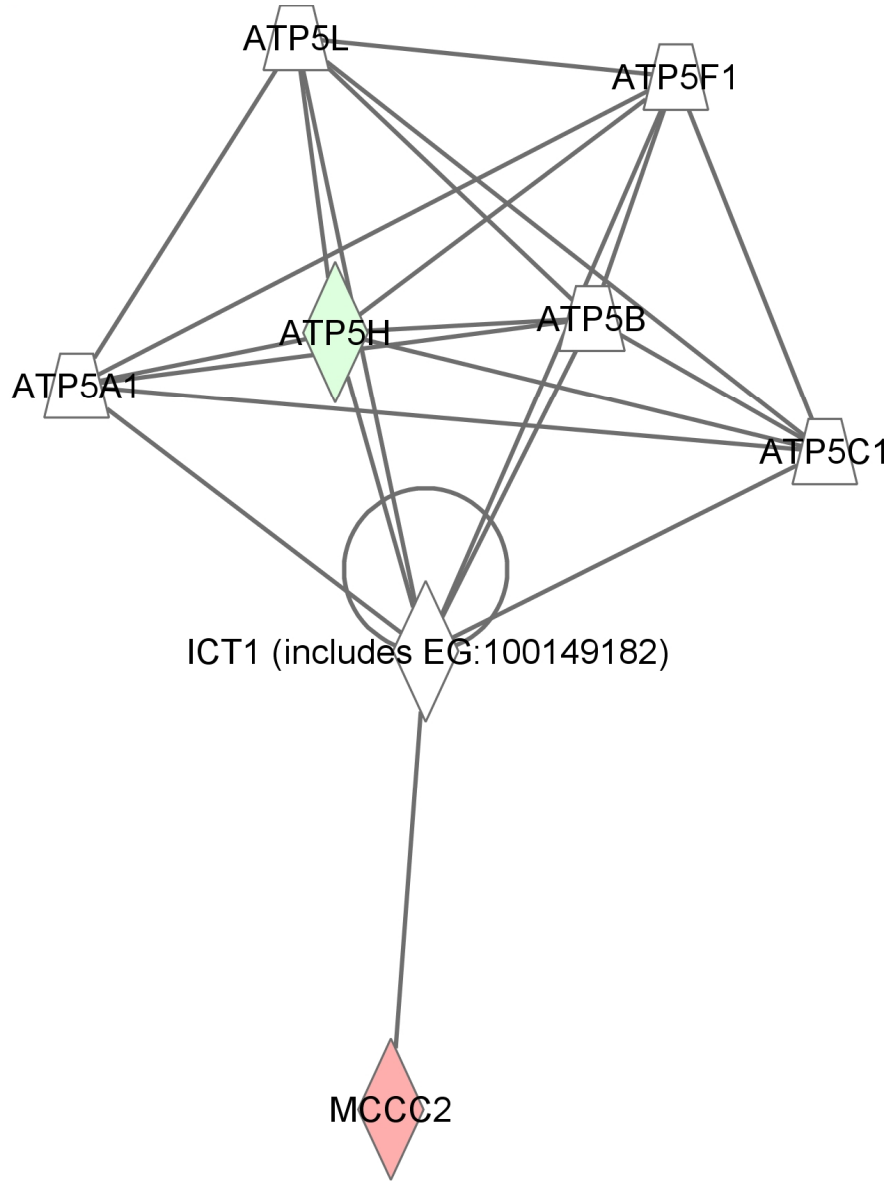
Şekil 4.29. Canonical yolak analizi sonucu regüle olan proteinlerin ilişkilendirildiği yolaklar.



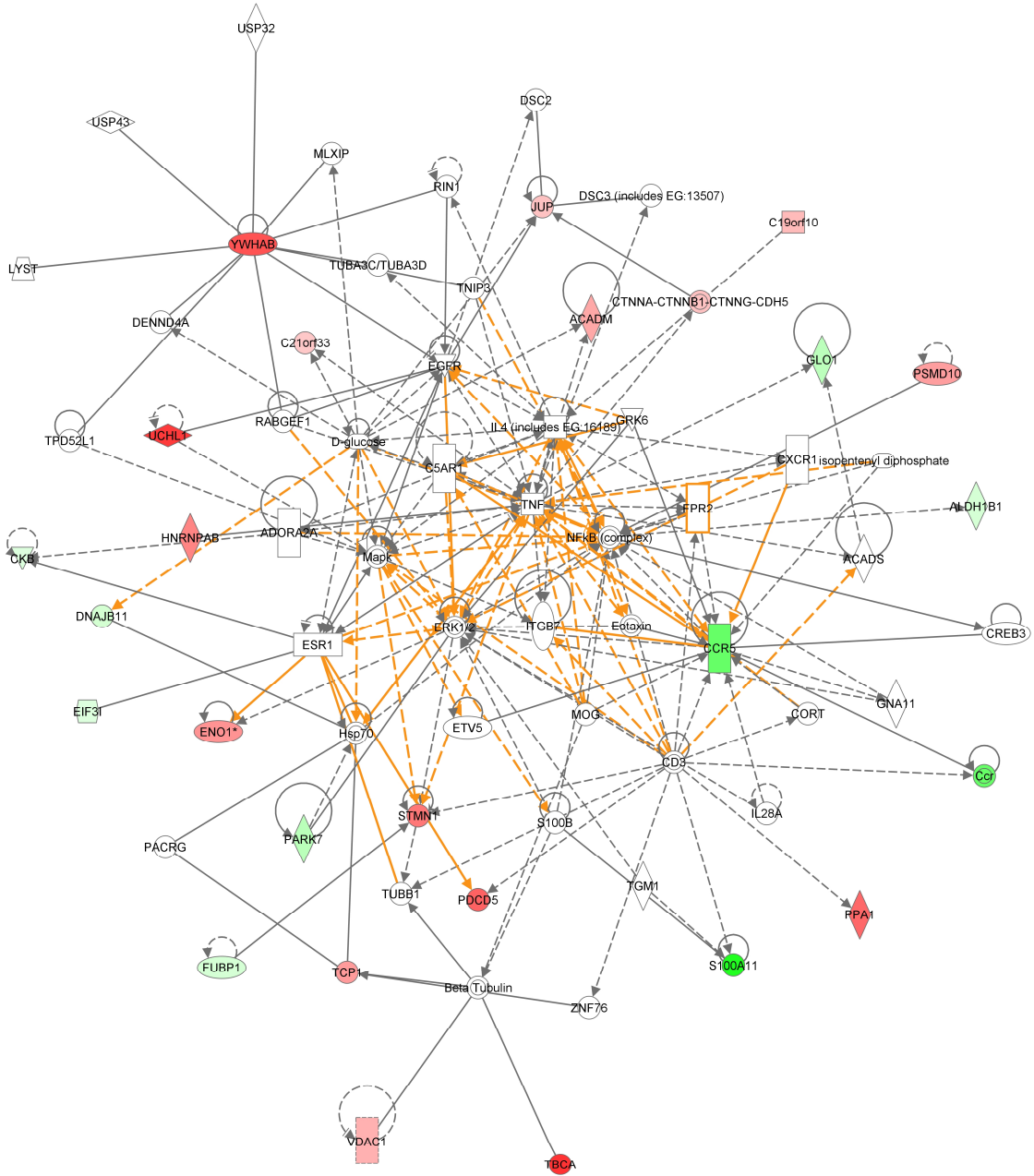
**Şekil 4.30.** IPA analizi sonucu belirlenen sinyal ve etkileşim yolları. Kırmızı: ekspresyonu artmış proteinler, Yeşil: ekspresyonu azalmış proteinler



**Şekil 4.31.** IPA analizi sonucu belirlenen transkripsiyonun düzenlenmesi yolları. Kırmızı: ekspresyonu artmış proteinler, Yeşil: ekspresyonu azalmış proteinler



**Şekil 4.32.** IPA analizi sonucu belirlenen mitokondriyal metabolizma yolları. Kırmızı: ekspresyonu artmış proteinler, Yeşil: ekspresyonu azalmış proteinler

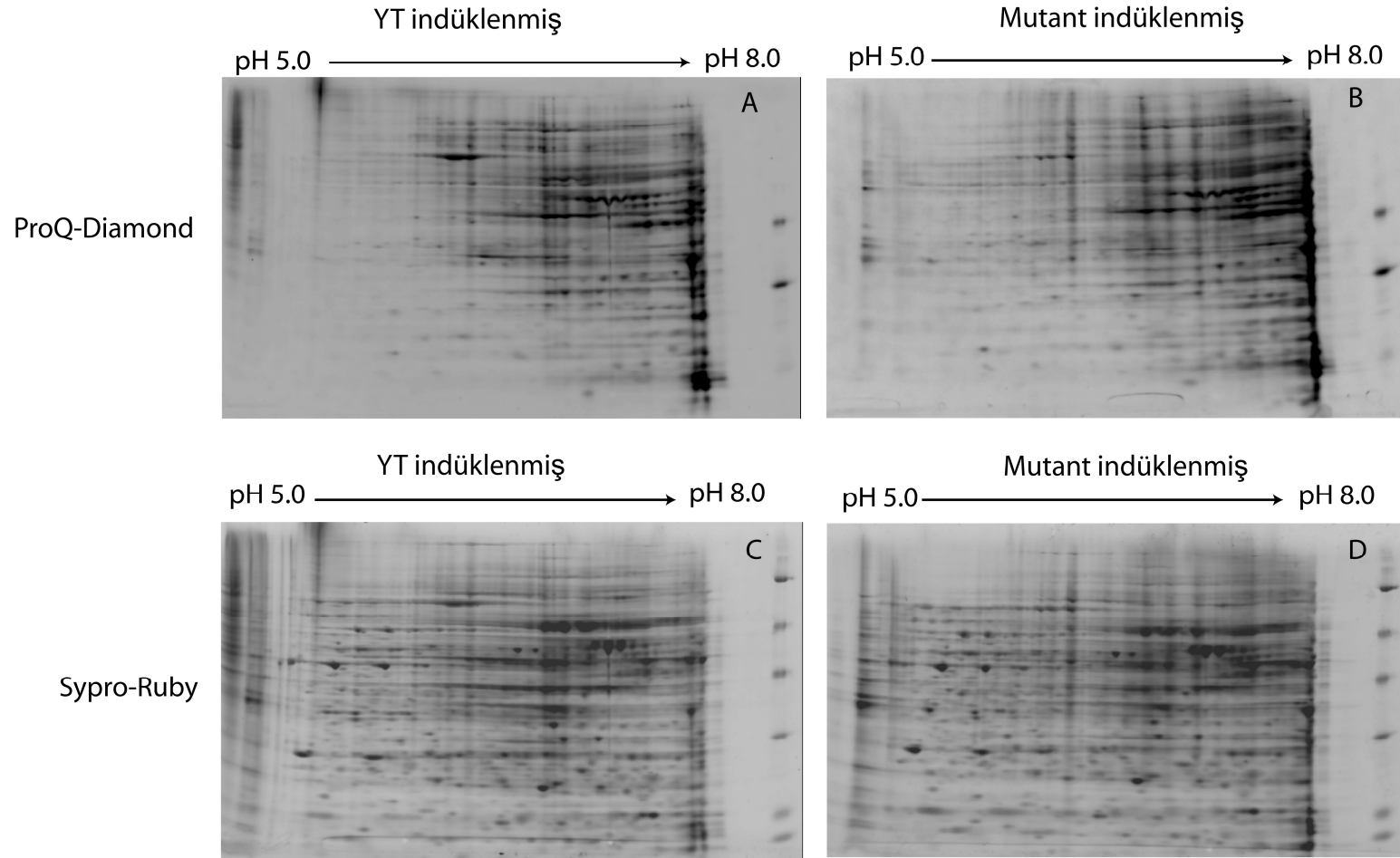


**Şekil 4.33.** Üç farklı etkileşim yolağının birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan protein yolları arasındaki etkileşimler. Kırmızı: ekspresyonu artmış proteinler, Yeşil: ekspresyonu azalmış proteinler.

#### **4.2.5.2. Yabani Tip ve Mutant Parkin Proteinlerini Stabil Eksprese Eden SH-SY5Y Hücrelerinin Fosfoprotein Profillerinin Karşılaştırılması**

Parkinson Hastalığının hücre içerisinde hangi sinyal yollarını etkilediği detaylı olarak bilinmemektedir. Böyle bir bilginin ortaya çıkabilmesi için kullanılacak deneysel yaklaşımlardan birisi hücrenin fosforilasyon statüsündeki değişikliklerin incelenmesidir. Bu amaçla çalışmamızda fosfoproteom yaklaşımı kullanıldı. Bu yaklaşımda fosforile olmuş proteinleri spesifik olarak boyayan ProQ-Diamond (LifeSciences, ABD) boyası ve fosfoprotein normalizasyonunu sağlayan PeperMint protein markerı (LifeSciences, ABD) kullanıldı. 2DE jeller önce ProQ-Diamond boyası ile daha sonra Sypro-Ruby floresan boyası ile boyanarak analiz edildi (Şekil 4.34.). PDQuest Advance programı ile yapılan analizler sonucunda 13 protein spotundaki değişim anlamlı bulundu. Bu proteinlerden 7 tanesinin ekspresyon seviyesi yabani tip Parkin eksprese edenlerde hücrelerde artmıştır. 5 tanesinin ekspresyon seviyesi mutant tip Parkin eksprese edenlerde hücrelerde artmış iken 1 tanesinin azalmıştır (Çizelge 4.5.). Ayrıca tanımlanan proteinlerin üç tanesinin mitokondriyal, dokuz tanesinin sitoplazmik ve bir tanesinin ise karakterize edilmemiş protein olduğu belirlendi.

Regüle olan proteinler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarabilmek için IPA analizleri yapıldı. IPA analizleri sonuçları bulunan fosfoproteinler glukoneogenesis I, glikoliziz I, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve sükröz dejenerasyonu gibi enerji metabolizmasını etkileyen yollarla ilişkili bulundu. Bulunan bu proteinler arasındaki etkileşimler Şekil 4.35.'de verilmiştir.



**Şekil 4.34.** Yabani tip ve mutant Parkin proteinlerini eksprese eden SH-SY5Y hücre protein özütlerinin ProQ-Diamond ve Sypro-Ruby floresan boyaması sonrası 2DE jel imajları.

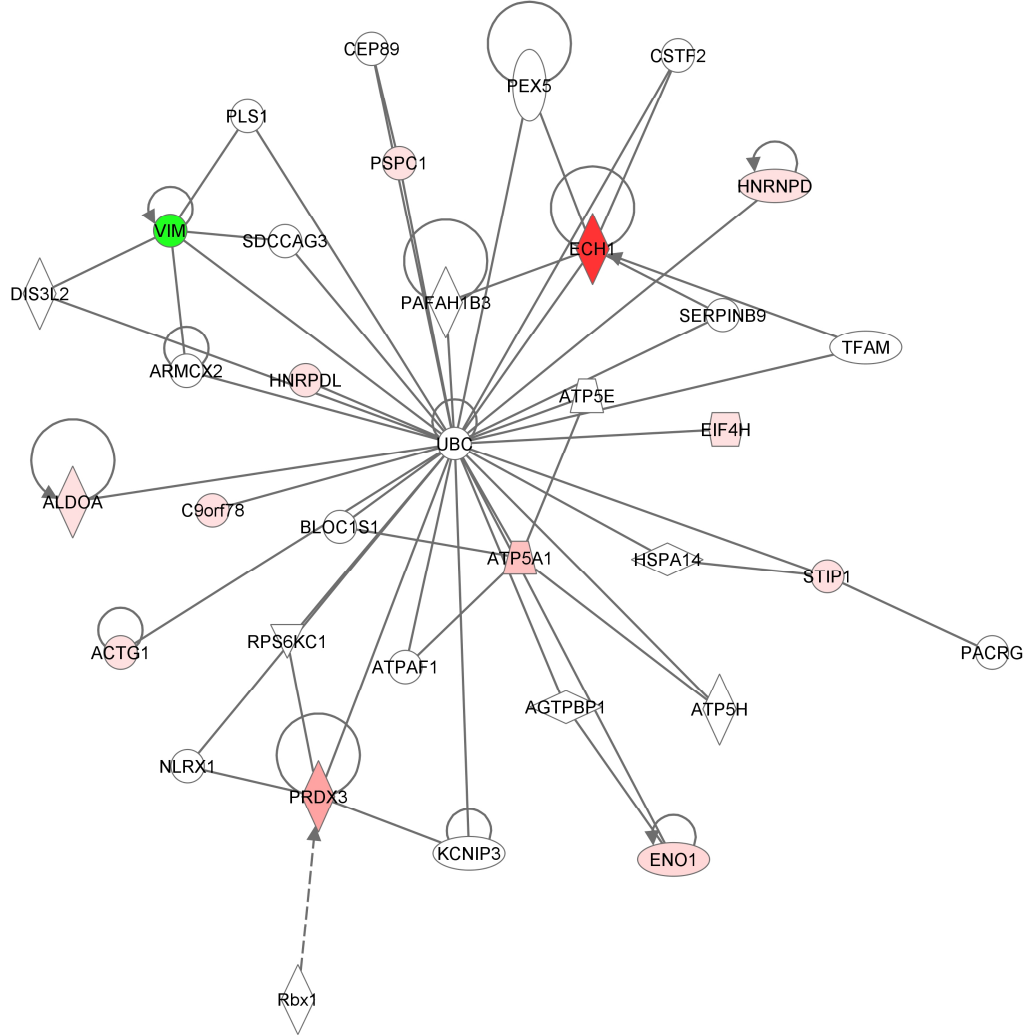


**Çizelge 4.5.** Fosfoproteomiks ile SH-SY5Y hücresi içerisinde ekspresyonu indüklenmiş yabancı tip ve mutant Parkinin hücrenin fosforile olan protein profilinde etkilendiği görülen proteinler ve görevleri

Belirlenen Proteinler	Swiss Prot Ulaşım #	Moleküler Ağırlık (kDa)	YT Parkin indüklenmiş karşı indüklenmemiş	Mutant Parkin indüklenmiş karşı indüklenmemiş	Fonksiyonu	Hücre içindeki yeri	PTM*
ENO1, Alfa enolaz	P06733	47	3.91 kat artmış		Glikoliz Plasminojen aktivasyonu Transkripsiyonun düzenlenmesi	Hücre membranı Sitoplazma Nükleus	Fosforilasyon Asetilasyon Ubl conjugation
ALDOA, Fruktoz bifosfat aldolaz A	P04075	39	3.07 kat artmış		Glikoliz		Fosforilasyon Asetilasyon
STIP1, Stres indüklenmiş fosfoprotein 1	P31948	62	3.17 kat artmış		HSC70 ve HSP90 şaperonlarını biraraya getirir	Sitoplazma Nükleus	Fosforilasyon Asetilasyon
VIM, Vimentin	P08670	53		2.05 kat azalmış	Host virüs interaksyonu	Sitoplazma Intermediate Flamentler	Fosforilasyon Asetilasyon
PSPC1, Paraspeckle component 1	Q8WXF1	58		1.8 kat artmış	Transkripsiyon ve regülasyonu	Sitoplazma Nükleus	Fosforilasyon Asetilasyon
HNRPD, Heterojen nüklear ribonükleoprotein D	Q14103	38		1.12 kat artmış	Transkripsiyon ve regülasyonu	Sitoplazma Nükleus	Fosforilasyon Asetilasyon Metilasyon
HNRDL, Heterojen nüklear ribonükleoprotein D	O14979	46		2.26 kat artmış	Transkripsiyon ve regülasyonu	Sitoplazma	Fosforilasyon

benzeri						Nükleus	Asetilasyon Metilasyon
IF4H, Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4H	Q15056	27		2.44 kat artmış	Host-virus interaction protein biosynthesis	Sitoplazma	Fosforilasyon Asetilasyon
ACTG, Aktin sitoplazmik 2	P63261	41		1.03 kat artmış	Sitoplazma		Fosforilasyon Asetilasyon Metilasyon
ECH1, Delta 3 5 Delta 2 4 dienoyl CoA izomeraz	Q13011	35	20.41 kat artmış		Yağ aside metabolizması Lipid metabolism	Mitokondri Peroksizom	Fosforilasyon Asetilasyon
PRDX3, Tioredoksin bağımlı peroksit redüktaz	P30048	27	9.23 kat artmış		Redox düzenlenmesinde Peroksidaz aktivitesi	Mitokondri	Fosforilasyon Asetilasyon Disülfüt Bağ
ATPA, ATP sentaz alt ünite alfa	P25705	62	6.28 kat artmış		ATP synthesis Hydrogen ion transport İyon transport Transport	Hücre membran Membran Mitochondrion Mitochondrion iç membran	Fosforilasyon Asetilasyon Pyrolidone karboksilik asit
CI078 Karakterize edilmemiş protein C9orf78	Q9NZ63	33	3.14 kat artmış			Sitoplazma Nükleus	Fosforilasyon

\*: PTM'lere ilişkin bilgiler Swiss-Prot data bankasından alınmıştır (<http://www.uniprot.org>)



**Şekil 4.35.** IPA analizi ile fosfoproteomiks sonucu ekspresyonu değişen proteinler arasındaki etkileşimler. Kırmızı: ekspresyonu artmış proteinler, Yeşil: ekspresyonu azalmış proteinler.

## 5. TARTIŞMA

Parkinson Hastalığı tanısı zor olan hastalıklar arasındadır. Hastalığın insan yaşam kalitesini ne kadar etkilediği düşünülecek olursa, bu hastalığa çare bulmanın gerekliliğinin de ne derece önemli olduğu ortaya çıkar. Bu nedenledir ki dünya çapında bir çok laboratuvar ve araştırma merkezi bu konuda çalışmakta, bir çok dernek bu araştırmalara destek vermekte hatta bireysel destekli araştırmalar dahi yapılmaktadır. Bu araştırmaların bir kısmı klinik kökenli olsa dahi çoğunluğu hastalığın temel mekanizmasını anlamaya yöneliktir. Çünkü mekanizması anlaşılan bir hastalık (1) Erken teşhis edilebilir (2) Prognozu takip edilebilir ve (3) Tedavi edilebilir. Şu an için PH'nın erken teşhisi ve kökten tedavisi mümkün değildir.

PH'nın kompleks bir hastalık oluşu moleküler mekanizmasının anlaşılmasını da zorlaştırmaktadır. Başka bir ifade ile PH çevresel ve genetik faktörlerin bileşkesidir. Bu bileşkenin öğelerini tek tek ortaya çıkarmak hastalığın oluşumunda önleyici tedbirler almamıza yarayacaktır. Ancak çevresel faktörler çok bilinmeyenli bir matematiksel denklemdir ve bilinmeyenlerin çözümü mümkün olmayabilir. Genetik faktörler üzerinde çalışmak hem hastalığı anlama adına hem de teşhis ve tedavisi adına avantajlar teşkil edecektir. Sunduğumuz bu doktora çalışması PH oluşumunda etkili olan ve özellikle erken başlayan PH'ya sebep olabilen *Park2* geni ve onun kodladığı Parkin proteini üzerinedir.

*Park2* geninde bulunan mutasyonların % 50'si otozomal resesif erken başlangıçlı PH ile ilişkilendirilmiştir (Lucking et al., 2000). Şimdiye kadar literatürde *Park2* genine ait 214 mutasyon tanımlanmıştır. Belirlenen bu mutasyonların hepsinin protein fonksiyonu üzerine etkisi ve hastalıkla olan ilişkisi tam olarak çalışılmamış olsa da bu mutasyonların 128'i patojenik olarak sınıflandırılmıştır (<http://www.molgen.vib-ua.be/PDmutDB>). Araştırmacılar *Park2* geninde tespit edilen mutasyonlarının popülasyona özgü olduğunu görüşündedirler (Djarmati et al., 2004; Gaweda-Walerych et al., 2012). *Park2* genine ait farklı mutasyon frekansları mevcuttur ve bu frekanslar farklı etnik gruplara göre değişkenlik göstermektedir. Brezilyada Parkin mutasyon frekans alanı % 8 iken Güney Afrika'daki hastalarda bu oran % 21'dir (Periquet et al., 2003). Etnik olarak homojen erken başlangıçlı PH örneklerinden yapılan mutasyon frekansı farklılıklarına bakıldığında Japonlarda % 66 (Hattori et al., 1998), Kuzey tyroleanslarda % 33 (Hedrich et al., 2001) ve Almanlarda % 9 (Kann et al., 2002) olarak büyük farklılıklar göstermektedir. Şimdiye kadar *Park2* geninde bir çok mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan proteinin fonksiyonunu ve yapısı etkileyenler patojenik olarak nitelendirilmiştir. *Park2* geninde ilk

belirlenen nokta mutasyonu Hattori ve arkadaşlarının Türk bir ailede tespit ettiği Ekson 6'daki Thr240Arg ve Ekson 8'deki Gln311Stop mutasyonlarıdır (Hattori, et al., 1998; Kitada et al., 1998). Daha sonra tüm eksonların dizilenmesi ile Lys161Asn, Arg256Cys, Arg275Trp, Thr415Asn, Trp453Stop (Abbas et al., 1999), Cys212Tyr (Pineda-Trujillo et al., 2001), Cys268Stop, Gly328Glu, Arg334Cys, Gly430Asp, Asp280Asn, Cys289Gly (Lucking et al., 2000) gibi bir çok farklı etnik grupta farklı mutasyonlar tespit edilmiş ve otozomal resesif geçişli PH'nın yaygın sebebi olarak literatüre kazandırılmıştır. Şimdiye kadar tespit edilen bu mutasyonlar ki özellikle protein fonksiyonunu etkileyen ekson delesyonları, yanlış anlamlı mutasyonlar ve tranke mutasyonlar hastalığın klinik tablosu ile karşılaştırıldığında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir (Abbas et al., 1999; Lucking et al., 2000). Çeşitli nokta mutasyonlarının Parkin'in UBL ve RING-IBR-RING domainlerindeki korunmuş bölgelerinde bulunması ve Parkin proteininde fonksiyon kaybının görülmesi bu mutasyonların hastalık ile ilişkilendirilmesine neden olmaktadır (Zhanga, 2001). Literatürde *Park2* geni üzerindeki mutasyonların PH oluşumunda majör etkisinin olmadığını belirten çalışmalar mevcuttur (Kay et al., 2010; Lincoln et al., 2003). Kay ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma Parkin ile yapılmış en geniş popülasyon genetiği çalışmasıdır. Çalışmada *Park2* delesyonlarının, multiplikasyonlarının, kopya sayısı varyasyonlarının ve nadir dizi varyantlarının (nokta mutasyonlarının) sadece hastalıklı popülasyonlarda görülmediği aynı zamanda kontrol popülasyonunda da görüldüğü gösterilmiştir. Örneğin kontrol grubunun % 3'ünde Parkin üzerinde nokta mutasyonları gösterilmiştir (Kay et al., 2010). Başka bir çalışma da benzer şekilde nokta mutasyonları ve eksonik delesyon/duplikasyonlar hem hastalıklı (% 3.8) bireylerde hem de kontrol grubunda (% 3.1) benzer frekans ile belirlenmiştir (Lincoln et al., 2003).

Bu çalışmada *Park2* geninde karakterize edilmeye çalışılan iki adet yanlış anlamlı mutasyon [932 (A >G); Gln311→Arg ve 1111 (G > A); Ala371 →Thr] vardır. Belirlenen iki adet yanlış anlamlı mutasyonlardan Ala371Thr mutasyonu PH oluşum riskini arttıran faktörlerden biri olabilir. Bu mutasyon 371. amino asit pozisyonunda olup yapılan ConSurf analizinde Parkin'in IBR domaininin yüksek oranda değişken bir bölgesinde olduğu görülmüştür (Kasap ve ark., 2007). Yapılan yapısal analiz çalışmaları IBR domaininin protein geometrisinin stabilizasyonundan ve iki RING domaininin oriyantasyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Beasley et al., 2007). Alanin amino asidi polar olmayan hidrofobik bir amino asit iken treonin polar yüksüz bir amino asittir. Bundan dolayı Ala371Thr değişimi E2 protein ubikuitin konjuge edici enzim ile olan interaksyonunun azalmasına hatta siniplin ve p38 gibi etkileşimde olduğu substratlar ile zayıf bağlanmalar

yapmasına sebep olabilir. Ayrıca mutant Parkin'deki alanin amino asidi yerine geçmiş olan treonin amino asidi fosforilasyon açısından uygun bir amino asit olabilmektedir. Western blot sonucu protein bantlarında görülen moleküler ağırlık farkı bu amino asidin fosforile olmasından kaynaklanabilmektedir. Fosforilasyonun da protein aktivitesini etkileyen faktörlerden biri olduğu düşünülürse bu amino asit değişiminin proteinin yapısını ve fonksiyonunu etkileyebileceğini söyleyebiliriz. Modelleme ve ConSurf analiz çalışmalarımız sonucunda ulaştığımız tahminler bir diğer mutasyon olan Gln311Arg değişiminin proteinin yapısını ve fonksiyonunu etkilemediği yönündedir. Çünkü glutamin arjinin amino asit değişimi konum olarak RING1 ve IBR domaini arasında bulunmaktadır. Ancak yapılan SIFT Data bankası araştırması (Ng and Henikoff, 2003) her iki pozisyondaki değişiminde (Gln311→Arg ve Ala371 →Thr) tolere edilemeyecek değişimler olduğunu göstermektedir. Sonuçta *Park2* genindeki bir yanlış okuma mutasyonunun erken başlangıçlı PH'ya sebep olup olmadığını tahmin edebilmenin yolu bu mutasyonların Parkin fonksiyonunu ve yapısını etkileyip etkilemediğine bakmaktan geçer. Bu çalışma bu açıdan da değer ifade etmektedir.

Parkin E3 ubiquitin ligaz aktivitesinin yanında bir çok farklı hücrel proseslerde görev alan geniş spektrumlu bir proteindir. Parkinin en önemli fonksiyonu UPS'de degradasyona gönderilecek proteinlere ubiquitin ekleyerek onları parçalanmak üzere proteozoma yönlendirmesidir (Shimura et al., 2000). Parkin'in hedef proteine ubiquitini farklı lizin bölgelerinden çoklu ya da tekli eklemesi ile sadece proteinlerin degradasyonunu değil DNA onarımı, membran trafiği, protein kinaz aktivasyonu (NF-kappaB sinyal yolağı), kromatin dinamiği, transkripsiyonel regülasyonu (da Costa et al., 2009; Okui et al., 2005) ve diğer proteozomal olmayan yollar gibi bir çok farklı hücrel proseslerin düzenlenmesini de sağlamaktadır (Chen and Sun, 2009; Hoeller et al., 2006; Spence et al., 1995). Parkin ayrıca nöron koruyucu görevi ile dopaminerjik dejenerasyona karşı hücreyi korumakta (Klein et al., 2006; Petrucelli et al., 2002; Wang et al., 2005), depolarize ve frangmente mitokondriyi mitofajiye yönlendirerek mitokondri fonksiyonunu düzenlemekte, mitokondriyal transkripsiyonu ve replikasyonu arttırmakta (Kuroda et al., 2006; Rothfuss et al., 2009) ve kanserleşmede (Devine et al.; Devine et al., 2011) potansiyel etkiye sahip olmaktadır. Parkin'in görev aldığı farklı bir çok yolak etkileşimde olduğu olası substratların belirlenmesi ile aydınlatılmaktadır. Çalışmalarda yeast two hibrit sistemi, immün çöktürme, GST-pull down yaklaşımı ve en önemlisi proteomiks gibi güçlü sonuçlar veren moleküler yaklaşımlar kullanılarak olası Parkin substratları belirlenmektedir. Örneğin yeast two hibrit sisteminde Parkin proteini yem olarak

kullanılarak SEPT5 (CdCrel-1) (Zhang et al., 2000), SEPT4 (CDCrel-2) (P. Choi et al., 2003), Pael-R (Imai et al., 2001), p38/JTV-1 (Ko et al., 2005), synaptotagmin XI (Huynh et al., 2003),  $\alpha/\beta$ -tubulin (Ren et al., 2003), RanBP2 (Um et al., 2006), PDCD2-1 (Fukae et al., 2009), PARIS (Shin et al., 2011), immun çöktürme metodu kullanılarak ise  $\alpha$ SP22 (Shimura et al., 2001), siklin E (Staropoli et al., 2003), IKK $\gamma$  and TRAF2 (Henn et al., 2007) proteinleri olası Parkin substratları olarak belirlenmiştir.

Proteomiks yaklaşımlar ile belirlenen proteinlerin tanımlanabilmesi ve fonksiyonunun araştırılabilmesi olanağı araştırmacıların protein çalışmalarında bu alana yönelmesini sağlamıştır. RNA seviyesindeki değişimlerin protein düzeyine yansımaması ve translasyon sonrası değişimlerin (PTM) genomik araştırmalar ile belirlenememesi genomiks ve transkriptomiks çalışmalarının sınırlayıcı yönleridir. Proteinler ile doğrudan çalışma olanağı sağlayan proteomiks ile hastalık durumunda doku ve hücre seviyesinde değişen protein profilleri incelenebilmekte, PTM değişimleri belirlenebilmekte, belirli durum ve anda protein miktar tayini yapılabilmekte ve protein-protein ilişkileri ortaya konulabilmektedir. Çalışılmak istenen genin susturulması ve ya çok fazla ekspresyonu, farklı kimyasal ajanlar ile muamele edilmiş doku ve ya hücre grubundaki protein değişimi, yabancı tip ve mutant protein formlarının tüm hücre protein profiline etkisi ve son olarak da sağlıklı ve hasta doku protein profillerinin karşılaştırmalı analizi proteomiks yaklaşımlar ile belirlenebilmektedir. Parkinson Hastalığı çalışmalarında da araştırmacılar proteomiksi kullanarak hastalığın oluşumuna sebep olan proteinleri ve fonksiyonlarını aydınlatmaya çalışmışlardır. Davison ve arkadaşları 2DE proteomiks ile HEK293 hücrelerinde indüklenmiş Parkin ekspresyonunun hücre proteomunu nasıl etkilediğini ve olası parkin substratı olabilecek proteinleri belirlemişlerdir (Davison et al., 2009). Benzer bir yaklaşım ile Periquet ve arkadaşları yabancı tip Parkin'i sentezleyen fareler ile ve *Park2* geni susturulmuş farelerin (Knockout (KO)) beyin cortex ve striatum bölgelerini proteomiks ile karşılaştırmış ve ekspresyon profilleri değişen olası Parkin substratlarını belirlemişlerdir (Periquet et al., 2005). Basso ve arkadaşları 2DE proteomiks yaklaşımı ile Parkinson hasta ve kontrol gruplarının SN proteomunu analiz ederek ekspresyon profili değişen proteinleri belirlemişlerdir (Basso et al., 2004). Poon ve arkadaşları ise A30P mutant alfa sinüklein proteinini overeksprese eden transgenik fare beyinlerinin tüm protein profillerini proteomiks yaklaşımlar ile inceleyerek ekspresyon seviyesi değişen proteinleri belirlemişlerdir (Poon et al., 2005). Ancak bu çalışmalarda belirlenen proteinler arasında genel bir uyum yoktur. Çalışmalar arasında benzer bulunan proteinler olmasına rağmen

(Çizelge 4.4.) farklılıklar görülmesinin nedeni kullanılan yaklaşımların farklı olmasıdır. Bu tez çalışmasında ise daha güvenilir bir yaklaşım kullanılarak yabani tip ve mutant Parkin proteinlerini kontrollü eksprese eden nöroblastoma SH-SY5Y stabil hücre hatlarının protein ekspresyon profilleri 2DE-DIGE yapılarak incelenmiş ve olası parkin substratları belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan 2DE-DIGE çalışmasında toplam 28 adet proteinde anlamlı değişim belirlenirken, fosfoproteomiks çalışmasında toplamda 13 adet proteinde anlamlı değişim bulunmuştur. Yaptığımız DIGE çalışmasında belirlenen proteinler üç anlamlı hücresele proseste toplanmıştır. Bunlardan ilki hücreler arası sinyal ve etkileşim yollarında görev alan proteinler (Programlı hücre ölüm proteini 5 (PDCD5), 26S proteozom ATPaz olmayan regülatör altünite 10 (PSMD10), Protein S100-A11 (S10AB), Protein DJ-1 (PARK7), Tübilin-spesifik şaperon A (TBCA), Alfa-enolaz (ENOA), Statmin (STMN1), T-kompleks protein 1 altünite alfa (TCPA), Voltaj-bağımlı anyon-seçici kanal protein 1 (VDAC1), DnaJ homolog alt aile B üye 11 (DJB11), Aldehid dehidrogenaz X (AL1B1)), ikincisi transkripsiyonun düzenlenme yollarında görev alan proteinler (Heterojen nükleer ribonükleoprotein A/B (ROAA), Ubikuitin karboksi-uçlu hidrolaz izozim L1 (UCHL1), Junction plakoglobulin (PLAK ve ya JUP), 14-3-3-protein  $\beta/\alpha$  (1433B), Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 3 altünite I (EIF3I), Orta-zincir spesifik asetil-CoA dehidrogenaz (ACADM), ES1 protein homolog (ES1), Protein C19orf10 (CS010)) ve üçüncüsü ise mitokondriyal metabolizma yollarında görev alan proteinlerdir (ATP sentaz altünite d (ATP5H), Metilkrotonil-CoA karboksilaz beta zinciri (MCCB), Ornitine aminotransferaz (OAT)). Yaptığımız çalışmada belirlediğimiz ekspresyon profili değişen proteinlerin bir kısmı Çizelge 4.4'te verilmiştir. Bu proteinler başka araştırmacılar tarafından da belirlenmiştir ve Parkin ile ilişkisi olduğu düşünülen substratlar olarak literatüre kazandırılmıştır.

Bu çalışma sırasında bulunan ve hücreler arası sinyal ve etkileşim yollarında görev alan proteinler düşünüldüğünde bu proteinlerin çoğunun mutant Parkin'i sentezleyen hücrelerde fazla miktarda eksprese edildiği görülmüştür. Mutant Parkin proteininin indüklenmesi ile SH-SY5Y hücrelerinde Programlı hücre ölüm proteini 5, 26S proteosome ATPaz olmayan regülatör altünite 10, Protein S100-A11, Protein DJ-1, Tübilin-spesifik şaperon A, Alfa-enolaz, Stathmin ve T-kompleks protein 1 altünite alfa proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı bunun yanında DnaJ homolog alt aile B üye 11 ve Aldehid dehidrogenaz X proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin ise azaldığı görülmüştür. Yabani tip Parkin proteininin indüklenmesi ile SH-SY5Y hücrelerinde yalnızca Voltaj-bağımlı



anyon-seçici kanal protein 1 proteininin ekspresyon seviyesinin arttığı görülmüştür. Hücreler arası sinyal ve etkileşim yollarına ait bu proteinlerin büyük çoğunluğunun mutant Parkin ekspresyonu ile artması mutant Parkin'in sinyal iletimini ne derece değiştirdiğini gözler önüne sermektedir.

Genel bir bakış ile mutant Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücrelerde daha çok şaperon görevi gören proteinlerin (Tübilin-spesifik şaperon A, 26S Proteozom ATPaz olmayan regülatör altünite 10, protein DJ-1, T-kompleks protein 1 altünite alfa, DnaJ homolog alt aile B üye 11) ekspresyonlarının arttığını görmekteyiz. Bu proteinler arasında sitoplazmik proteinlerden olan, tubilin katlanma yolağında rol alan ve stres ile indüklenen **Tübilin spesifik şaperon A'nın** mutant Parkin'in indüklenmesi ile 9.17 kat arttığı görülmüştür. Aynı şekilde 26S proteozom toplandığında şaperon gibi davranan **26S Proteozom ATPaz olmayan regülatör altünite 10'un** ise mutant Parkin'in indüklenmesi ile 2.85 kat arttığı görülmüştür. Bu moleküller protein katlanmasına aracılık ederek yanlış katlanmış polipeptit zincirlerinin çöktürmelerini engelleyip tekrar katlanmasını sağlarlar (True, 2006).  $\beta$ -tübilin altüniteleri Tübilin spesifik Şaperon A'ya bağlanıp ayrılarak kompetent formlarını oluştururlar. Tübilin çöktürmelerinin artması bu çöktürmelerin artmasını engelleyecek şaperon proteininin ekspresyon seviyesinin artmasına sebep olmuş olabilir. Gankylin olarak da bilinen 26S proteozom ATPaz olmayan regülatör altünite 10 proteini bir onkoproteindir ve proapoptotik sinyal yolağını indükleyen p53'ün bir E3 ubiquitin ligaz olan Mdm2 aracılığı ile ubiquitinasyonu ve dolayısı ile degradasyonunu arttırarak anti-apoptotik görev görmektedir (Higashitsuji et al., 2005). Bu durum da hücrenin apoptoza gitmesini engellemektedir. Aynı şekilde **protein DJ-1 de** onkogenik protein olarak bilinip (Nagakubo et al., 1997) mitokondriye özgü bir şaperon proteindir. Bu proteini kodlayan gendeki mutasyonlar PH ile ilişkilendirilmiştir (Bonifati et al., 2003). DJ-1 proteini nöronların sitoplazmalarında ve oksidatif strese cevap olarak mitokondrileri ve nükleuslarında bulunmaktadır (Bandopadhyay et al., 2004). Oksidatif stres ve hücre ölümüne karşı hücreyi apoptoza karşı koruyan bir proteindir (Rochet et al., 2012). Memeli hücrelerinde artmış DJ-1 ekspresyonu Akt sinyal yolağının aktivasyonuna sebep olarak hücrenin yaşamasını desteklemektedir (Kim et al., 2005). Yapılan bu çalışmada mutant Parkin ekspresyonunun indüklenmesinin DJ-1 ekspresyonunu 3.3 kat arttırdığı görüldü. Yanlış katlanmış protein birikimi serbest radikal miktarında artışa ve dolayısı ile oksidatif strese neden olmaktadır (Hyun et al., 2002). Mutant Parkin hücrede fonksiyonunu tam olarak yerine getiremiyor ve hücre içerisinde protein birikimine ve dolayısı ile serbest radikallerin artışına neden oluyor ise hücre DJ-1 ekspresyon seviyesini arttırarak oksidatif

strese karşı kendini koruma yoluna gitmiş olabilir.

Aktin-tubulin ve diğer olası hücre iskeletini oluşturan proteinlerinin katlanmasında rol oynayan moleküler şaperon bir protein olan **T-kompleks protein I altünite alfa'nın** da (Dunn et al., 2001) mutant Parkin ekspresyonu yapan hücrelerde 3 kat arttığı görüldü. Artmış T-kompleks protein I'in seviyesini Periquet ve arkadaşları Parkin'in yabani tip formunu sentezleyen ve hiç sentezlemeyen (Knock-out (KO)) fare beyin dokularının protein profillerini karşılaştırdıklarında da görmüşlerdir (Periquet et al., 2005). Mutant Parkin'in ekspresyon seviyesinin artması hücrede stres durumu yaratmış ve dolayısı ile şaperon proteinlerin ekspresyon seviyesinin artmasına sebep olmuş olabilir. Aynı şekilde mutant Parkin fonksiyonunu yabani tip Parkin gibi tam olarak yerine getiremiyor ise hücre yanlış katlanmış proteinleri UPS sistemine gönderemediği için şaperon proteinlerin miktarını arttırarak yanlış katlanmış olan proteinleri tekrar katlama yolunu tercih etmiş ve bu sayede hücreyi apoptozdan kaçtırmaya çalışıyor olabilir. Buna karşın bir diğer ko-şaperon görevi görmekte olan **DnaJ homolog alt aile B üye 11** (Shen and Hendershot, 2005) proteininin ekspresyon seviyesi mutant Parkin ekspresyon seviyesinin artması ile 0.48 azalma göstermiştir. Bu kadar küçük miktarda bir azalma gözardı edilebilecek seviyededir.

Tüm bu hücreyi apoptozdan kurtarmaya çalışan şaperon proteinlere karşı apoptoz ile ilişkili olan TFAR19 olarak da bilinen **Programlı hücre ölüm proteini 5** proteininin mutant Parkin ekspresyon eden hücrelerde 5.45 kat artmış olması bu hücrelerin bir yandan da ölüme gittiğini göstermektedir. Programlı hücre ölüm proteini 5 tümör hücrelerinde apoptoz sırasında ekspresyonunu arttırarak regülasyonunu sağlamaktadır (H. Liu et al., 1999). Bu protein normal koşullarda sitoplazmada üniform olarak dağılmış şekilde bulunurken apoptoz sırasında nükleusa giderek fosfatidilserin (PS) externalizasyonunu ve DNA fragmentasyonuna sağlamaktadır. Bu durum mitokondri hücre membran potansiyelinin azalması ile paralel olup apoptoz sinyalinden ve hücre tipinden bağımsızdır (Chen et al., 2001). Fukae ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Parkin'in Programlı hücre ölüm-2 izoform 1 (PDCD2-1) proteininin ubiquitinlenmesini arttırarak onunla etkileşim halinde olduğunu göstermişlerdir (Fukae et al., 2009).

**Protein S100-A11** bir kalsiyum bağlanma protein olup kalsiyum sinyal yolağında, hücre büyüme ve hareketi, hücre siklusu devamı, transkripsiyon ve hücre farklılaşması, proliferasyonu ve DNA onarımı gibi proseslerde görev alan çok fonksiyonlu bir proteindir (Donato, 2001; Schafer and Heizmann, 1996). S100-A11 endotel büyüme

faktörü ailesi proteinlerinin seviyesini arttırarak ve  $Ca^{2+}$  indüklenmiş büyümenin inhibisyonuna aracılık ederek insan keratinosit hücrelerinin büyümesini regüle etmektedir (Sakaguchi et al., 2008). PH'da dopaminerjik nöronlarda artmış kalsiyum miktarı oksidatif strese sebep olmakta ve bu da mitokondride bozulma ile ilişkilidir (Surmeier et al., 2010). Mutant Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücrelerde yabancı tip Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücelere oranla 41 kat artış gösteren S100-A11, mutant Parkin'in fonksiyonunu tam olarak yerine getirememesi dolayısı ile hücrede sebep olduğu oksidatif strese cevap olarak artmış olabilir.

Yine nörogeneziste akson formasyonunda rol oynayan ve mikrotübüllerin biraraya gelmesini engelleyerek ayrımını destekleyen yani bir şekilde mikrotübüllerin destabilizasyonunda görev alan **Statmin** (Sobel, 1991) mutant Parkin ekspresyon seviyesinin artması ile 4.37 kat artış göstermiştir. Bu da mutant Parkin'in indüklendiği hücrelerde mikrotübül yıkım ihtimalinin arttığı bu durumun da hücreyi ölüme götürebileceğini düşündürmektedir.

Parkinson hastalığının bir proteopati hastalığı olduğu düşünülecek olursa mutant Parkin varlığında UPS sisteminin tam fonksiyonla çalışmaması şaperon proteinlerin ekspresyonunun artmasına sebep olabilmektedir. Ölümden kaçırma ve ölüme götürme prosesinde görevli olan ve ekspresyonu artmış bu proteinler bizi hücrelerin bir savaş içerisinde olduğunu düşündürmektedir.

Enerji metabolizmasında rol oynayan proteinlerden biri olan **Alfa-enolaz (ENOA)** glikoliz reaksiyonunda görev görmektedir (Wold, 1971). Farklı formları bulunan enolaz enziminin alfa ( $\alpha$ ) enolaz formu doku spesifik olmasına rağmen nöron spesifik gama ( $\gamma$ ) enolaz formu gibi nöronal hücrelerde de bulunmaktadır (Marangos et al., 1978; Oliva et al., 1991).  $\alpha\gamma$ - $\gamma\gamma$  gibi heterodimerik enolaz formu nöron/beyin spesifik formudur (Kato et al., 1983; Royds et al., 1982) ve serumda bulunan  $\alpha\gamma$ - $\gamma\gamma$  izoformları nöron spesifik enolaz olarak Alzheimer hastalığında da tanımlanmıştır (Lamour et al., 1988). Birçok fonksiyona sahip olan alfa enolaz enzimi farklı organizmalarda (*Saccharomyces cerevisiae*) aynı zamanda HSP48 proteini olarak geçmektedir (Iida and Yahara, 1985). Alfa enolaz karboksi ucundan katepsin X enzimi ile kesildiğinde nöronal hücrelerin yaşamasının ve neuritogenesisinin bozulduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı alfa enolazın birçok fonksiyonun yanı sıra nöron koruyucu rolü olduğu da düşünülmektedir (Butterfield and Lange, 2009). Poon ve arkadaşları fare merkezi sinir sisteminde artmış oksidatif stres ve yaş bağımlı disfonksiyon üzerine yaptıkları proteomiks çalışmasında alfa enolaz

seviyesinin azaldığını ve alfa enolazın nörodejenerasyon ile ilgili bir protein olduğunu söylemişlerdir (Poon et al., 2006). Yine aynı grubun yaptıkları bir başka proteomiks çalışmasında da A30P alfa-sinüklein mutant farelerin beyin hücrelerinde alfa-enolaz protein seviyesini artmış olduğu görülmüştür (Poon et al., 2005). Bu çalışmada alfa-enolaz seviyesinin mutant Parkin'in indüklenmiş ekspresyonu ile 3.25 kat arttığını görmekteyiz. Mutant formdaki Parkinin overekspresyonunun alfa-enolaz enzim seviyesini artırması hem nöroblastoma hücrelerini koruyucu fonksiyonu ile hem daha fazla ATP ihtiyacının karşılanması hem de şaperon gibi davranarak hücreyi korumaya çalışması ile ilişkilendirilebilir.

**Voltaj-bağımlı anyon-seçici kanal protein 1 (VDAC1)** ekspresyonunun yabani tip Parkin ekspresyonunun arttığı hücrelerde 2.32 kat artmış olduğu görülmüştür. Parkin VDAC1'i Lys 27'den poliubikuitine eder böylelikle p62/SQSTM1 denen ubikuitin ve otofaji arasındaki adaptör proteini bölgeye yönlendirerek hasarlı mitokondrinin mitofajiye gitmesinde rol oynar (Geisler et al., 2010). Bu protein otofaji/mitofaji yollarında görev görmektedir. Parkin ekspresyon seviyesinin artması VDAC1 seviyesinin artmasına sebep olabilmektedir.

Alkole bağlı detoksifikasyonu sağlayan peroksidasyon metabolizmasında rol oynayan **Aldehid dehidrogenaz X** ise mutant Parkin'in indüklenmiş ekspresyonu ile 0.48 kat azalmıştır. Bu enzimlerin seviyelerindeki değişim hücresel stres ve detoksifikasyon prosesleri ile ilişkilidir. Grunblatt ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yüksek miktarda gen ekspresyon profiline sahip ALDH1'in PH'nin erken teşhisinde biyobelirteç olabileceğini söylemektedirler (Grunblatt et al., 2010).

Transkripsiyonun düzenlenme yollarında görev gören proteinlerden Ubikuitin karboksi-uçlu hidrolaz izozim L1, 14-3-3-protein  $\beta/\alpha$ 'nın mutant Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücrelerde artmışken, Heterojen nükleer ribonükleoprotein A/B, Junction plakogloblin, Orta-zincir spesifik asetil-CoA dehidrogenaz, ES1 protein homolog ve Protein C19orf10 proteinlerinin ise yabani tip Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücrelerde artmış olduğu görülmüştür.

PH ile ilişkilendirilmiş ve UPS'de görev alan bir protein olan **Ubikuitin C-terminal hidrolaz L1 (UCH-L1)** beyinde fazla miktarda sentelenen nöron spesifik bir enzim olup ubikuitini bağlandığı proteinden ayırmaktadır (Liu et al., 2002). UCH-L1'in hidrolaz aktivitesinin yanında dimerizasyon bağımlı ubikuitin-ubikuitin ligaz aktivitesi de bulunmaktadır ve bu sayede alfa-sinükleine Lys-63'ten çoklu ubikuitin molekülü eklemektedir (Liu et al., 2002). Alfa-sinüklein'in Lys-63'ten ubikuitinlenmesi

degradasyonu için gerekli olan Lys-48 ubikuitinlenmesini inhibe ettiğinden dolayı UCH-L1'in bu aktivitesi alfa-sinüklein birikimi ve çökeltileri oluşumuna sebep olup dolayısı ile hücre için patojenik olabilmektedir (Liu et al., 2002). UCH-L1 üzerindeki mutasyonlar PH ile ilişkilendirilmiştir (Elbaz et al., 2003). UCH-L1 Parkin ve alfa-sinüklein ile birlikte LC'de lokalize olabilmektedir (Ardley et al., 2004). Mutant Parkinin ekspresyonunun indüklenmesi ile hücrede UCH-L1 protein seviyesinin 8.49 kat arttığı görülmüştür. Hücre içerisinde artan UCH-L1 serbest ubikuitin moleküllerinin artması demektir. Ubikuitinasyon ve deubikuitinasyon bir denge halindedir ve bu dengenin bozulması hücre için stres durumu yaratabilmektedir. Mutant Parkin'in varlığı UCH-L1 ekspresyon seviyesinin artmasına neden olabilir. Mutant Parkin fonksiyonunu doğru yapamayıp yanlış proteinlere ubikuitin ekliyor ise hücre bu proteinlerin UPS'e gitmesini engellemek için UCH-L1 ekspresyon seviyesini artırarak deubikuitinasyonu destekleme yoluna gitmiş olabilir. UCH-L1 ekspresyonundaki artış Periquet ve arkadaşlarının Parkin KO fare beyinleriyle yaptıkları proteomiks çalışmasında da gösterilmiştir (Periquet et al., 2005). Buna karşı Choi ve arkadaşlarının PH hasta beyinde yaptıkları proteomiks çalışmasında UCH-L1 seviyesinin düştüğünü görmüşlerdir (Choi et al., 2004).

**14-3-3-** proteinleri Parkin ile ilişkili proteinler olarak bilinen sitoplazmik şaperon proteinlerdir. PH patofizyolojisinde bazılarının  $\alpha$ -sinükleine bağlandığı rapor edilmiştir (Ostrerova et al., 1999) ve LC yapısına katılmaktadırlar (Kawamoto et al., 2002). 14-3-3- proteinleri tüm ökaryotlarda sentezlenen kinazlar, fosfotazlar ve transmembran reseptörleri gibi birbirinden farklı sinyal proteinlerine bağlanmaktadır. 14-3-3- proteinleri mitojenik sinyal transdüksiyonu, apoptotic hücre ölümü ve hücre döngüsü kontrolü gibi çok önemli düzenleme proseslerinde görev almaktadırlar (Fu et al., 2000). 14-3-3-zeta, Parkin ile etkileştiğinde Parkin'in aktivitesini negatif olarak düzenlemektedir (Sato et al., 2006). Parkin KO fare modelinde 14-3-3- $\zeta$  (zeta) miktarı azalmakta (Periquet et al., 2005) ve HSP60 ile spesifik olarak interaksiyon halindedir (Satoh et al., 2005). Biz de çalışmamızda 14-3-3 protein  $\beta/\alpha$  seviyesinin mutant Parkin'in indüklenmiş ekspresyonu ile 6.48 kat arttığını görmekteyiz. Bunun sebebi mutant Parkin'in fonksiyonunu tam olarak yerine getirememesi ve tıpkı hücreler arası sinyal yollarında karşımıza çıkan şaperonlar gibi yanlış katlanmış proteinleri düzenlemek ve nöronal hücrelerin ölümünü engellemek amaçlı ekspresyon seviyesinin artması olarak düşünülebilir.

**Heterojen nüklear ribonükleoprotein A/B** proteini hücrede fazla miktarda bulunan nüklear proteinlerden biridir. hnRNPs A/B birkaç tane RNA bağlanma motifleri

ile RNA'yı sarmaktadır ve nöronlarda kritik rolleri bulunmaktadır (Kashima et al., 2007). htRNPs A/B proteinleri DNA replikasyonu ve tamiri, telomer düzenlenmesi, transkripsiyon, pre-mRNA splicing ve mRNA'nın nüklear-sitoplazmik eksportunda (Brumwell et al., 2002; Pollard et al., 1996) görev görmektedirler (He and Smith, 2009). Villa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalarının lenfosit hücrelerinde hnRNPA1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Villa et al., 2011). Berson ve arkadaşları Alzheimer hastalarının entorhinal korteksinde hnRNP A/B seviyesinin azaldığını göstermiş ve bunun nedeni de asetilkolin sinyalinin azalmasına bağlamışlardır. Ayrıca farelerde hnRNP A/B knockdown durumunda alternatif splicing bozukluğunun indüklenmesi ve primer nöronlarda dentrit kaybı rapor edilmiştir (Berson et al., 2012). Davison ve arkadaşları 2DE proteomiks ile HEK293 hücrelerinde indüklenmiş Parkin ekspresyonunda hnRNPK seviyesini 9.1 kat azalmış bulmuşlardır (Davison et al., 2009). Yaptığımız çalışmada ise yabani tip Parkin'in ekspresyonunun indüklenmesinin hnRNP A/B protein seviyesini 3.76 kat arttırdığı görüldü.

Yabani tip Parkin'in ekspresyonunun indüklenmesi **Junction plakoglobin** protein seviyesini 1.92 kat arttırmıştır. JUP ve ya gama-katenin olarak da bilinen bu protein majör sitoplazmik proteindir ve intermediate junction ve desmosomların bileşenidir (Ruiz and Birchmeier, 1998).

Mitokondriyal proteinlerden olan **orta-zincir spesifik asetil-CoA dehidrogenaz** (ACAD) yabani tip Parkin indüklenmesi ile ekspresyon seviyesi ise 2.56 kat artmıştır.

**ES1** protein homolog proteinleri N-terminal dizisinde mitokondri hedef dizisi içeren zebra balığı ES1 dizisi ile yüksek homoloji gösteren insan ES1 proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen fetal Down sendromlu beyin defekti olan örnekler ile yapılan proteomiks çalışmasında ekspresyon seviyesinin çok yüksek olduğu ve Down Sendromu tanısında aday protein olabileceği söylenmiştir (Shin et al., 2004). Bizim çalışmamız da yabani tip Parkin indüklenmesi ile ekspresyon seviyesi 1.81 kat artmıştır.

Mitokondriyal metabolizma yollarında görev gören proteinlerden **ATP sentaz altünite D (ATP5H)** mutant Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücrelerde artmışken, **Metilkrotonil-CoA karboksilaz beta zinciri (MCCB)** yabani tip Parkin ekspresyonunun indüklendiği hücrelerde artmıştır. Daha önce PH ile de ilişkilendirilen **ATP5H** mitokondriyal bir enzimdir ve ATP sentezini katalizlemektedir (Xun et al., 2008). Mutant hücrelerdeki enerji ihtiyacının çokluğu bu proteindeki artmış ekspresyon seviyesi ile karşılanabilmektedir. Basso ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada PH hasta beyini SN bölgesinde ATP sentaz altünite D proteininin arttığı gösterilmiştir. (Basso, 2004).

Literatürde Parkinson hastasının post mortem beyin SN bölgesinde kompleks I aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Fakat beynin diğer bölgelerinde normal oksidatif fosforilasyon aktivitesi göstermektedir (Gu et al., 1998; Orth and Schapira, 2002). Mitokondriyel enzimlerin ekspresyon seviyelerinde azalmadan dolayı PH'da bu enzimlerin inhibisyonu ile ilişkili olarak düşük aktivite rapor edilmiştir (Mizuno et al., 1990).

Fosforilasyon proteomun yaklaşık üçte birinde gerçekleşmekte olan translasyon sonrası bir değişimdir (Cohen, 2001). Fosforilasyon databankaları (PhosphoSitePlus, PhosphoELM ve Phosida) insan proteomunda yaklaşık 100 000'den fazla fosforilasyon bölgesi olduğunu söylemektedir. Bu kadar fazla fosforilasyon bölgesi olmasına rağmen tanımlanan fosfoproteinler oldukça az miktarda bulunmaktadır (Kalume et al., 2003; Reinders and Sickmann, 2005). Örneğin sinyal yolları ile ilgili proteinlerin yaklaşık % 1-2 kadarı fosforillenmiş formda bulunmaktadır (Schlessinger, 1993).

Amino asitler 4 farklı şekilde fosforillenmektedir. Fosfat grubunun serin, treonin ve tirozin amino asitlerinin hidroksil gruplarına bağlanması ile O-fosforilasyon, histidin ve lizin amino asitlerine bağlanması ile N- fosforilasyon, sistein amino asitine fosfat grubunun eklenmesi ile S-fosforilasyon ve aspartik asit ve glutamik asit amino asitlerine bağlanması ile açıl-fosforilasyon şeklindedir. Fosforilasyon bir çok sinyal transdüksiyon prosesleri yanında proliferizasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel prosesleri düzenlenmektedir.

Hücre içerisindeki sinyal yollarının Parkinson Hastalığı ile ilişkisini anlayabilmek amacı ile hücrenin fosforilasyon statüsündeki değişiklikler incelenmektedir. Bu tez kapsamında yapılan fosfoproteom çalışması ve analizler sonucunda 13 proteinde anlamlı değişim görüldü. Yapılan Canonical yolak analizi sonucunda ekspresyon profili değişen bu fosfoproteinler glukoneogenesis I, glikoliziz I, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve sükröz dejenerasyonu gibi enerji metabolizmasını etkileyen yollar ile ilişkili bulunmuştur. IPA analizi de belirlenen tüm bu proteinlerin de Ubikuitin C ile ilişkilendirildiği görülmüştür.

Yabani tip Parkin eksprese eden hücrelerde Alfa-enolaz (ENO1), Fruktoz bifosfat aldolaz A (ALDOA), Stres indüklenmiş fosfoprotein 1 (STIP1), Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienol-CoA izomeraz (ECH1), Tioredoksin bağımlı peroksit redüktaz (PRDX3), ATP sentaz alt ünite alfa (ATPA) ve Karakterize edilmemiş protein C9orf78 (CI078) proteinlerinin ekspresyon seviyesi artmıştır. Mutant tip Parkin eksprese eden hücrelerde ise Paraspeckle component 1 (PSPC1), Heterojen nüklear ribonükleoprotein D (HNRPD), Heterojen nüklear ribonükleoprotein D benzeri (HNRDL), Ökaryotik translasyon başlatma

faktörü 4H (IF4H) ve Aktin sitoplazmik 2 (ACTG) proteinlerinin ekspresyon seviyesi artmış iken Vimentin (VIM) proteininin ekspresyon seviyesi azalmıştır.

Fosforillenmiş **Alfa enolaz** ekspresyonu yabani tip Parkin eksprese eden hücrelerinde 3.91 kat artmıştır. Alfa enolazın Tyr(43)'den fosforillenmesi transgenik ALS hayvan modellerinin spinal kordu ile yapılan proteom analizi çalışmasında gösterilmiştir (Casoni et al., 2005). Bazı araştırmacılar alfa enolazın hidrofobik domaininin internal sinyal dizisi olarak görev yaptığını söylerken bazıları post translasyonel fosforilasyonun membran kontrolü ile ilişkili olduğunu düşünmektedirler (Cooper et al., 1984). Alfa enolazın fosforillenmiş formunun PH ile ilişkisi daha önce rapor edilmemiştir.

**Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA izomeraz (ECH1)** hücrel fonksiyon olarak enerji üretiminden sorumlu bir protein olup yağ metabolizmasında yağ asidi beta oksidasyonunda görev almaktadır (FitzPatrick et al., 1995). Hücrede yabani tip Parkin ekspresyonunun artması fosforillenmiş ECH1 ekspresyon seviyesinin 20.41 kat artmasına sebep olmuştur. Bu veri Parkin ekspresyonunun enerji metabolizması üzerine etkisini göstermektedir.

Hücre iskeleti proteinlerinden olan **vimentin** ve **aktin sitoplazmik 2** proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin mutant Parkin eksprese eden hücrelerde değiştiği görüldü. Davison ve arkadaşları HEK293 hücrelerinde indüklenmiş Parkin ekspresyonunun vimentin seviyesini belirlenemeyecek seviyede azalttığını görmüşlerdir (Davison et al., 2009). Bu çalışmada ise yabani tip Parkin indüklenmesi ile fosforillenmiş vimentin ekspresyon seviyesi 2.05 kat azalmıştır. Vimentinin daha önce Parkinin mitokondrideki oksidatif hasarına karşı o bölgeye lokalizasyonunda etkileşim ortağı olduğu rapor edilmiştir (Muqit et al., 2004).

**Tioredoksin bağımlı peroksit redüktaz (PRDX3)** peroksidaz aktivitesine sahip bir protein olup antioksidant fonksiyonu bulunmaktadır ve mitokondride lokalize olmaktadır. Basso ve arkadaşları 2DE proteomiks yaklaşımı ile Parkinson hasta ve kontrol gruplarının SN proteomunu analiz ettiklerinde peroksiredoksin 2 ve tioredoksin ekspresyonunun PH hasta grubunda ciddi oranda artmış olduğunu belirtmişlerdir (Basso et al., 2004). Peroksiredoksinler kendini feda eden antioksidantlar olup ROS oksidasyonunu katalizlemek yerine direk olarak ROS ile reaksiyona girmektedirler. Yaptığımız çalışmada da yabani tip Parkin indüklenmesi ile fosforillenmiş peroksiredoksin III ekspresyon seviyesinin 9.23 kat arttığı görüldü. PH ile ilişkili olan LRRK2 genindeki mutasyonların peroksiredoksin 3 fosforilasyonunda artışa sebep olmaktadır ve bu azalmış



peroksidaz aktivitesi ile ilişkilidir (Angeles et al., 2011). Proteomiks yaklaşım kullanarak peroksiredoksin III'ün Alzheimer hastalığı ve Down sendromu hastalarının frontal korteks bölgelerinde ekspresyon seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir ( Kim et al.,2001).

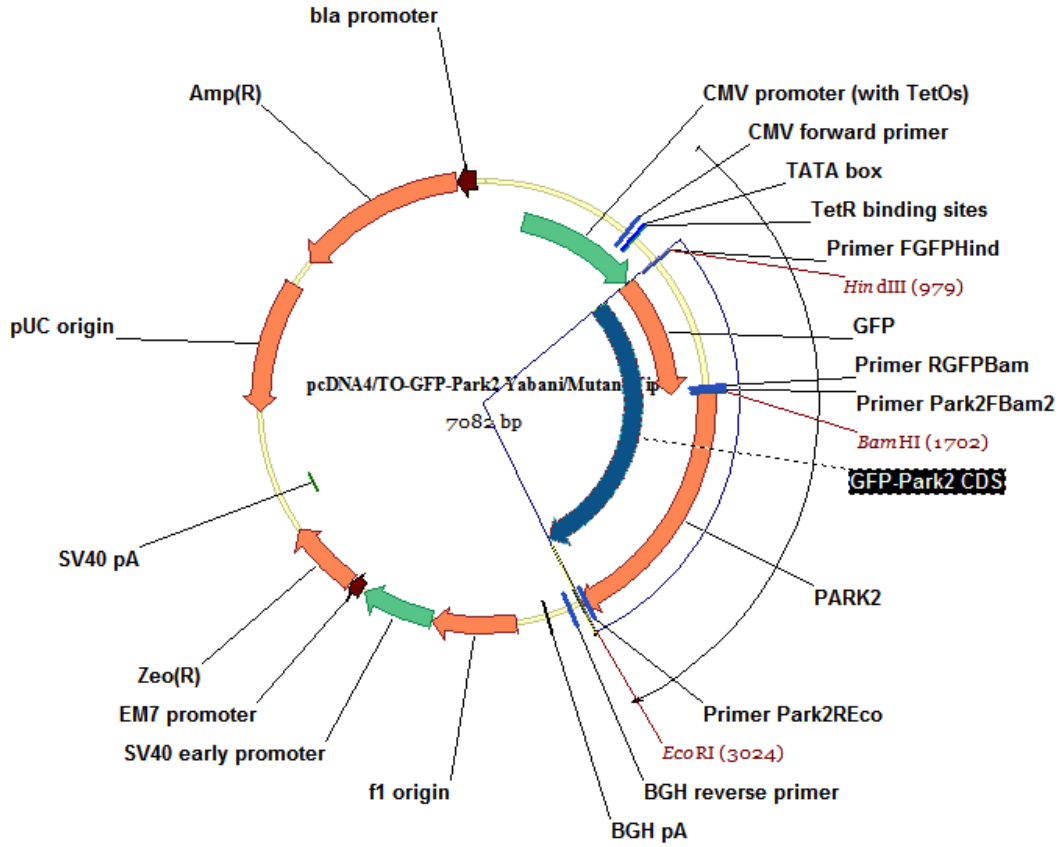
Şimdiye kadar fosfoproteomiks çalışması ile belirlediğimiz bu bir çok proteinin PH ile ilişkisi belirlenmemiş ve çalışılmamıştır. Fakat belirlediğimiz bu proteinlerin IPA analizi sonucunda Ubikuitin C etrafında toplanması ubikuitinasyon yolağı ile ilişkili olmasına bağlanabilir. Parkin'in sinyal yolakları üzerine etkisi daha önce çalışılmamış ve bu yolda etkileştiğı proteinler tam olarak belirlenmemiştir. Belirlenen her proteinin sinyalizasyon üzerine etkili ve PD oluşumunda önemli bir faktör olma ihtimali vardır.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

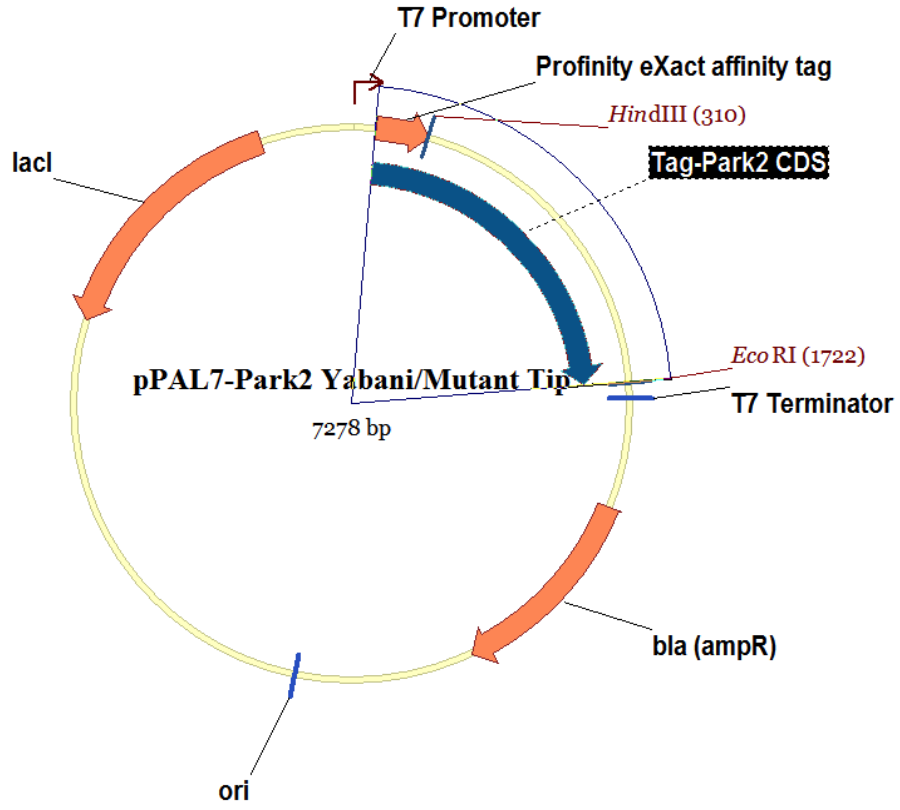
Mutant Parkin proteini yabani tip Parkin proteini ile karşılaştırmalı olarak moleküler düzeyde karakterize edilmiştir. Proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonları belirlenmiş, post-translasyonel olarak hangi modifikasyonlara tabi kaldıkları belirlenmiş ve proteinler saflaştırılarak aktiviteleri *in vitro* ubikuitinasyon assay ile karşılaştırılmıştır. Nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattında eksprese edilen yabani tip ve mutant Parkin proteinlerinin hücrenin tüm protein profilini ne şekilde değiştirdiği hücre içerisindeki hangi proteinlerin ekspresyon profillerini arttırıp-azalttığını ve bu değişen ekspresyon profiline sahip proteinlerin hangi hücresel yolları kullandığı gösterilmiştir. Ayrıca fosfoproteomik çalışmalar ile de yabani tip ve mutant Parkin protein ekspresyonunun hücrede hangi proteinlerin fosforilasyonunu etkilediği ve fosforilasyon statüsündeki değişiklikler incelenmiştir.

Bu çalışmada belirlenen ve ekspresyon seviyesi değişen proteinlerin Parkin ve PH ile olan ilişkisini anlayabilmek için çalışmalar yapılmalıdır. Uzun vadede ise bu proteinlerin fare modellerinde KO edilerek PH'ya yol açıp açmadıkları test edilebilir. Ayrıca bu proteinlerin *In vitro* olarak Parkin tarafından ubikuitine edilip edilmedikleri test edilebilir. Buna ek olarak bu proteinlerin Parkin ile etkileşip etkileşmediği immün çöktürme çalışmaları ile test edilebilir.

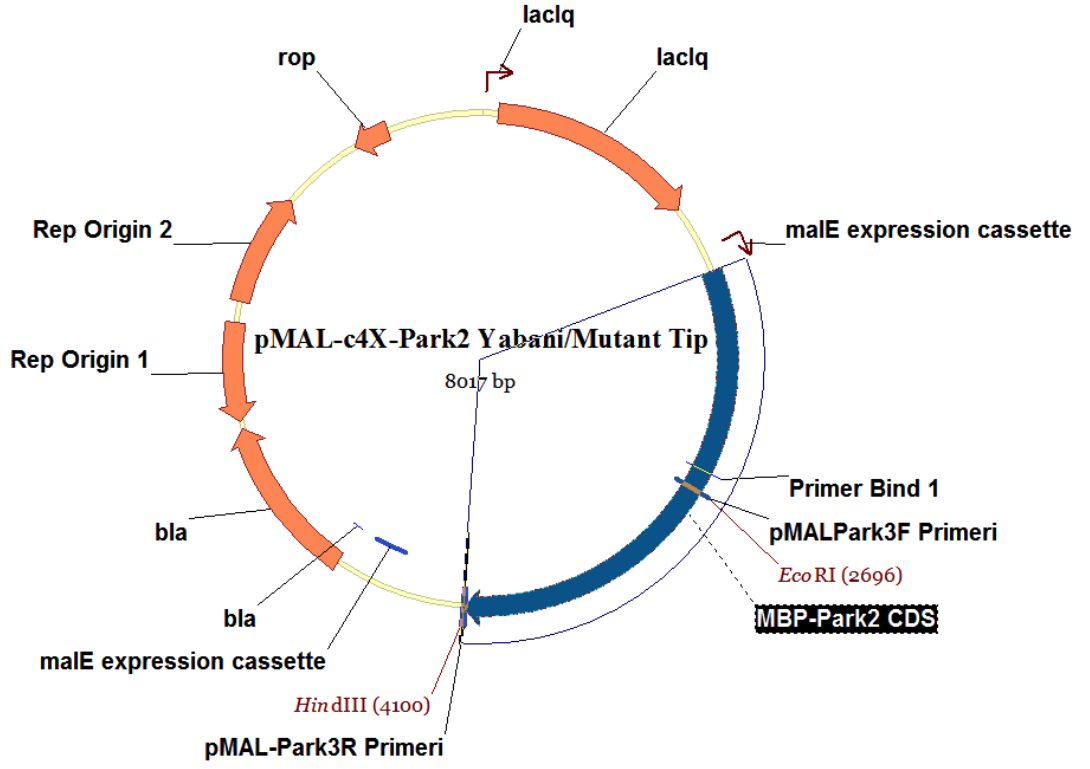
## 7. EKLER



Ek 1. pcDNA4/TO-GFP-Park2 mutant / yabani tip rekombinant plazmit klonuna ait vektör haritası. Harita Vector NTI (Invitrogen, ABD) ile hazırlanmıştır. CDS: Coding Sequences



**Ek 2.** pPAL7- Park2 mutant / yabani tip rekombinant plazmit klonuna ait vektör haritası. Harita Vector NTI (Invitrogen, ABD) ile hazırlanmıştır.



Ek 3. pMAL-c4X-Park2 mutant / yabancı tip rekombinant plazmit klonuna ait vektör haritası. Harita Vector NTI (Invitrogen, ABD) ile hazırlanmıştır.



T.C.  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



**ARAŞTIRMA ONAY FORMU**

<b>BASVURU BİLGİLERİ</b>	PROJE NO: 2011/34	<b>KAEK 4/14</b>
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ VE SEVİYESİ	Doktora Tezi
	ARAŞTIRMANIN ADI	Mutant Parkin Proteininin Moleküler Karakterizasyonu ve Nöroblastma Hücre Proteomu Üzerindeki Etkisi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Sinem Özgül Doç.Dr.Murat Kasap(Danışman)
<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	ARAŞTIRMANIN YERİ	KOÜ Tıbbi Biyoloji BD+Klinik Araş.Proteomiks Labratuarı
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	+
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU	-
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	-
ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	KOU Bilimsel Araştırmalar Fonu	

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Etik değerlendirme amacıyla başvuru projesi <b>07.02.2011</b> tarihinde Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nda KAEK çalışma esasları dikkate alınarak incelenmiş ve araştırma etiğine uygun tasarlanmış olmasından dolayı onaylanmasına karar verilmiştir.
------------------------	---

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	
<b>ÇALIŞMA ESASLARI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, KOU Klinik Araştırmaları Etik Kurul Yönergesi

<b>ÜYELER</b>					
Unvanı /Adı Soyadı	Uzmanlık	Kurumu	Cins.	İlişki *	İmza
Prof. Dr. Nermin ERSOY Başkan	Deontoloji	KOÜ TF Tıp Tarihi ve Etik AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	N. Ersoy
Prof.Dr. Dilek URAL Başkan Yard.	Kardiyoloji	KOÜ TF Kardiyoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	ishide
Prof. Dr. B.Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOÜ TF Farmakoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Jey
Prof. Dr Yeşim GÜRBÜZ Üye	Patoloji	KOÜ TF Patoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Yeşim
Doç. Dr. Gülcan TÜRKER Üye	Pediyatri	KOÜ TF Çocuk Sağlığı ve Hast. AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Gülcan
Doç. Dr Eray ÇALIŞKAN Üye	Kadın Doğum	KOÜ TF Kadın Hast. ve Doğum AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	kotluvalı
Doç. Dr. Firuzan YILDIZ AKAR Raportör	Eczacı	KOÜ TF Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Firuzan
Doç. Dr. Hale MARAL KIR Üye	Biokimya	KOÜ TF Biokimya AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Hale
Av. Füsün DOĞANAY Üye	Avukat	KOÜ Hukuk Bürosu	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	kotluvalı
Jale Gülizar ÇORAKÇI Üye	Hasta Hakları Savunucusu	Sivil Toplum Örgütünden Emekli Öğretmen	K	<input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	Jale

\* Araştırma ile İlişki  
\*\* Toplantıda Bulunma

**► Araştırmacılara önemli not**

Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raportörlüğü, Umuttepe Yerleşkesi, Eski İstanbul Yolu 10.km, 41380 Umuttepe / İZMİT  
Tel: 0 262 303 71 64 - Faks: 0 262 303 74 63 - e-posta: etikkurul@kocaelism.gov.tr

Ek 4. Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik kurullu tarafından verilen çalışma etik kurul onay belgesi.

## 8. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas, N., Lucking, C. B., Ricard, S., Durr, A., Bonifati, V., De Michele, G., et al. (1999). A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet*, 8(4), 567-574.
- Adamczyk, A., Kazmierczak, A., Czapski, G. A., and Strosznajder, J. B. (2010). Alpha-synuclein induced cell death in mouse hippocampal (HT22) cells is mediated by nitric oxide-dependent activation of caspase-3. *FEBS Lett*, 584(15), 3504-3508.
- Angeles, D. C., Gan, B. H., Onstead, L., Zhao, Y., Lim, K. L., Dachsel, J., et al. (2011). Mutations in LRRK2 increase phosphorylation of peroxiredoxin 3 exacerbating oxidative stress-induced neuronal death. *Hum Mutat*, 32(12), 1390-1397.
- Ardley, H. C., Scott, G. B., Rose, S. A., Tan, N. G., and Robinson, P. A. (2004). UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 90(2), 379-391.
- Aygün, D., Türkel, Y., Onar, M.K.,. (2009). Parkinson Hastalığında Motor Olmayan Belirtilerin Tanı ve Tedavisi *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları Dergisi* 12(2), 80-90.
- Bahuleyan, B., Singh, S. (2012), Olfactory memory impairment in neurodegenerative diseases. *J Clin Diagn Res*. 2012 Oct;6(8):1437-41
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A. E., Cookson, M. R., Reid, A. R., Evans, I. M., Hope, A. D., et al. (2004). The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain*, 127(Pt 2), 420-430.
- Basso, M., Giraud, S., Corpillo, D., Bergamasco, B., Lopiano, L., and Fasano, M. (2004). Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics*, 4(12), 3943-3952.
- Beasley, S. A., Hristova, V. A., and Shaw, G. S. (2007). Structure of the Parkin in-between-ring domain provides insights for E3-ligase dysfunction in autosomal recessive Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3095-3100.
- Belin, A. C., and Westerlund, M. (2008). Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J*, 275(7), 1377-1383.
- Berson, A., Barbash, S., Shaltiel, G., Goll, Y., Hanin, G., Greenberg, D. S., et al. (2012). Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Mol Med*, 4(8), 730-742.
- Biedler, J. L., Helson, L., and Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33(11), 2643-2652.
- Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., Cartlidge, N. E., Parker, W. D., Jr., and Turnbull, D. M. (1991). Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 104(2), 203-208.
- Blandini, F., and Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279(7), 1156-1166.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., et al. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604), 256-259.
- Bonini, N. M., and Giasson, B. I. (2005). Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell*, 123(3), 359-361.

- Brumwell, C., Antolik, C., Carson, J. H., and Barbarese, E. (2002). Intracellular trafficking of hnRNP A2 in oligodendrocytes. *Exp Cell Res*, 279(2), 310-320.
- Bueler, H. (2010). Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*, 15(11), 1336-1353.
- Butterfield, D. A., and Lange, M. L. (2009). Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism. *J Neurochem*, 111(4), 915-933.
- Carlsson, A., and Waldeck, B. (1958). A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand*, 44(3-4), 293-298.
- Casoni, F., Basso, M., Massignan, T., Gianazza, E., Cheroni, C., Salmona, M., et al. (2005). Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. *J Biol Chem*, 280(16), 16295-16304.
- Chan, N. C., Salazar, A. M., Pham, A. H., Sweredoski, M. J., Kolawa, N. J., Graham, R. L., et al. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet*, 20(9), 1726-1737.
- Chaugule, V. K., Burchell, L., Barber, K. R., Sidhu, A., Leslie, S. J., Shaw, G. S., et al. (2011). Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J*, 30(14), 2853-2867.
- Chen, D., Gao, F., Li, B., Wang, H., Xu, Y., Zhu, C., et al. (2010). Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J Biol Chem*, 285(49), 38214-38223.
- Chen, Y., Sun, R., Han, W., Zhang, Y., Song, Q., Di, C., et al. (2001). Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? *FEBS Lett*, 509(2), 191-196.
- Chen, Z. J., and Sun, L. J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 33(3), 275-286.
- Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A., and Andersen, J. K. (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci Lett*, 486(3), 235-239.
- Choi, J., Levey, A. I., Weintraub, S. T., Rees, H. D., Gearing, M., Chin, L. S., et al. (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem*, 279(13), 13256-13264.
- Choi, P., Snyder, H., Petrucelli, L., Theisler, C., Chong, M., Zhang, Y., et al. (2003). SEPT5\_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res*, 117(2), 179-189.
- Chung, K. K., Thomas, B., Li, X., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., et al. (2004). S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*, 304(5675), 1328-1331.
- Chung, K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., et al. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*, 7(10), 1144-1150.
- Clayton, D. F., and George, J. M. (1999). Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*, 58(1), 120-129.
- Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*, 268(19), 5001-5010.
- Cole, N. B., Murphy, D. D., Lebowitz, J., Di Noto, L., Levine, R. L., and Nussbaum, R. L. (2005). Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments. *J Biol Chem*, 280(10), 9678-9690.
- Cookson, M. R. (2005). The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem*, 74, 29-52.



- Cooper, J. A., Esch, F. S., Taylor, S. S., and Hunter, T. (1984). Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 259(12), 7835-7841.
- Corti, O., Hampe, C., Darios, F., Ibanez, P., Ruberg, M., and Brice, A. (2005). Parkinson's disease: from causes to mechanisms. *C R Biol*, 328(2), 131-142.
- Corti, O., Hampe, C., Koutnikova, H., Darios, F., Jacquier, S., Prigent, A., et al. (2003). The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 12(12), 1427-1437.
- da Costa, C. A., Sunyach, C., Giaime, E., West, A., Corti, O., Brice, A., et al. (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol*, 11(11), 1370-1375.
- Davison, E. J., Pennington, K., Hung, C. C., Peng, J., Rafiq, R., Ostareck-Lederer, A., et al. (2009). Proteomic analysis of increased Parkin expression and its interactants provides evidence for a role in modulation of mitochondrial function. *Proteomics*, 9(18), 4284-4297.
- Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2002). Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 5 Suppl, 1058-1061.
- Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, 302(5646), 819-822.
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Desmond, H., Kjaer, S., Loh, S. H., et al. (2011). PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet*, 20(5), 867-879.
- Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H., and Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(38), 14503-14508.
- Devine, M. J., Plun-Favreau, H., and Wood, N. W. (2011). Parkinson's disease and cancer: two wars, one front. *Nat Rev Cancer*, 11(11), 812-823.
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., et al. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72(3), 240-245.
- Dissmeyer, N., and A. Schnittger. (2011). The Age of Protein Kinases In *Plant Kinases Methods in Molecular Biology* (Vol. 779, pp. 7-52).
- Djarmati, A., Hedrich, K., Svetel, M., Schafer, N., Juric, V., Vukosavic, S., et al. (2004). Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat*, 23(5), 525.
- Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 33(7), 637-668.
- Dong, Z., Ferger, B., Paterna, J. C., Vogel, D., Furler, S., Osinde, M., et al. (2003). Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21), 12438-12443.
- Doss-Pepe, E. W., Chen, L., and Madura, K. (2005). Alpha-synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine 63-linked multiubiquitin chains. *J Biol Chem*, 280(17), 16619-16624.
- Dunn, A. Y., Melville, M. W., and Frydman, J. (2001). Review: cellular substrates of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *J Struct Biol*, 135(2), 176-184.

- Elbaz, A., Levecque, C., Clavel, J., Vidal, J. S., Richard, F., Correze, J. R., et al. (2003). S18Y polymorphism in the UCH-L1 gene and Parkinson's disease: evidence for an age-dependent relationship. *Mov Disord*, 18(2), 130-137.
- Elibol, B. (2008). Parkinson's Disease and Cognitive Functions. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*, 1(4), 131-138
- Eller, M., and Williams, D. R. (2011). alpha-Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med*, 49(3), 403-408.
- Engelender, S. (2008). Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy*, 4(3), 372-374.
- Fallon, L., Belanger, C. M., Corera, A. T., Kontogiannia, M., Regan-Klapisz, E., Moreau, F., et al. (2006). A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol*, 8(8), 834-842.
- Fallon, L., Moreau, F., Croft, B. G., Labib, N., Gu, W. J., and Fon, E. A. (2002). Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem*, 277(1), 486-491.
- Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., et al. (2001). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol*, 50(3), 293-300.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Finney, N., Walther, F., Mantel, P. Y., Stauffer, D., Rovelli, G., and Dev, K. K. (2003). The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J Biol Chem*, 278(18), 16054-16058.
- FitzPatrick, D. R., Germain-Lee, E., and Valle, D. (1995). Isolation and characterization of rat and human cDNAs encoding a novel putative peroxisomal enoyl-CoA hydratase. *Genomics*, 27(3), 457-466.
- Forno, L. S., and Norville, R. L. (1976). Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion. *Acta Neuropathol*, 34(3), 183-197.
- Fu, H., Subramanian, R. R., and Masters, S. C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 617-647.
- Fukae, J., Sato, S., Shiba, K., Sato, K., Mori, H., Sharp, P. A., et al. (2009). Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease. *FEBS Lett*, 583(3), 521-525.
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., and Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol*, 51(3), 296-301.
- Galter, D., Westerlund, M., Carmine, A., Lindqvist, E., Sydow, O., and Olson, L. (2006). LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. *Ann Neurol*, 59(4), 714-719.
- Gasser, T. (2007). Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22 Suppl 17, S343-350.
- Gasser, T., Hardy, J., and Mizuno, Y. (2011). Milestones in PD genetics. *Mov Disord*, 26(6), 1042-1048.
- Gasser, T., Muller-Myhsok, B., Wszolek, Z. K., Oehlmann, R., Calne, D. B., Bonifati, V., et al. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet*, 18(3), 262-265.
- Gaweda-Walerych, K., Safranow, K., Jasinska-Myga, B., Bialecka, M., Klodowska-Duda, G., Rudzinska, M., et al. (2012). PARK2 variability in Polish Parkinson's disease

- patients--interaction with mitochondrial haplogroups. *Parkinsonism Relat Disord*, 18(5), 520-524.
- Gegg, M. E., Cooper, J. M., Chau, K. Y., Rojo, M., Schapira, A. H., and Taanman, J. W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*, 19(24), 4861-4870.
- Geisler, S., Holmstrom, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., et al. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*, 12(2), 119-131.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82(2), 373-428.
- Goetz, C. G. (2002). Jean-Martin Charcot and the aging brain. *Arch Neurol*, 59(11), 1821-1824.
- Golbe, L. I., Di Iorio, G., Sanges, G., Lazzarini, A. M., La Sala, S., Bonavita, V., et al. (1996). Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann Neurol*, 40(5), 767-775.
- Goldstein, N. (2009). Treatment Of Parkinson's Disease. In *Genes and Disease Parkinson's Disease*. ABD: Chelsea House Publishers.
- Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B., and Pallanck, L. J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 4078-4083.
- Grunblatt, E., Zehetmayer, S., Jacob, C. P., Muller, T., Jost, W. H., and Riederer, P. (2010). Pilot study: peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 117(12), 1387-1393.
- Gu, M., Owen, A. D., Toffa, S. E., Cooper, J. M., Dexter, D. T., Jenner, P., et al. (1998). Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci*, 158(1), 24-29.
- Güney, Y., Bilgehan, A. (2002). Ubikitin Sistem. *T Klin Tip Bilimleri*(22), 616-619.
- Haas, R. H., Nasirian, F., Nakano, K., Ward, D., Pay, M., Hill, R., et al. (1995). Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 37(6), 714-722.
- Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., and Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet*, 15(13), 2059-2075.
- Hampshire, D. J., Roberts, E., Crow, Y., Bond, J., Mubaidin, A., Wriekat, A. L., et al. (2001). Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet*, 38(10), 680-682.
- Hardy, J., Cai, H., Cookson, M. R., Gwinn-Hardy, K., and Singleton, A. (2006). Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol*, 60(4), 389-398.
- Hattori, N., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Yamamura, Y., Yoshino, H., et al. (1998). Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol*, 44(6), 935-941.
- Hattori, N., Matsumine, H., Asakawa, S., Kitada, T., Yoshino, H., Elibol, B., et al. (1998). Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 249(3), 754-758.
- Hawkes HC., Tredici KD., Braak H., (2007). Review: Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33, 599-614
- Hawkes HC., Tredici KD., Braak H., (2009). Parkinson's Disease The Dual Hit Theory Revisited 2009 International Symposium on Olfaction and Taste: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1170: 615-622.

- Hayashi, S., Wakabayashi, K., Ishikawa, A., Nagai, H., Saito, M., Maruyama, M., et al. (2000). An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov Disord*, 15(5), 884-888.
- Hayashida, K., Oyanagi, S., Mizutani, Y., and Yokochi, M. (1993). An early cytoplasmic change before Lewy body maturation: an ultrastructural study of the substantia nigra from an autopsy case of juvenile parkinsonism. *Acta Neuropathol*, 85(4), 445-448.
- Haywood, A. F., and Staveley, B. E. (2004). Parkin counteracts symptoms in a Drosophila model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci*, 5, 14.
- He, Y., and Smith, R. (2009). Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci*, 66(7), 1239-1256.
- Hedrich, K., Eskelson, C., Wilmot, B., Marder, K., Harris, J., Garrels, J., et al. (2004). Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord*, 19(10), 1146-1157.
- Hedrich, K., Kann, M., Lanthaler, A. J., Dalski, A., Eskelson, C., Landt, O., et al. (2001). The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet*, 10(16), 1649-1656.
- Henn, I. H., Bouman, L., Schlehe, J. S., Schlierf, A., Schramm, J. E., Wegener, E., et al. (2007). Parkin mediates neuroprotection through activation of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. *J Neurosci*, 27(8), 1868-1878.
- Hicks, A. A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H. S., Sainz, J., et al. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 52(5), 549-555.
- Higashitsuji, H., Itoh, K., Sakurai, T., Nagao, T., Sumitomo, Y., Masuda, T., et al. (2005). The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer Cell*, 8(1), 75-87.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419(6903), 135-141.
- Hoehn, M. M., and Yahr, M. D. (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17(5), 427-442.
- Hoeller, D., Hecker, C. M., and Dikic, I. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 6(10), 776-788.
- Houlden, H., and Singleton, A. B. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 124(3), 325-338.
- Hristova, V. A., Beasley, S. A., Rylett, R. J., and Shaw, G. S. (2009). Identification of a novel Zn<sup>2+</sup>-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem*, 284(22), 14978-14986.
- Hughes, A. J., Ben-Shlomo, Y., Daniel, S. E., and Lees, A. J. (1992). What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology*, 42(6), 1142-1146.
- Hunot, S., and Hirsch, E. C. (2003). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S49-58; discussion S58-60.
- Huynh, D. P., Scoles, D. R., Nguyen, D., and Pulst, S. M. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet*, 12(20), 2587-2597.
- Hyun, D. H., Lee, M., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Halliwell, B., et al. (2002). Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem*, 277(32), 28572-28577.

- Iida, H., and Yahara, I. (1985). Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature*, 315, 688 - 690.
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I., et al. (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, 10(1), 55-67.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., and Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, 105(7), 891-902.
- Imam, S. Z., Zhou, Q., Yamamoto, A., Valente, A. J., Ali, S. F., Bains, M., et al. (2011). Novel regulation of parkin function through c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*, 31(1), 157-163.
- Irrcher, I., Aleyasin, H., Seifert, E. L., Hewitt, S. J., Chhabra, S., Phillips, M., et al. (2010). Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum Mol Genet*, 19(19), 3734-3746.
- Ishikawa, A., and Takahashi, H. (1998). Clinical and neuropathological aspects of autosomal recessive juvenile parkinsonism. *J Neurol*, 245(11 Suppl 3), P4-9.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.
- Jiang, H., Jiang, Q., and Feng, J. (2004). Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *J Biol Chem*, 279(52), 54380-54386.
- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., and Youle, R. J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*, 191(5), 933-942.
- Joch, M., Ase, A. R., Chen, C. X., MacDonald, P. A., Kontogianna, M., Corera, A. T., et al. (2007). Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels. *Mol Biol Cell*, 18(8), 3105-3118.
- Johnson, L. N., and Barford, D. (1993). The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 22, 199-232.
- Kahns, S., Lykkebo, S., Jakobsen, L. D., Nielsen, M. S., and Jensen, P. H. (2002). Caspase-mediated parkin cleavage in apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 277(18), 15303-15308.
- Kalia, S. K., Lee, S., Smith, P. D., Liu, L., Crocker, S. J., Thorarinsdottir, T. E., et al. (2004). BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron*, 44(6), 931-945.
- Kalume, D. E., Molina, H., and Pandey, A. (2003). Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr Opin Chem Biol*, 7(1), 64-69.
- Kann, M., Jacobs, H., Mohrmann, K., Schumacher, K., Hedrich, K., Garrels, J., et al. (2002). Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*, 51(5), 621-625.
- Kao, S. Y. (2009a). DNA damage induces nuclear translocation of parkin. *J Biomed Sci*, 16, 67.
- Kao, S. Y. (2009b). Regulation of DNA repair by parkin. *Biochem Biophys Res Commun*, 382(2), 321-325.
- Kasap, M. (2007). *Escherichia coli*'den Rekombinant Protein Yapılımı (Ekspresyonu) ve Ni-NTA Saflaştırılması. In R. Durmaz (Ed.), *IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu* (pp. 255-267). Malatya: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti-Bakteri Genetiği Çalışma Grubu Malatya Moleküler ve Klinik Mikrobiyoloji Derneği
- Kasap, M., Akpınar, G., Ergul, E., İdrisoglu, HA., Sazcı, A. (2007). Two novel missence mutations were found in a Park2 gene and may be related to development of the early onset parkinsonism. *Movement Disorders*, 22, 203-204.

- Kasap, M., Akpınar, G., Sazcı, A., Idrisoglu, H. A., and Vahaboglu, H. (2009). Evidence for the presence of full-length PARK2 mRNA and Parkin protein in human blood. *Neurosci Lett*, 460(3), 196-200.
- Kasap, M., Akpınar, G. (2011). Parkinson Hastalığı Tanısında Proteomiks Yaklaşımlarının Yeri ve Biyobelirteç Arayışları. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 31(3), 691-701.
- Kasap, M., Torol, S., Gacar, G. (2008). Comparison of Electrocompetencies of Some Commonly Used Laboratory Strains of Escherichia coli. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(2), 19-22.
- Kashima, T., Rao, N., David, C. J., and Manley, J. L. (2007). hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet*, 16(24), 3149-3159.
- Kato, K., Asai, R., Shimizu, A., Suzuki, F., and Ariyoshi, Y. (1983). Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clin Chim Acta*, 127(3), 353-363.
- Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., Honjyo, Y., Shibasaki, H., and Budka, H. (2002). 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(3), 245-253.
- Kay, D. M., Stevens, C. F., Hamza, T. H., Montimurro, J. S., Zabetian, C. P., Factor, S. A., et al. (2010). A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2. *Neurology*, 75(13), 1189-1194.
- Kieper, N., Holmstrom, K. M., Ciceri, D., Fiesel, F. C., Wolburg, H., Ziviani, E., et al. (2010). Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res*, 316(7), 1213-1224.
- Kim, R. H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G. C., et al. (2005). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, 7(3), 263-273.
- Kim, R. H., Smith, P. D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., Pownall, S., et al. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14), 5215-5220.
- Kim, S. H., Fountoulakis, M., Cairns, N., and Lubec, G. (2001). Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*(61), 223-235.
- Kim, Y., Park, J., Kim, S., Song, S., Kwon, S. K., Lee, S. H., et al. (2008). PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(3), 975-980.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608.
- Klein, C., Lohmann-Hedrich, K., Rogaeva, E., Schlossmacher, M. G., and Lang, A. E. (2007). Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol*, 6(7), 652-662.
- Klein, R. L., Dayton, R. D., Henderson, K. M., and Petrucelli, L. (2006). Parkin is protective for substantia nigra dopamine neurons in a tau gene transfer neurodegeneration model. *Neurosci Lett*, 401(1-2), 130-135.
- Ko, H. S., Kim, S. W., Sriram, S. R., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2006). Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. *J Biol Chem*, 281(24), 16193-16196.
- Ko, H. S., Lee, Y., Shin, J. H., Karuppagounder, S. S., Gadad, B. S., Koleske, A. J., et al. (2010). Phosphorylation by the c-Abl protein tyrosine kinase inhibits parkin's

- ubiquitination and protective function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(38), 16691-16696.
- Ko, H. S., von Coelln, R., Sriram, S. R., Kim, S. W., Chung, K. K., Pletnikova, O., et al. (2005). Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J Neurosci*, 25(35), 7968-7978.
- Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2005). A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep*, 6(4), 321-326.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., et al. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 18(2), 106-108.
- Kruger, R., Vieira-Saecker, A. M., Kuhn, W., Berg, D., Muller, T., Kuhn, N., et al. (1999). Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol*, 45(5), 611-617.
- Kubo, S. I., Kitami, T., Noda, S., Shimura, H., Uchiyama, Y., Asakawa, S., et al. (2001). Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem*, 78(1), 42-54.
- Kumar, K. R., Djarmati-Westenberger, A., and Grunewald, A. (2011). Genetics of Parkinson's disease. *Semin Neurol*, 31(5), 433-440.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Shono, M., Akaike, M., Azuma, H., et al. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet*, 15(6), 883-895.
- Lamour, Y., Scarna, H., Roudier, M., Safer, S., and Davous, P. (1988). Serum neuron-specific enolase in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett*, 86(2), 241-244.
- Langston, J. W., and Ballard, P. A., Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*, 309(5), 310.
- Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiras, W. G., Pezzoli, G., et al. (2008). Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 82(4), 822-833.
- Lee, S. J., Kim, S. J., Kim, I. K., Ko, J., Jeong, C. S., Kim, G. H., et al. (2003). Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *J Biol Chem*, 278(45), 44552-44559.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., et al. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395(6701), 451-452.
- Licker, V., Kovari, E., Hochstrasser, D. F., and Burkhard, P. R. (2009). Proteomics in human Parkinson's disease research. *J Proteomics*, 73(1), 10-29.
- Lincoln, S. J., Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Bounds, R., de Andrade, M., Bower, J. H., et al. (2003). Parkin variants in North American Parkinson's disease: cases and controls. *Mov Disord*, 18(11), 1306-1311.
- Liu, H., Wang, Y., Zhang, Y., Song, Q., Di, C., Chen, G., et al. (1999). TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun*, 254(1), 203-210.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z., and Lansbury, P. T., Jr. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, 111(2), 209-218.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

- Lucking, C. B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., et al. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, 342(21), 1560-1567.
- Lutz, A. K., Exner, N., Fett, M. E., Schlehe, J. S., Kloos, K., Lammermann, K., et al. (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem*, 284(34), 22938-22951.
- Mamah, C. E., Lesnick, T. G., Lincoln, S. J., Strain, K. J., de Andrade, M., Bower, J. H., et al. (2005). Interaction of alpha-synuclein and tau genotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57(3), 439-443.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934.
- Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlan, M. C., Gasser, T., Hattori, N., et al. (2003). Collaborative reanalysis of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL-1) gene S18 variant and its association with Parkinson's disease (PD) *Neurology* 60, A280-A281.
- Marangos, P. J., Zis, A. P., Clark, R. L., and Goodwin, F. K. (1978). Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res*, 150(1), 117-133.
- Marras, C., and Lang, A. (2008). Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. *Neurology*, 70(21), 1996-2003.
- Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem*, 281(6), 3204-3209.
- Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., et al. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet*, 60(3), 588-596.
- Matsumine, H., Yamamura, Y., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kuzuhara, S., and Mizuno, Y. (1998). Early onset parkinsonism with diurnal fluctuation maps to a locus for juvenile parkinsonism. *Neurology*, 50(5), 1340-1345.
- McCormack, A. L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A. B., Thiffault, C., Langston, J. W., Cory-Slechta, D. A., et al. (2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*, 10(2), 119-127.
- Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D. J., and Lemberg, M. K. (2011). The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J Neurochem*, 117(5), 856-867.
- Meng, F., Yao, D., Shi, Y., Kabakoff, J., Wu, W., Reicher, J., et al. (2011). Oxidation of the cysteine-rich regions of parkin perturbs its E3 ligase activity and contributes to protein aggregation. *Mol Neurodegener*, 6, 34.
- Miyazaki, I., and Asanuma, M. (2008). Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama*, 62(3), 141-150.
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., et al. (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 163(3), 1450-1455.
- Mizuno, Y., Suzuki, K., and Ohta, S. (1990). Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 96(1), 49-57.
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 28, 57-87.



- Morgan, J. C., Mehta, S. H., and Sethi, K. D. (2010). Biomarkers in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10(6), 423-430.
- Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., et al. (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology*, 51(3), 890-892.
- Muqit, M. M., Davidson, S. M., Payne Smith, M. D., MacCormac, L. P., Kahns, S., Jensen, P. H., et al. (2004). Parkin is recruited into aggresomes in a stress-specific manner: over-expression of parkin reduces aggresome formation but can be dissociated from parkin's effect on neuronal survival. *Hum Mol Genet*, 13(1), 117-135.
- Mytilineou, C., Werner, P., Molinari, S., Di Rocco, A., Cohen, G., and Yahr, M. D. (1994). Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 8(3), 223-228.
- Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S. M., et al. (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun*, 231(2), 509-513.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183(5), 795-803.
- Ng, P. C., and Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3812-3814.
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat*, 31(7), 763-780.
- Okui, M., Yamaki, A., Takayanagi, A., Kudoh, J., Shimizu, N., and Shimizu, Y. (2005). Transcription factor single-minded 2 (SIM2) is ubiquitinated by the RING-IBR-RING-type E3 ubiquitin ligases. *Exp Cell Res*, 309(1), 220-228.
- Oliva, D., Cali, L., Feo, S., and Giallongo, A. (1991). Complete structure of the human gene encoding neuron-specific enolase. *Genomics*, 10(1), 157-165.
- Olzmann, J. A., Li, L., Chudaeu, M. V., Chen, J., Perez, F. A., Palmiter, R. D., et al. (2007). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *J Cell Biol*, 178(6), 1025-1038.
- Orth, M., and Schapira, A. H. (2002). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 40(6), 533-541.
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., et al. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*, 19(14), 5782-5791.
- Oyarce, A. M., and Fleming, P. J. (1991). Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 290(2), 503-510.
- Paisan-Ruiz, C., Bhatia, K. P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N. W., et al. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol*, 65(1), 19-23.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simon, J., van der Brug, M., et al. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44(4), 595-600.
- Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., et al. (2002). Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet*, 71(1), 124-135.

- Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., et al. (2003). Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet*, 72(4), 1053-1057.
- Paolini, M., Sapone, A., and Gonzalez, F. J. (2004). Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability. *Trends Pharmacol Sci*, 25(3), 124-129.
- Parker, W. D., Jr., Parks, J. K., and Swerdlow, R. H. (2008). Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res*, 1189, 215-218.
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2), 223-236; discussion 222.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., et al. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, 21(8), 921-926.
- Periquet, M., Corti, O., Jacquier, S., and Brice, A. (2005). Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem*, 95(5), 1259-1276.
- Periquet, M., Latouche, M., Lohmann, E., Rawal, N., De Michele, G., Ricard, S., et al. (2003). Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain*, 126(Pt 6), 1271-1278.
- Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P. J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., et al. (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, 36(6), 1007-1019.
- Pineda-Trujillo, N., Carvajal-Carmona, L. G., Buritica, O., Moreno, S., Uribe, C., Pineda, D., et al. (2001). A novel Cys212Tyr founder mutation in parkin and allelic heterogeneity of juvenile Parkinsonism in a population from North West Colombia. *Neurosci Lett*, 298(2), 87-90.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*, 86(6), 985-994.
- Polymeropoulos, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., Johnson, W. G., Ide, S. E., Di Iorio, G., et al. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, 274(5290), 1197-1199.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047.
- Poole, A. C., Thomas, R. E., Yu, S., Vincow, E. S., and Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One*, 5(4), e10054.
- Poon, H. F., Frasier, M., Shreve, N., Calabrese, V., Wolozin, B., and Butterfield, D. A. (2005). Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 18(3), 492-498.
- Poon, H. F., Shepherd, H. M., Reed, T. T., Calabrese, V., Stella, A. M., Pennisi, G., et al. (2006). Proteomics analysis provides insight into caloric restriction mediated oxidation and expression of brain proteins associated with age-related impaired cellular processes: Mitochondrial dysfunction, glutamate dysregulation and impaired protein synthesis. *Neurobiol Aging*, 27(7), 1020-1034.
- Potashkin, J. A., Blume, S. R., and Runkle, N. K. (2011). Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 658083.

- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., et al. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 38(10), 1184-1191.
- Reinders, J., and Sickmann, A. (2005). State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics*, 5(16), 4052-4061.
- Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci*, 23(8), 3316-3324.
- Rochet, J. C., Hay, B. A., and Guo, M. (2012). Molecular insights into Parkinson's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 107, 125-188.
- Rothfuss, O., Fischer, H., Hasegawa, T., Maisel, M., Leitner, P., Miesel, F., et al. (2009). Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet*, 18(20), 3832-3850.
- Royds, J. A., Parsons, M. A., Taylor, C. B., and Timperley, W. R. (1982). Enolase isoenzyme distribution in the human brain and its tumours. *J Pathol*, 137(1), 37-49.
- Ruiz, P., and Birchmeier, W. (1998). The plakoglobin knock-out mouse: a paradigm for the molecular analysis of cardiac cell junction formation. *Trends Cardiovasc Med*, 8(3), 97-101.
- Saha, S., Guillily, M. D., Ferree, A., Lanceta, J., Chan, D., Ghosh, J., et al. (2009). LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 29(29), 9210-9218.
- Sakaguchi, M., Sonogawa, H., Murata, H., Kitazoe, M., Futami, J., Kataoka, K., et al. (2008). S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes. *Mol Biol Cell*, 19(1), 78-85.
- Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., et al. (2003). Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep*, 4(3), 301-306.
- Santoro, L., Breedveld, G. J., Manganelli, F., Iodice, R., Pisciotta, C., Nolano, M., et al. (2011). Novel ATP13A2 (PARK9) homozygous mutation in a family with marked phenotype variability. *Neurogenetics*, 12(1), 33-39.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., et al. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41(12), 1303-1307.
- Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., et al. (2006). 14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase. *EMBO J*, 25(1), 211-221.
- Satoh, J., Onoue, H., Arima, K., and Yamamura, T. (2005). The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(10), 858-868.
- Savitt, J. M., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest*, 116(7), 1744-1754.
- Schafer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21(4), 134-140.
- Schlessinger, J. (1993). Cellular signaling by receptor tyrosine kinases. *Harvey Lect*, 89, 105-123.
- Sha, D., Chin, L. S., and Li, L. (2010). Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Hum Mol Genet*, 19(2), 352-363.
- Shen, Y., and Hendershot, L. M. (2005). ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell*, 16(1), 40-50.

- Shi, Y., Xu, P., and Qin, J. (2011). Ubiquitinated proteome: Ready for global? *Mol Cell Proteomics*.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 25(3), 302-305.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., et al. (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol*, 45(5), 668-672.
- Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., et al. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*, 293(5528), 263-269.
- Shin, J. H., Ko, H. S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y. I., Pletinkova, O., et al. (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, 144(5), 689-702.
- Shin, J. H., Weitzdoerfer, R., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2004). Expression of cystathionine beta-synthase, pyridoxal kinase, and ES1 protein homolog (mitochondrial precursor) in fetal Down syndrome brain. *Neurochem Int*, 45(1), 73-79.
- Simon-Sanchez, J., Scholz, S., Fung, H. C., Matarin, M., Hernandez, D., Gibbs, J. R., et al. (2007). Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum Mol Genet*, 16(1), 1-14.
- Sina, F., Shojaee, S., Elahi, E., and Paisan-Ruiz, C. (2009). R632W mutation in PLA2G6 segregates with dystonia-parkinsonism in a consanguineous Iranian family. *Eur J Neurol*, 16(1), 101-104.
- Sobel, A. (1991). Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci*, 16(8), 301-305.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*, 15(3), 1265-1273.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840.
- Staropoli, J. F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., and Abeliovich, A. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, 37(5), 735-749.
- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., et al. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 14(15), 2099-2111.
- Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., and Goldberg, J. A. What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Prog Brain Res*, 183, 59-77.
- Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., and Goldberg, J. A. (2010). What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Prog Brain Res*, 183, 59-77.
- Takahashi, T., Deng, Y., Maruyama, W., Dostert, P., Kawai, M., and Naoi, M. (1994). Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect*, 98(2), 107-118.
- Tanaka, K., Suzuki, T., Hattori, N., and Mizuno, Y. (2004). Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 235-247.

- Tanner, C. M. (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 10(2), 317-329.
- Thomas, K. J., McCoy, M. K., Blackinton, J., Beilina, A., van der Brug, M., Sandebring, A., et al. (2011). DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum Mol Genet*, 20(1), 40-50.
- Tipton, K. F., McCrodden, J. M., and Youdim, M. B. (1986). Oxidation and enzyme-activated irreversible inhibition of rat liver monoamine oxidase-B by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem J*, 240(2), 379-383.
- Trempe, J. F., Chen, C. X., Grenier, K., Camacho, E. M., Kozlov, G., McPherson, P. S., et al. (2009). SH3 domains from a subset of BAR proteins define a Ubl-binding domain and implicate parkin in synaptic ubiquitination. *Mol Cell*, 36(6), 1034-1047.
- True, H. L. (2006). The battle of the fold: chaperones take on prions. *Trends Genet*, 22(2), 110-117.
- Tsai, Y. C., Fishman, P. S., Thakor, N. V., and Oyler, G. A. (2003). Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem*, 278(24), 22044-22055.
- Um, J. W., and Chung, K. C. (2006). Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *J Neurosci Res*, 84(7), 1543-1554.
- Um, J. W., Min, D. S., Rhim, H., Kim, J., Paik, S. R., and Chung, K. C. (2006). Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2. *J Biol Chem*, 281(6), 3595-3603.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158-1160.
- Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., et al. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet*, 68(4), 895-900.
- van der Reijden, B. A., Erpelinck-Verschueren, C. A., Lowenberg, B., and Jansen, J. H. (1999). TRIADs: a new class of proteins with a novel cysteine-rich signature. *Protein Sci*, 8(7), 1557-1561.
- van Duijn, C. M., Dekker, M. C., Bonifati, V., Galjaard, R. J., Houwing-Duistermaat, J. J., Snijders, P. J., et al. (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet*, 69(3), 629-634.
- Vidailhet, M., Bonnet, A. M., Marconi, R., Durif, F., and Agid, Y. (1999). The phenomenology of L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 14 Suppl 1, 13-18.
- Vila, M., Vukosavic, S., Jackson-Lewis, V., Neystat, M., Jakowec, M., and Przedborski, S. (2000). Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem*, 74(2), 721-729.
- Vilarino-Guell, C., Wider, C., Ross, O. A., Dachsel, J. C., Kachergus, J. M., Lincoln, S. J., et al. (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89(1), 162-167.
- Villa, C., Fenoglio, C., De Riz, M., Clerici, F., Marcone, A., Benussi, L., et al. (2011). Role of hnRNP-A1 and miR-590-3p in neuronal death: genetics and expression analysis in patients with Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Rejuvenation Res*, 14(3), 275-281.
- Wang, C., Ko, H. S., Thomas, B., Tsang, F., Chew, K. C., Tay, S. P., et al. (2005). Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet*, 14(24), 3885-3897.

- Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., et al. (2011). Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem*, 286(13), 11649-11658.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., et al. (2011). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*, 147(4), 893-906.
- Wersinger, C., and Sidhu, A. (2003). Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett*, 340(3), 189-192.
- West, A. B., Moore, D. J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W. W., Ross, C. A., et al. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(46), 16842-16847.
- Wilkinson, K. D., Lee, K. M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J. M., and Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science*, 246(4930), 670-673.
- Winklhofer, K. F., Henn, I. H., Kay-Jackson, P. C., Heller, U., and Tatzelt, J. (2003). Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *J Biol Chem*, 278(47), 47199-47208.
- Wold, F. (1971). Enolase In: The Enzymes. In B. P. D. (Ed.), (pp. 499-538). New York: Academic Press
- Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., and Markopoulou, K. (2001). Familial Parkinson's disease and related conditions. Clinical genetics. *Adv Neurol*, 86, 33-43.
- Xie, H. R., Hu, L. S., and Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*, 123(8), 1086-1092.
- Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Choo, Y. S., Ma, H., Tang, C., et al. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*, 119(3), 650-660.
- Xun, Z., Sowell, R. A., Kaufman, T. C., and Clemmer, D. E. (2008). Quantitative proteomics of a presymptomatic A53T alpha-synuclein Drosophila model of Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics*, 7(7), 1191-1203.
- Yao, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z. Q., Ma, Y., Gaston, B., et al. (2004). Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29), 10810-10814.
- Yoshino, H., Tomiyama, H., Tachibana, N., Ogaki, K., Li, Y., Funayama, M., et al. (2010). Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology*, 75(15), 1356-1361.
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, 55(2), 164-173.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), 13354-13359.
- Zhang, Y., Valina L. Dawson, b, c, Ted M. Dawson. (2001). Parkin: clinical aspects and neurobiology. *Clinical Neuroscience Research*, 1(6), 467-482.
- Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., et al. (2008). The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33), 12022-12027.
- Zhu, J., and Chu, C. T. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2, S325-334.

- Zimprich, A., Benet-Pages, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman, M. N., et al. (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89(1), 168-175.
- Ziviani, E., Tao, R. N., and Whitworth, A. J. (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11), 5018-5023.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### SİNEM TOROL ÖZGÜL

Adres: Y. Sultan Mah. Aydınlar Sok. Kültür Sit. A-1 Derince, KOCAELİ

Cep: (541) 4433789

E-mail: sinemtorol@yahoo.com

Uyruğu: TC

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 05 Haziran 1980

#### İş Deneyimi:

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Proteomiks Laboratuvarı Kocaeli, 2008– 2012

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Proje Araştırma Laboratuvarı Kocaeli, 2004–2008

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı Kocaeli, 01 Temmuz - 01 Eylül 2003, Stajyer

#### Eğitim Bilgileri:

2008-2012 Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Anabilim Dalı, Doktora Programı, Araştırma Görevlisi

2005-2008 Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, Araştırma Görevlisi

1999-2004 İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans

1994-1998 İzmit Süper Lisesi