

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**SH-SY5Y HÜCRELERİ KULLANILARAK**

**6 HİDROKSİ DOPAMİN (6-OHDA)**

**ARACILIĞIYLA OLUŞTURULAN**

***In vitro* PARKİNSON MODELİNDE**

**P90RSK ve P38 SİNYAL YOLAKLARININ**

**GSK-3B DÜZENLEMESİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Güner Gamze BEYOĞLU**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ersin O. KOYLU**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 614.02.07**

**Sunuş Tarihi: 22.07.2014**

**Bornova-İZMİR**

**2014**







Güner Gamze BEYOĞLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “SH-SY5Y Hücreleri Kullanılarak 6 hidroksi dopamin (6-OHDA) Aracılığıyla Oluşturulan *In vitro* Parkinson Modelinde P90RSK ve P38 Sinyal Yolaklarının GSK3B Düzenlemesine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **22.07.2014** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ersin O. KOYLU**

.....

**Raportör Üye : Doç. Dr Oğuz GÖZEN**

.....

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Burcu TEPEDELEN**

.....









## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “SH-SY5Y Hücreleri Kullanılarak 6 hidroksi dopamin (6-OHDA) Aracılığıyla Oluşturulan *İn vitro* Parkinson Modelinde P90RSK ve P38 Sinyal Yolaklarının GSK3B Düzenlemesine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22 / 07 / 2014

Güner Gamze BEYOĞLU







**ÖZET****SH-SY5Y Hücreleri Kullanılarak 6 Hidroksi Dopamin (6-OHDA)  
Aracılığıyla Oluşturulan *In vitro* Parkinson Modelinde P90RSK ve P38  
Sinyal Yolaklarının GSK-3 $\beta$  Düzenlemesine Etkilerinin Araştırılması**

BEYOĞLU, Güner Gamze

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ersin O. KOYLU  
Temmuz 2014, 68 sayfa

Parkinson hastalığı, kronik ve ilerleyici bir hareket bozukluğudur. Parkinson hastalığının sıklığı toplumlara göre değişkenlik göstermekle birlikte, 50 yaş üzeri kişilerin ortalama yüzde dördü Parkinson hastalığı tanısı almaktadır. Parkinson hastalığı dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize olmakla birlikte, bu hücre ölümünün altında yatan mekanizmalar pek az anlaşılabilmiştir. Bu yüksek lisans tezinin amacı, 6-OHDA ile oluşturulmuş *in vitro* Parkinson modelinde GSK-3 beta ile GSK-3 beta düzenleyicileri olan p90RSK ve p38 sinyal yolaklarının dopaminerjik hücre ölüm mekanizmalarındaki rolünü araştırmaktır. Bu amaçla, SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA ile oluşturulan *in vitro* Parkinson modeli kullanılmış ve p38, p90RSK ve GSK-3 beta inhibitörlerinin uygulanmasından sonra dopaminerjik nöronların hücre sağkalımı değerlendirilmiştir. WST-1 hücre sağkalımı testi sonuçları, p38 ve p90RSK inhibitörlerinin hücre sağkalımı üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığını, buna karşın GSK-3 beta inhibitörünün hücre sağkalımında etkili olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız, 6-OHDA ile oluşturulmuş *in vitro* Parkinson modelinde GSK-3 beta sinyal yolağının olası bir koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Parkinson, SH-SY5Y, 6-OHDA, GSK-3 Beta, p38, P90RSK



**ABSTRACT****Investigation Of The Effect Of P90rsk And P38 Signal Pathways On GSK-3 Beta Regulation İn 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) Induced *In Vitro* Parkinson Model in SH-SY5Y Cells.**

BEYOĞLU, Güner Gamze

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ersin O. KOYLU

JULY 2014, 68 pages

Parkinson's disease is a chronic and progressive movement disorder. Although the incidence of Parkinson's disease varies according to the society, four percent of the people in average aged over 50 are diagnosed as Parkinson's disease. Parkinson's disease characterizes with selective loss of dopaminergic neurons yet, underlying mechanisms of this neuronal death is poorly understood. The aim of this master's thesis is to investigate the role of GSK-3 beta and GSK-3 beta regulators; p90 RSK and p38 signal pathways in dopaminergic cell death mechanisms in a 6-OHDA-induced *in vitro* Parkinson's model. For this purpose, *in vitro* 6-OHDA induced Parkinson model was used in SH-SY5Y cells and then cellular survival of dopaminergic neurons was assessed following p38, p90RSK and GSK-3 beta inhibitor treatments. WST-1 cellular survival test results show that, p38 and p90RSK inhibitors have no significant effect on cell survival whereas GSK-3 Beta inhibitor is likely to be effective on cell survival. Our results suggest that GSK-3 beta signalling pathway may have a possible protective role against 6-OHDA induced cell death in this *in vitro* Parkinsons's disease model.

**Key Words:** Parkinson, SH-SY5Y, 6-OHDA, GSK-3 Beta, p38, P90RSK





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, bana her daim destek olan ve tez çalışmama yön veren danışmanım, sayın Prof. Dr. Ersin O. Koylu'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında, bana yardımcı olan ve gerek akademik, gerek sosyal tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman örnek aldığım değerli hocam, Doç. Dr. Oğuz GÖZEN'e; laboratuvar ortamında beraber çalıştığım Hasibe ŞAHİN ve Müzeyyen UĞUR'a; tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Lutfiye KANIT olmak üzere, Fizyoloji grubunun tüm mevcut üyelerine; Aylin ÖZGÜR'e, Dr. Alper ERDOĞAN'a, Dr. Meltem KARATAŞ'a, Dr. Egemen KAYA'ya ve Dr. Saylav BORA'ya teşekkür ediyorum. Ayrıca, hayatımda maddi, manevi her zaman ve her anlamda bana destek olan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Burcu Erbaykent-TEPEDELEN'e, Yrd. Doç. Dr. Aylin Şendemir-ÜRKMEZ'e ve sevgili arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Lokman VARIŞLI'ya, Dr. Taylan ÖZTÜRK'e ve Dr. Hızır SARICA'ya özel olarak teşekkür ederim.

Son olarak, doğduğum günden beri beni yalnız bırakmayan, her türlü maddi ve manevi desteklerini eksik etmeden beni bugünlere getiren aileme, minnettar olduğumu belirtmek isterim.

**G.Gamze BEYOĞLU**



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xix
SİMGELER, KISALTMALAR VE BİRİMLER DİZİNİ .....	xx
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Sinir Sistemi .....	1
1.1.1 Sinir hücresi .....	2
1.1.2 Sinir sistemi ve enerji gereksinimi.....	4
2. GENEL BİLGİLER .....	6
2.1 Dopamin ve Parkinson Hastalığı .....	6
2.1.1 Bir merkezi sinir sistemi nörotransmitteri:Dopamin.....	6
2.1.2 Dopaminle ilişkili patolojiler .....	9
2.1.3 Parkinson hastalığı ve klinik özellikleri .....	9

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.1.4 Parkinson hastalığını etkileyen faktörler .....	11
2.1.5 Parkinson hastalığının nörokimyasal ve nöropatolojik özellikleri .....	12
2.1.6 Parkinson hastalığı patogenezi .....	14
2.1.7. Proteinlerin hatalı katlanması ve agregasyon.....	15
2.1.8 Azalmış enerji metabolizması.....	15
2.1.9 Oksidatif stres.....	17
2.1.10 Serbest radikallerin neden olduğu membran hasarları.....	18
2.2 6-OHDA Nörotoksitesisi.....	19
2.3 Protein Kinazlar .....	21
2.4 MAPPK Sinyal Yolu.....	22
2.5 GSK3- $\beta$ Sinyal Yolu.....	24
2.6 p90 RSK Sinyal Yolu.....	26
2.7 Amaç.....	28
3. MATERYAL METOD.....	30
3.1 Kolajen ile Kaplama.....	30

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.2 Hücre Kültürü.....	30
3.3 Farklılaştırma.....	30
3.4 İn vitro Parkinson Modeli Oluşturulması.....	31
3.5 WST-1 Sitotoksosite Testi.....	32
4. SONUÇLAR.....	33
4.1 Diferansiye edilen Hücre hattı.....	33
4.2 6-OHDA Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi.....	35
4.3 p38 Sinyal Yolağı İlişkisi.....	36
4.4 p90RSK Sinyal Yolağı İlişkisi.....	37
4.5 GSK-3 beta Sinyal yolağı ilişkisi.....	40
5. TARTIŞMA.....	41
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	66



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Bir Sinir Hücresinin Yapısı ve Aralarındaki Sinyal İletim.....	2
1.2 Schwann Hücresinin Aksonlarla İlişkisi.....	2
2.1 İnsan beyinde dopaminerjik yollar.....	6
2.2 DA metabolizması.....	8
2.3 SNpc dopaminerjik nöronları içerisinde LB'ler.....	13
2.4 Nörodejenerasyonun mekanizması.....	14
2.5 6 -hidroksidopamin'in kimyasal yapısı.....	19
2.7 RSK ve MSK kinazlarının sinyal iletimindeki rolü.....	28
4.1 A Diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücre hattı (10x).....	33
4.1 B Diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücre hattı (40x).....	34
4.1 C Diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücre hattı (10x).....	35
4.1 D Diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücre hattı (40x).....	35
4.2 6-OHDA uygulaması WST-1 sonuçları.....	36

**ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 p38inhibitör uygulamasının hücre sağkalımına etkisi.....	37
4.4 p90RSK inhibitör uygulamasının hücre sağkalımına etkisi.....	38
4.5 GSK-3 beta inhibitör uygulamasının hücre sağkalımına etkisi.....	40



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Sınır Sisteminin Organizasyonu.....	1

**SİMGELER, KISALTMALAR VE BİRİMLER DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AH	Alzheimer Hastalığı
AGC	Protein kinaz Grubu
AKT	Protein Kinaz B
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ATP	Adenin trifosfat
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CAT	Katalaz süperoksit dismutaz
CDK	Siklin bağımlı kinazlar
Clk	Cdc benzeri kinazlar
CMGC	Protein kinaz Grubu
CREB	Yanıt elemanı bağlayıcı protein
COMT	Katekol-o-metil transferaz
ÇSS	Çevresel sinir sistemi
DA	Dopamin
DAT	Dopamin taşıyıcısı
DJ-1	İntegral Mitokondrial Protein
DNA_PK	DNA bağımlı Protein Kinaz

**SİMGELER, KISALTMALAR VE BİRİMLER DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DOPAC	3,4-dihidroksifenil asetik asit
DP	Dihidroksipiridinyum
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ER	Östrojen Reseptör
ER $\alpha$	Östrojen Reseptör alfa
ERK $\frac{1}{2}$	Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2
FADH2	Flavin Adenin Dinükleotid
FGF/ANG II	Farklılaşma faktörü
GSH	Glutatyon
GSK-3	Glikojen Sentaz Kinaz 3
GSK3 $\alpha$	Glikojen Sentaz Kinaz 3alfa
GSK3 $\beta$	Glikojen Sentaz Kinaz 3beta
GPCR	G Proteini ile Eşleştirilmiş Reseptör
HVA	3-metoksi-4-hidroksifenil asetik asit
HH	Hidoksihidrojen
HNE	Hidroksinonenal
HVA	3-metoksi-4-hidroksifenil asetik asit

**SİMGELER, KISALTMALAR VE BİRİMLER DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
kDa	Kilo Dalton
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin
LB	Lewy cisimciği
LC	lokus korelus
MAO	Monoamin oksidaz enzimi
MAO-A	Monoamin oksidaz enzimi-A
MAO-B	Monoamin oksidaz enzimi-B
MAPK	Mitojenlerle aktive olan protein kinazlar
MAPK-JNK	Mitojenlerle aktive olan protein kinazlar-Jun N terminalKinaz
MDA	Malondialdehit
MEKK1	MAPK/ERK Kinaz 1
MNK1	MAPK'in substratları
MMP	Mitokondri membran potansiyelinin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin
mRNA	Mesajcı RNA
MSS	Merkezi sinir sistemi
mTORc2	Rapamisin Duyarlı Kompleks

**SİMGELER, KISALTMALAR VE BİRİMLER DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
NADH+H+	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NM	Nöromelanin
NF-kB	Nüklear Faktör Kappa-B
NOS	Nitrik oksit sentaz
OH	Hidroksil radikali
OS	Oksidatif stres
PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PDK1	Fosfoinosit Bağımlı Kinaz 1
PH	Parkinson hastalığı
PKA	Protein kinaz A
PKB	Protein kinaz B
PKC	Protein kinaz C
ROS	Toksik reaktif oksijen
RSK	Ribozomal kinazlar ailesi
ser9	Serin 9
SN	Substansia nigra
SNPC	Substansia nigra pars kompakta

**SİMGELER, KISALTMALAR VE BİRİMLER DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SOD	Superoksit dismutaz
TH	Tirozin hidroksilaz
Thr	Tironin
Tyr	Tirozin
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TxY	Tironin-x-Tirozin
UCH_L1	Ubiquitin C-terminal hidrolaz
6-OHDA	6 hidroksi dopamin







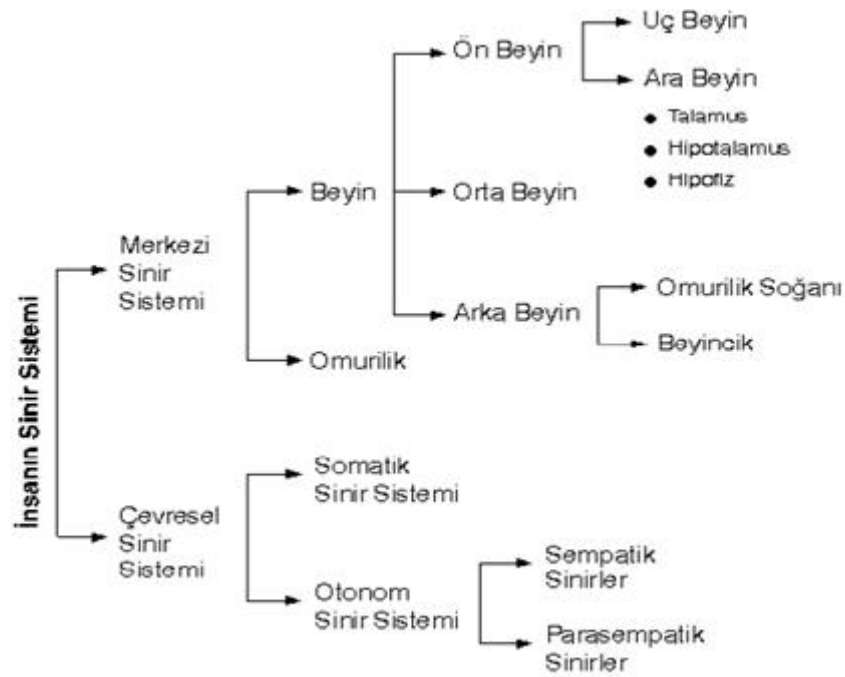




# 1. GİRİŞ

## 1.1 Sinir Sistemi

Vücudun en karmaşık sistemlerinden biri olan sinir sistemi, çok hücreli canlılarda ileri seviyede farklılaşmış bir organizasyona sahip olup; tüm bedensel işlevlerin kontrol ve koordinasyonundan sorumlu sistemdir. Sinir sistemi fonksiyonel ve anatomik açıdan Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ve Çevresel Sinir Sistemi (ÇSS) olarak iki bölüme ayrılır (Çizelge 1.1).

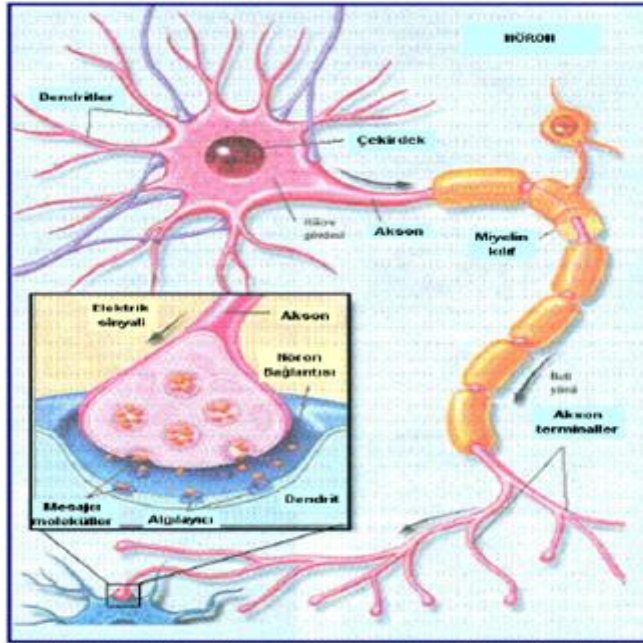


**Çizelge 1.1** Sinir Sisteminin Organizasyonu (Duggan, 2010)

MSS, iç ve dış ortamdaki değişikliklere nasıl yanıtların oluşturulacağı yönünde değerlendirme mekanizmasının yürütülmesini sağlayan bölümdür. İç ve dış ortamdan alınan bilgiler üst merkezlerde değerlendirildikten sonra, bu merkezlerde oluşturulan komutlar yanıtı oluşturacak organa (efektör organ) iletilir (Ganong, 2002).

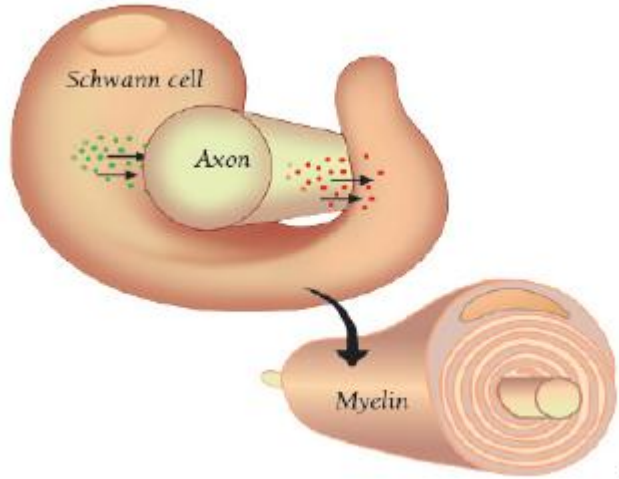
### 1.1.1 Sinir hücresi

Sinir hücresi ya da nöron, sinir sisteminin temel fonksiyonel birimidir. İnsan merkezi sinir sistemi (MSS) yaklaşık 100 milyar nöron içerir. Bu sayının 10-50 katı kadar glia hücresi bulunmaktadır. Sinir sisteminin temel yapıtaşı olan nöronlar, çeşitli uyarılara kasılarak yanıt veren ilkel nöroefektör hücrelerin farklılaşması sonucu gelişmiştir. Daha üst düzey organizmalarda; hayvanlarda, kasılma, kas hücrelerinin özelleşmiş işlevi haline gelmiş, buna karşılık uyarıların bütünleştirilmesi ve iletimi ise nöronların özelleşmiş işlevi olmuştur. Bütün nöronlar; sitoplazma, çekirdek ve hücre organelleri içeren bir hücre gövdesi (soma) ile bu hücre gövdesinden çıkan ve nörit adı verilen uzantılardan oluşur. Nöritler sitoplazmik uzantılar olup hücre zarı ile çevrilidir. Uyarıyı taşıdıkları yöne bağlı olarak kısa uzantılar dendrit, uzun uzantıları akson olarak adlandırılır. Başka hücrelerden gelen uyarılar dendritlerin uçlarından gövdeye doğru iletilirken, hücrenin kendisinde oluşan uyarı akson ucundan diğer hücrelere iletilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Bir Sinir Hücresinin Yapısı ve Aralarındaki Sinyal İletimi (Şenel, 2003)

Bazı nöronların aksonal uzantıları miyelin kılıfına sahiptir. Başka bir deyişle aksonlar, Schwann hücrelerinin hücre zarlarının birçok tabakasından oluşmuş bir protein-lipit bileşiği olan miyelin kılıfı ile sarılıdır. Schwann hücreleri, periferik sinirler boyunca bulunan glia hücreleridir. Bir Schwann hücresi, zarını, bir akson çevresinde bir çok kez dolandırarak sardığında miyelin oluşur (Şekil 1.2). Bütün memeli nöronları miyelinli değildir; omurgasızlardaki nöronların da çoğu miyelinsizdir. Memelilerin MSS’de ise; nöronların çoğu miyelidir; fakat miyelini oluşturan, Schwann hücreleri yerine oligodendroglia hücreleridir. Tek bir nöron üzerinde, miyelin yapan Schwann hücrelerinin aksine, oligodendroglia hücreleri birden çok uzantı yollayarak çevredeki birçok aksonda da miyelin oluşturur. Otoimmün bir hastalık olan multiple sklerozda, MSS’de, miyelinin yama şeklinde olan hasarı söz konusudur. Miyelin kaybına ek olarak miyelinsiz aksonlarda, iletimin gecikmesi veya bloke olması eşlik eder (Rogers, 2011).



**Şekil 1.2** Schwann Hücresinin Aksonlarla İlişkisi (Lewis, 2009)

Sinir hücreleri uyarılabilen hücrelerdir. Uyarı; elektriksel, kimyasal veya mekanik olabilir. Aksonların ucunda, sinaptik yumru adı verilen ve içlerinde bol miktarda veziküller içeren çok sayıda uzantı bulunur. Veziküller içinde nörotransmitter olarak tanımlanan ve bir nöronda aksiyon potansiyeli olarak ortaya çıkan hücresel aktivitenin diğer nörona kimyasal yolla aktarılmasında aracılık eden moleküller bulunmaktadır (Şekil 1.1). Nöronların birbirine bilgi aktarımı yaptıkları bu bölgelere sinaps bölgeleri, iletiye de sinaptik ileti adı verilmektedir (Ganong, 2002).

Sinir sistemi gelişimi tamamlandıktan ve sinaptik bağlantılar oluştuktan sonra, yeni nöron oluşumu çok sınırlı bir düzeye düşer. Buna karşın Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda nedeni henüz bilinmeyen bir şekilde apoptozun indüklenerek nöronların öldüğü düşünülmektedir (Ulukaya, 2004).

### 1.1.2 Sinir sistemi ve enerji gereksinimi

Karmaşık bir yapıda olan sinir sistemi çeşitli biyokimyasal, fizyolojik ve anatomik özelliklere sahiptir. Nöronlar arasındaki etkileşim elektriksel yolla veya kimyasal haberci moleküller tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu iletişim mekanizmasının düzenlenebilmesi için beyinin sağlıklı bir biçimde enerji ihtiyacının karşılanması gerekir (Halliwell and Gutteridge, 1985; Evans, 1993; Strange, 1996).

Beyin dokusu bu enerjiyi sadece oksidatif metabolizmadan elde eder ve küçük bir kütleye sahip olmasına rağmen vücuttaki oksijenin büyük bölümünü kullanır. Nöronal oksidatif fosforilasyon sırasında, serbest radikallerin oluşumu mitokondrial elektron transport zincirinden yüksek enerjili elektronların kaçışı ile gerçekleşir.

Beyin dokusu özellikle oksidatif strese duyarlıdır. Çünkü beyin toplam vücut ağırlığının % 2'sini oluşturmasına rağmen, tüm vücut oksijeninin % 20'sini kullanır. Nöronların membran yüzeyi sitoplazma hacmine oranlandığında, bu oranın membran yüzeyi lehine arttığı bilinmektedir. Beyin hücre zarları büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşur, bunlar lipid peroksidasyon reaksiyonlarında serbest radikallerin başlıca substratlarıdır. Buna ek olarak beyinin savunma mekanizması oldukça zayıftır. Dolayısıyla neredeyse hiç katalaz enzimi içermez. Glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz (SOD) enzimleri ile glutatyon ve E vitamini düzeyleri sınırlıdır. Nöronal ağ anatomik açıdan hasara uğramaya uygundur. Periferik hasara bağlı olarak aksonların uzama yeteneği de sınırlıdır. Rejenerasyon kapasitesi sınırlı olan beyinde, serbest radikallerin oluşmasını sağlayan metaller (örneğin demir) spesifik bölgelerde birikebilir (Evans, 1993; Halliwell and Gutteridge, 1985).

Yaşlanmayla ilgili olan bir çalışmada, aerobik organizmaların hücrelerinde veya hücreleri arasındaki kendiliğinden oluşan kimyasal modifikasyonların nedeni olarak oksijen kaynaklı serbest radikalleri ileri sürülmüştür (Weber, 1994).

Beyin, oldukça yüksek nörokimyasal oksidasyon ve otooksidasyona sahip olan bir organdır. Belirli beyin bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron popülasyonlarının oluşumu sonucunda nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Gerlach et al., 1996). Heterojen hastalık olarak da bilinen nörodejeneratif hastalıklar, farklı klinik fenotip bulgularına ve genetik etiyojiye sahiptir. Bunlar arasında Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla birlikte, epilepsi, Friedrich ataksisi, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) yer almaktadır (Beal, 1995, 1998; Gerlach et al., 1996).

## 2. GENEL BİLGİLER

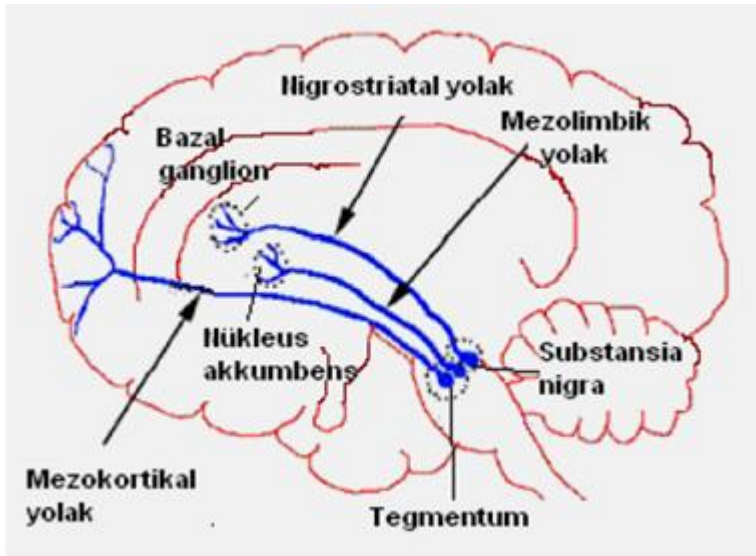
### 2.1 Dopamin ve Parkinson Hastalığı

#### 2.1.1 Bir Merkezi sinir sistemi nörotransmiteri: Dopamin

Beyinde en çok çalışılmış nörotransmitter'lerden olan dopaminin seviyesi çok sayıda mental ve nörolojik hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Dopaminin kaynağı olan dopaminerjik nöronlar, diensefalon, mezensefalon ve bulbus olfaktoryusta lokalize olmuşlardır (Björklund and Hökfelt, 2004).

Beyindeki toplam dopaminerjik hücre sayısının %90'ını oluşturan dopaminerjik nöronlar mezensefalonda bulunmaktadır (Shanker et al., 2004).

Mezensefalik dopaminerjik sistem üç grup halinde incelenebilir. Bunlar nigrostriatal, mezolimbik ve mezokortikal dopaminerjik sistemlerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 İnsan beyinde dopaminerjik yollar (Shanker et al., 2004).



Dopamin(DA) metabolizması 6 basamakta ortaya çıkmaktadır.

1) DA sentezi Tirozin aminoasitiyle başlar ve bir grup enzimatik reaksiyon içerir. Reaksiyondaki hız kısıtlayıcı basamak olan L-tirozinin, L-dihidroksifenilalanine (L-3,4-DOPA)'e dönüşümünün tirozin hidroksilaz (TH) tarafından katalizlendiği basamaktır. L-DOPA daha sonra dekarboksilaz enzimi tarafından aromatik L-aminoasit dopamine dönüştürülmektedir.

2) Sentezlenen bu DA, dopaminerjik sinir terminallerinin sinaptik vezikülleri içerisinde toplanmaktadır. Vezikül içine DA girişi ATP harcayarak protonları vezikül içine pompalayan ve vezikül membranında yer alan bir taşıyıcı proteinin sürdürdüğü hidrojen iyon gradyanı oluşmaktadır.

3) Presinaptik veziküllerden DA serbestlenmesi nöron terminallerindeki ekzositoz yoluyla olmaktadır.

4) Sinaptik alandan serbestlenen DA, postsinaptik membran üzerinde olan DA reseptörlerine bağlanmaktadır. DA reseptörleri farmakolojik ve yapısal özelliklerine göre iki sınıfta incelenebilir.

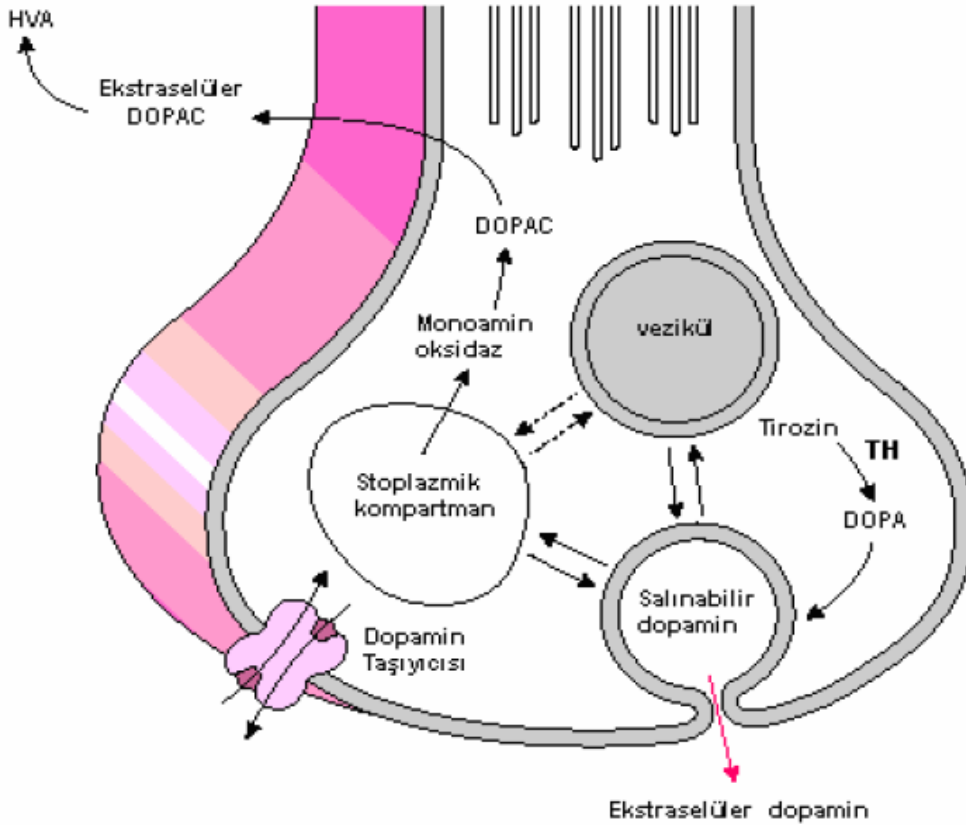
a) D1 sınıfını oluşturan D1 ve D5 reseptörleri, uzun intrasellüler karboksiterminal kuyruğa sahiptirler . D1 sınıfı reseptörler adenilat siklazı aktive edip cAMP sentezini uyarmakta ve fosfatidil inozitol hidrolizini arttırmaktadır.

b) D2 sınıfını oluşturan D2, D3, D4 reseptör proteinlerinin üçüncü lobu D1 sınıfına göre daha uzundur. D2 sınıfı reseptörler cAMP oluşumunu azaltmakta,  $K^+$  ve  $Ca^{++}$  akışını düzenlemektedir.

Dopaminerjik reseptörlerin tümü etkilerini guanin-nükleotid-bağlayıcı proteinler (Gproteinleri) aracılığıyla ortaya koymaktadır. Beyinde farklı anatomik lokalizasyonlarda DA reseptör tipleri vardır. Bunlardan D1 ve D2 proteinleri striatumda, D4 ve D5 proteinleri ekstrasriatal olarak, D3 reseptörü ise nükleus akumbens ve olfaktor tüberkülda geniş bir dağılım göstermektedir.

5) Sinaptik alana serbestlenen dopaminin önemli bir bölümü presinaptik membranda bulunan yüksek afiniteli ATP kullanan bir taşıyıcı tarafından presinaptik nörona geri alınmaktadır.

6) Sinaptik alana serbestlenmiş olan dopaminin daha küçük bir kısmı ise enzimatik yöntemle dönüştürülür. MAO ve katekol-o-metil transferaz (COMT)'ın birbirini takip eden aktiviteleri ile DA önce 3,4-dihidroksifenil asetik asit (DOPAC)'e ve sonra 3-metoksi-4-hidroksifenil asetik asit (HVA)'e dönüştürülmektedir. MAO-A ve MAO-B, MAO enziminin iki izoenzimidir. Striatumda baskın durumda olan MAO-B, dopamin oksidatif metabolizmasının esas sorumlusudur. MAO-B presinaptik uçtaki mitokondrilerin dış membranında ve sinaptik aralıkta bulunmaktadır.



Şekil 2.2 Dopamin metabolizması

Memeli tipine göre incelendiğinde mezensefalik dopaminerjik nöronlar arasında sayısal farklılıklar vardır (Örneğin; yaklaşık olarak insanlarda 590.000, maymunlarında 165.000, sıçanlarda 45.000 civarında). Yaşa bağlı olarak yapılan deneylerde ise insanlarda en çok dopaminerjik nöron içeren mesensefalonda, dopaminerjik nöron sayısının 60 yaşından sonra yaklaşık %41 oranında azaldığı bulunmuştur (Bogerts, Hantsch and Herzer, 1983).

DA düzenlenmesi mental ve fiziksel sağlık için önemlidir çünkü bu düzenlemenin motor davranış, motivasyon ve hafızada etkin rolleri vardır (Shanker et al., 2004).

### **2.1.2 Dopamin ve ilişkili patolojiler**

Dopaminerjik nöronlar demir içeriği, yüksek oksijen metabolizma hızları ve düşük antioksidan seviyeleri gibi bazı özelliklerinden dolayı oksidatif strese(OS) karşı hassastır (Shanker et al., 2004).

Enzimatik ve enzimatik olmayan DA katabolizması sonucu toksik reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturabilmektedir (Halliwell, 1992). DA oksidasyonu, hem geçiş metal iyonları varlığında kendiliğinden hem de MAO enzimi aracılığıyla meydana gelebilmektedir (Shanker et al, 2004). Dopaminerjik hücre kaybı ile ilişkilendirilen en önemli nörodejeneratif hastalık Parkinson hastalığıdır.

### **2.1.3 Parkinson hastalığı ve klinik özellikleri**

Parkinson hastalığı, ilk kez 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından tanımlanmış (Parkinson, 2002) ilerleyici nitelikli nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalık, beynin substansia nigra pars kompakta (SNpc) bölgesinde dramatik bir nöron kaybı sonucunda striatum DA miktarının azalması ile ortaya çıkar (Lotharius and Brundin, 2002). Rijidite, istem dışı tremor ve bradikinezi hareketlerinin yavaşlaması gibi belirtilerle seyreder (Kidd, 2000). Normal koşullar altında substansia nigrada (SN) üretilen DA, striatuma etki ederek motor hareketlerin uyarılmasında ve koordinasyonunda rol oynar. Parkinson hastalığında ise SN'deki DA üreten nöronların kaybı sonucunda korteksin motor hareketleri düzenleme kapasitesi azalmaktadır (Kidd, 2000).

İlerleyici bir hastalık olan PH, semptomatik açıdan istirahat tremoru (uzuvların titremesi), bradikinezi (hareketlerin yavaşlaması), kaslarda sertlik (rijidite) ve duruşsal (postural) dengesizlik ile karakterize edilebilir (Ozansoy M, 2004).

**Tremor:** ‘İstirahat tremoru’ (titreme), PH’nın en iyi tanımlanan spesifik bulgusudur. İstirahat tremoru, dinlenme durumu sırasında meydana gelir ve istemli hareketleri azaltır. Dolayısıyla günlük yaşam aktivitelerini bozacak kadar bir etkiye sahip değildir (Dauer and Przedborski, 2003). İlk motor semptom olarak olguların yaklaşık %50-75’inde tremor ortaya çıkar (Findley and Koller, 1995). PH’da klasik istirahat tremor hızı 4-6 Hz’dir. Tremor sıklıkla ellerde, bazen de ayaklarda, dil, çene ya da dudakta bile olabilir.

**Rijidite:** Rijidite (kas katılığı), tonusun eş zamanlı olarak agonist ve antagonist kaslarda artması sonucu meydana gelir (Çakmur, 2003). Bu rijidite, proksimal (boyun, omuz, kalça) ve distal (el ve ayak bilekleri) yerleşimli olabilir. Genelde tremor gibi tek taraflı başlayan rijidite ilerleyerek karşı tarafa yayılabilir (Hughes et al., 1993). Rijidite, tremora göre daha az değişken bir bulgu olmasına rağmen hastanın fonksiyonel yetersizliğini daha iyi yansıtır.

**Bradikinezi:** Bradikinezi (istemli hareketlerde yavaşlama), PH’da bazal gangliyon fonksiyon yetersizliğinin en karakteristik semptomudur (Hughes et al., 1992). Bradikinezi, hareket yapma yeteneğindeki azalma olarak tanımlanır. Ayrıca; hareketin başlatılmasında gecikme, hareketin amplitüdünün küçülmesi, bir hareketten diğerine geçememe, aynı anda iki hareketi yapamama, hareket yoksunluğu (hipokinezi) ve hareket edememe (akinezi) anlamında da kullanılır (Hughes et al., 1992). Bradikinezinin kendine özgü belirtileri arasında yüzün ifadesiz görünüm alması (bradimimi), monoton konuşma (hipokinetik dizartri), ses volumünde azalma (hipofoni), yutma işlevinin azalmasına bağlı ağızda salya birikimi ve akması (siyalore), yürüme sırasında otomatik kol hareketlerinin azalması veya kaybolması ve adım boyunda azalma sayılabilir. Giyinmek ve yemek yemek gibi günlük işleri yapmak daha uzun zaman alacağından bradikinezi yaşam kalitesini anlamlı derecede bozabilir (Dauer and Przedborski, 2003).

**Postural (Duruşsal) Bozukluk:** Kambur bir postur, düşme ile sonuçlanabilen normal postural refleks ve denge kaybı ve tekerlekli sandalyeye hapsolme söz konusu olabilir (Dauer and Przedborski, 2003).

**Demans (Bunama) ve Emosyonel Değişiklikler:** PH'da kavrama süreçleri yavaşlar, özellikle yaşlı hastalarda demans oldukça sık görülür. Ayrıca Parkinsonlu hastalarda depresyon yaygındır (Dauer and Przedborski, 2003).

#### 2.1.4 Parkinson hastalığını etkileyen faktörler

**Yaş:** PH genellikle 55 yaşın üzerindeki insanlarda görülmekle beraber genç eriskinler hatta çocuklarda bile görülmektedir (Andreas, 2004). 40 yaş altında başlayan olgular 'Erken Baslangıçlı PH', 20 yaşından önce başlayan olgular ise 'Jüvenil PH' olarak tanımlanır. Jüvenil parkinsonizm kalıtsaldır ve farklı bir nigral dejenerasyon görüntüsü vardır (Fahn, 1995). PH'nın tüm hastaların %5'inde, 40 yaşından önce başladığı bilinir (Ross et al., 1996). Görülme sıklığı özellikle yaş ile artan, ilerleyici bir hastalıktır.

**Cinsiyet:** Çalışmaların çoğunda, PH'nın prevalansı erkek ve kadınlar arasında önemli bir farklılık göstermemektedir. Ancak aynı yaş grubundaki kadın ve erkekler karşılaştırıldığında, erkeklerde hastalığa yakalanma riskinin 1,5 kat daha fazla olduğunu tespit edilmiştir (Adler and Ahlskog, 2000; Schoenberg, 1987).

**Çevresel Risk Faktörleri:** Genç narkotik bağımlılarında, MPTP içeren sentetik eroinin intravenöz enjeksiyonu ile ortaya çıkan toksik parkinsonizm olguları, bazı durumlarda ekzojen ajanlara maruz kalmanın, PH'na yol açabileceğini düşündürmüştür. Çeşitli kimyasal maddelerin parkinsonizme yol açtığı bilinmektedir. Fakat MPTP toksini'ne bağlı parkinsonizmin çarpıcı özelliği, daha yaygın santral sinir sistemi harabiyeti yapması beklenirken, tamamen PH'nın anatomik ve klinik özelliklerini göstermesidir (Przedborski and Jackson, 1998). PH'da risk faktörü olabileceği düşünülen diğer faktörler; ekzojen nörotoksinler, eser elementler, siyanid, vernik incelticileri, organik solventler, karbonmonoksit, karbondisülfid, hidrojen sülfid ve nitrik oksittir (Adler and Ahlskog, 2000).

**Travma:** Epidemiyolojik çalışmalar kafa travması ile PH gelişimi arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir ancak bu konuda yapılan çalışmalar halen çelişkilidir (Koller et al., 1989; Michele et al., 1996).

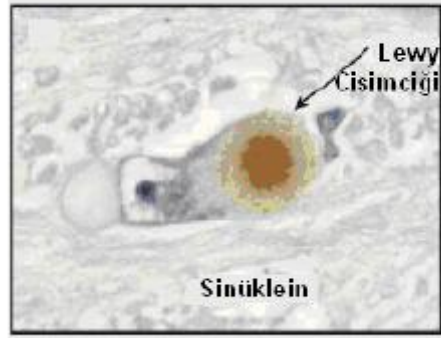
**Genetik Faktörler:** PH durumlarından ortalama %95’inde açık bir genetik bağlantı yoktur, fakat kalan durumlarda hastalık kalıtımsaldır (Dauer and Przedborski, 2003). Yapılan genetik çalışmalarda, hücrelerde görülen mutasyonlar sonucu hastalığa sebep olan çeşitli genetik lokuslar belirlenmiştir. Bunlar 4. kromozom üzerindeki alfa-sinüklein (otozomal dominant) ve UCH-L1 (Ubiquitin C-terminal hidrolaz) (otozomal dominant) genleri, 6. Kromozom üzerindeki parkin geni (otozomal resesif), 1. kromozom üzerindeki DJ-1 geni (otozomal resesif) ile 1, 2, 4, 12. kromozomlar üzerinde yeri saptanan ancak fonksiyonları tam olarak aydınlatılmayan gen lokuslarıdır (Alan et al., 2003). Ancak mutasyonlar ile PH patogenezi arasındaki ilişki henüz açık değildir.

### 2.1.5 Parkinson hastalığının nörokimyasal ve nöropatolojik özellikleri

Parkinson hastalığının patolojik belirteçlerinden ilki, nigrostriatal dopaminerjik nöronların kaybıdır. Nigrostriatal nöronların hücre gövdeleri SNpc’de olup putamene uzanır ve bu nöronlar nöromelanin içerir (Marsden, 1983). SNpc dopaminerjik nöronların %60’ı semptomların başlangıcında kaybedilirken putamende bu oranın %80’e vardığı görülmektedir (Dauer and Przedborski, 2003). Bu durumun sonucunda SNpc dopaminerjik nöronların metabolitleri olan HVA ile DOPAC’ın, dopaminin biyosentetik enzimi tirozin hidroksilazın TH’nin ve DA taşıyıcısı (DAT)’nın azaldığı tespit edilmiştir (Dunnett and Bjorklund, 1999; Jenner and Olanow, 1998). PH ile ilişkili dopaminerjik nöron kaybının topolojisi, normal yaşlanmada görülen modelden farklıdır. PH’da normal yaşlanmaya göre nöron kaybının hızı ve yoğunluğu daha fazladır.

PH ve normal yaşlanma sırasında SNpc’deki etkileşim incelendiğinde farklılıklar olduğu görülmüştür. Normal yaşlanma sırasında SNpc’nin dorsomedial yanı etkilenirken, PH’da ise hücre kaybı SNpc’nin ventrolateral ve kaudal bölgelerinde yoğunlaşmıştır (Fearnley and Lees, 1991).

PH'nın ikinci patolojik belirteci olan Lewy cisimciği (LC) varlığı ilk kez 1912 yılında F.H. Lewy tarafından Parkinson hastalarının beyin sapında, SN'nin NM içeren nöronlarının sitoplazmasında tanımlanmıştır (Pollanen et al.,1993). LC'lerin yapısında sinüklein, parkin, ubiquitin gibi çeşitli proteinler ve nörofilamentler bulunmaktadır (Dauer and Przedborski, 2003). LC'ler karakteristik olarak 15µm'den daha büyük çapa, yoğun hyalin çekirdeğe ve bunun etrafında bulunan net bir ışık halkasına sahiptir (Sekil 2.3).



**Şekil 2.3** SNpc dopaminerjik nöronları içerisinde Lewy cisimleri (Dauer and Przedborski, 2003)

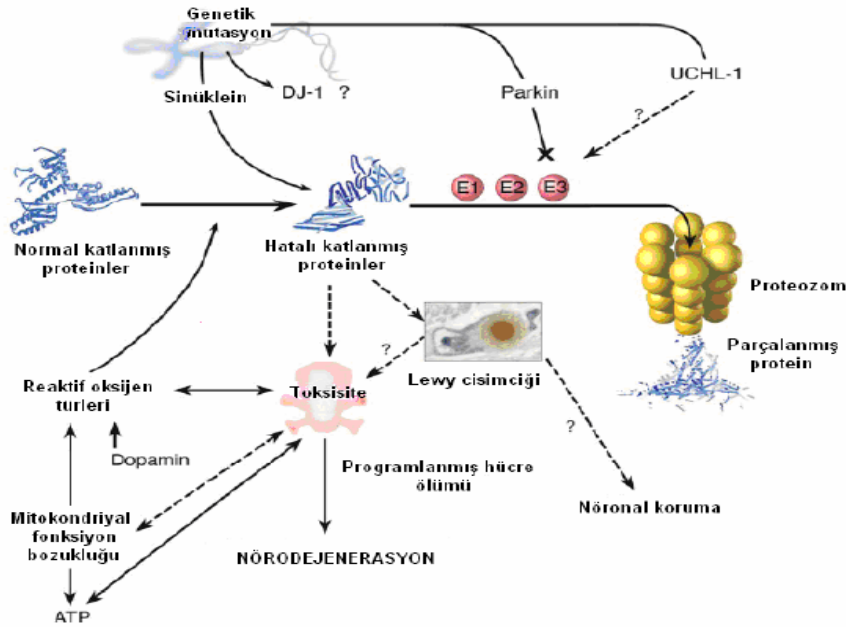
PH'nın patolojisi yaygın olarak yalnızca dopaminerjik nöron kaybı değildir (Hornykiewicz and Kish, 1987). Nörodejenerasyon ve LC oluşumu, serebral korteks, bulbus olfaktoryus ve otonom sinir sisteminde olduğu kadar noradrenerjik (LC: lokus korelus), serotonerjik (rafe) ve kolinerjik (Meynert'in bazal çekirdeği, vagusun dorsal motor çekirdeği) sistemlerde de tespit edilmiştir (Dauer and Przedborski, 2003). PH durumlarının yaklaşık olarak %30'unda meydana geldiği bilinen bu nigral olmayan lezyonlar demans gibi kognitif ve psikolojik bozukluklara sebep olmaktadır (Aarsland et al., 1996). Özellikle ileri yaşlarda ki Parkinson hastalarında görülen demansın nedeni hipokampusun dejenerasyonu ve kolinerjik sistemin etkilenmesi olarak bilinir. Ancak serotonerjik ve noradrenerjik yollardaki lezyonlar dopaminerjik nöronlardaki lezyonlar kadar kesin karakterize edilmemiştir. Bu sistemlerin katılımının hastalığın daha şiddetli veya daha geç evrelerinde olduğu düşünülmektedir.

PH'nı karakterize eden belli başlı patolojik değişiklikler tespit edilse de dopaminerjik nöronların ölümünden sorumlu olan mekanizma ya da

mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Bu sebepten dolayı PH için uygulanan tedavilerin çoğu koruyucu değil, ortaya çıkan semptomları önlemeye yöneliktir.

### 2.1.6 Parkinson hastalığı patogenezi

PH'nın patogeneziyle ilgili olarak iki temel hipotez bilinmektedir. Bu hipotezlerden birinde SNpc dopaminerjik nöronlarının ölümüne neden olarak proteinlerin hatalı katlanması ve agregasyonu ileri sürülmüştür. Diğer hipotezde ise dopaminin oksitlenmesini kapsayan oksidatif stresin neden olduğu mitokondri fonksiyon bozukluğunun etkili olduğu düşünülmektedir (Dauer and Przedborski, 2003). Günümüzde PH çalışmalarının hedefi SNpc dopaminerjik nöronların ölümünde anahtar rol oynadığı düşünülen bu sinyal yollarının aydınlatılmasıdır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Nörodejenerasyonun mekanizması (Dauer and Przedborski, 2003)

### 2.1.7 Proteinlerin hatalı katlanması ve agregasyonu

Beyin dokularında görülen proteinlerin anormal dağılımı PH'nı da kapsayan pek çok yaşa bağımlı nörodejeneratif hastalıkta görülen bir özelliktir. Farklı hastalarda protein agregatlarının kompozisyonu ve yerleşimi farklılık gösterse de



bu değişimin nöronlar için toksik bir etki oluşturduğu bilinmektedir. Agregatlar veya çözünebilir hatalı katlanmış proteinler çeşitli mekanizmalar yoluyla nörotoksik olabilir.

Protein agregatları iki farklı yol ile direkt hasara neden olur. Bunlardan biri hücre yapısının bozulması, diğeri ise nöronlarda iletişimi engellenmesidir. Diğer yandan protein inklüzyonları hücre canlılığı için önemli olan proteinleri işlevsiz duruma getirebilir. Bu nedenle inklüzyon oluşumu ve nörodejenerasyon arasında bir bağlantı olabileceği ileri sürülmüşse de bunun aksini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Saudou et al., 1998; Cummings et al., 1999).

Oksidatif hasar mekanizmasının PH patogeneğinde anahtar rol oynadığı uzun zamandır düşünölmektedir (Przedborski and Jackson-Lewis, 2000).

Yaşla birlikte dokuların oksitlenmiş protein içerikleri artmaktadır (Beckman and Ames, 1998). Nöronlar postmitotik özellik gösterdiklerinden doku içerik artışına karşı özellikle hassas olabilirler. Yapılan in vitro çalışmalarında LC'lerin normal  $\alpha$ -sinökleinlere oranla oksidatif olmaya daha yatkın  $\beta$ -sinökleinleri içerdikleri gösterilmiştir (Giasson et al., 1999). Sonuç olarak proteozomal fonksiyon eksikliği ve bunun sonucunda hatalı katlanmış proteinlerin yığılması tehlikeli bir döngüye sebep olmaktadır.

### **2.1.8 Azalmış enerji metabolizması**

Mitokondri, tüm vücut hücrelerinde olduğu gibi nöronlarda da ATP elde ederek enerji akışının yönlendirildiği organeldir. Krebs döngüsünde NADH+H<sup>+</sup> ile FADH<sub>2</sub>' de toplanan elektronlar, mitokondri iç zarında yer alan enzim yapısında proteinler üzerinden elektrokimyasal gradyan oluşmasını sağlarlar.

Elektron transport zincirinde, bu enzim sisteminin başlangıç yolunu NADH dehidrogenaz (kompleks-I) ve suksinat dehidrogenaz (kompleks-II) oluşturur. Elektronlar bu sistemeflavin mononükleotidler ve kompleks 1 ve 2'nin demir-sülfür merkezlerinden giriş yaparak,ubikinona (koenzim Q) taşınırlar. Ubikinol-sitokrom c oksidoreduktaz (kompleks III) sitokrom b, sitokrom c 1 ve Rieske demir-kükürt proteininden ibaret önemli bir komplekstir.

Koenzim Q' den kompleks III 'e transfer olan elektronlar, bakır içeren ve enzim olan sitokrom c oksidaza (kompleks IV) geçerler. Son olarak da elektronlar oksijen molekülüne aktararak, ATP sentaz'dan (kompleks V) bir molekül ATP'nin sentezini gerçekleştirirler. Elektronlar kompleks I/II' den III. ve IV. komplekslere geçiş yaparken protonlar da mitokondriyal iç zardan geçerek, bir elektrokimyasal gradyan oluşumuna katkıda bulunurlar (Bourre et al., 1990; Ikeda et al., 1996; Lui et al., 1997).

Normal koşullarda elektronlar bir kompleks basamağından diğerine aktarılırken bazı durumlarda elektron sızıntıları meydana gelmektedir. Bu sızıntılar reaktif oksijen türlerinin (ROT) (örneğin: süperoksit radikali, singlet oksijen, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hidroperoksil radikali, hipoklorik asit/hipoklorür) oluşumuna neden olur (Stillwell et al., 1993; Lopez et al., 1995).

Parkinson hastalığına sahip bireylerin beyin dokularında gerçekleştirilen post-mortem araştırmalarda sadece substansia nigra pars kompaktada kompleks-I aktivitesinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Brown, 1998).

Parkinson hastalığını, insan ve hayvan modellerin de aktive eden mitokondriyal iç membranın elektron transport komplekslerinin inhibitörü olan MPTP ( 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin) ( MPP+ metabolitleri aracılığıyla), 6 hidroksi dopamin (6-OHDA) ve rotenon gibi nörotoksinler bulunmaktadır.

Mitokondri hasarları, normal şartlarda elektrokimyasal proton konsantrasyon gradyeni ile sürdürülen edilen mitokondriyal membran potansiyellerinde azalmaya ve Parkinson hastalığı tanısında rol oynayan substansia nigradaki patojenik değişikliklere sebep olur (Chalon et al., 1998). Elektrokimyasal proton konsantrasyon gradyeni enerji depolar ve bu enerjiyi ekzoplazmik alandan veziküllerin içine taşınması amacıyla mitokondriyal sitoplazmik membran bölgesindeki adozintrifosfat (ATP) sentezinin proton transportu aracılığıyla kullanır. ATP sentezi mitokondriyal iç membran hasarı oluşmadığı sürece devam eder.

Substansia nigra mitokondriyal iç membran hasarı nedeniyle oluşan patojenik değişiklikler, serbest radikal oluşumunu ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalmayı tetikler.

### 2.1.9 Oksidatif stres

Endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında yer alan serbest radikaller aracılığı ile oluşan oksidatif stres, Parkinson hastalığında nörodejenerasyon oluşumunda ve ilerleme sürecinde önemli bir rol oynamaktadır.

Reaktif oksijen türlerinden süperoksid radikal, hidrojenperoksid ve hidroksil radikali mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında oluşmaktadır.

Üretilen serbest radikal artmış kalsiyum akımına, beta amiloid birikimine, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonuna ve enzimlerde yaşa bağlı fonksiyon kaybına neden olur.

Ek olarak yapılan in vitro çalışmalar, oksijen radikalleri oluşumunun glutamat stimülasyonu ile ilişkili olan nöronlarla etkileştiklerini göstermiştir. Oluşan radikaller, glutamat serbestlenmesine ve geri alımının baskılanmasında artışa yol açarlar (Okuyama, 1992).

Mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I ile inhibisyonu sonucu hasarlanması oksidatif stresi aktive edebilir. Örnek olarak nöronları 6-OHDA gibi nörotoksinler veya L-dopa'ya karşı etkiye açık hale getirebilir. Ayrıca, 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHDG) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumu (Suzuki et al., 1998), mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonuna (Kompleks I ve II) ve apoptoz meydana gelene kadar kaspaz kaskadının aktivasyonuna neden olur (Brown, 1998).

Güçlü antioksidanlar, dopa toksisitesinin etkili blokerleridir (Malcolm, 2003). Dopaminerjik nöronlarda dopaminin oksidatif deaminasyonu, otooksidasyonu ayrıca hidrojen peroksid ve diğer oksijen radikallerinin oluşumu

monoaminoksidaz (MAO) aracılığı ile meydana gelir. Böylelikle MAO-inhibitorlerinin, radikal üretimini inhibe etme özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir.

### **2.1.10 Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarları**

Hücrelerin önemli bileşiklerinden olan lipit, protein, DNA ve karbonhidratlar serbest radikallerden etkilenir (Shankar et al., 2004; Stillwell et al., 1993). Bu etkileri incelediğimizde hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile serbest radikallerin reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturması sonucunda ortaya çıkar. Bu duruma lipit peroksidasyonu denir ve geri dönüşü olmayan hasar oluşturur (Shankar et al., 2004; Bogerts et al., 1983).

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenmesi ile aminoasit kompozisyonuna bağımlılık durumu meydana gelir. Sülfür ve karbon merkezli radikallerin oluşumu daha çok doymamış bağ veya sülfür içeren amino asitlerin serbest radikaller ile etkileşimi sonucunda meydana gelir. Serbest radikaller için özellikle hem proteinleri önemli birer hedeftir (Bogerts et al., 1983).

Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilmesinden dolayı bazı hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar ( Bogerts et al., 1983). (burası kalıp değişmez)

Parkinson hastalığının etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptotik yolların aktivasyonu gibi faktörler Parkinson patolojisinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Banerjee et al., 2009; Mattson et al., 2002; Schon and Manfredi, 2003).

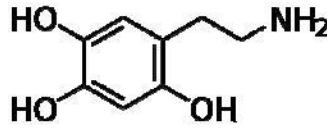
### **2.2 6-OHDA Nörotoksitesisi**

İn vivo ve in vitro Parkinson modelleri hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması ve çeşitli kimyasal maddelerin hastalık üzerine potansiyel etkilerinin araştırılabilmesi açısından önem taşımaktadır. Deneysel Parkinson modeli

oluşturulmasında kullanılan kimyasal maddeler arasında özellikle son yıllarda dikkati çeken paraquat, rotenon ve maneb gibi tarım kimyasalları ile 6-OHDA (6-hidroksidopamin) ve MPTP (1-metil-4-fenil-1236-tetrahidropiridin) gibi katekolaminerjik sistem üzerinden seçici etki gösteren nörotoksinler yer almaktadır (Schober 2004). 6-OHDA güçlü bir nörotoksin olması sebebiyle ve spesifik olarak dopaminerjik hücrelerde apoptozu tetiklediği için, insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücrelerinde Parkinson hastalığı modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cheung et al., 2009; Ju et al., 2010; Lee et al., 2011).

6-OHDA, Senoh tarafından 1959 yılında orijinal olarak izole edilmiştir (Senoh and Witkop, 1959 a,b; Senoh et al., 1959 a,b) ve doğal dopamin nörotransmitterinin hidrosillenmiş türevidir (Şekil 2.5).

İlk olarak Porter ve Stone tarafından otonomik sinir sisteminde biyolojik etki olarak farelerin kalbinde noradrenalin alımında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Porter et al., 1963,1965; Stone et al., 1963). Daha sonra yapılan pek çok çalışmada sinir hücrelerini, özellikle de katekolaminerjik nöronları tahrip etme yeteneklerine sahip olduğu gösterilmiştir (Thoenen and Tranzer, 1968).



Şekil 2.5 6 -hidroksidopamin'in kimyasal yapısı

Bazı çalışmalarda 6-OHDA'nın sistemik enjeksiyonundan sonra kan-beyin bariyerini geçemediği, doğrudan intraserebral uygulama sonrasında ise merkezi nöronal lezyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Lateral ventrikül içerisine 6-OHDA uygulamasının, merkezi katekolaminerjik nöronlarda hasara neden olduğu rapor edilmiştir (Ungerstedt, 1968; Bloom et al., 1969; Uretsky and Iversen, 1970)

Dopaminin hidrosillenmiş analogu olan 6-OHDA, katekolaminerjik nöronlarda dejenerasyona neden olarak DA sentez ve serbestlenmesi azaltan ve bu yolla santral dopaminerjik aktiviteyi bozan bir nörotoksindir (Blum et al., 2001;

Orth and Tabrizi 2003; Schober 2004; Tolwani et al., 1999). 6-OHDA, dopamin veya noradrenalin taşıyıcı moleküllerle hücre içine alınarak sitoplazmada birikmekte ve hücrenin ölümüne yol açmaktadır. 6-OHDA reaktif oksijen türlerinin üretimine (ROS) yol açarak toksik etkisini göstermektedir (Ju et al., 2010; Lee et al., 2011). 6-OHDA hücre içine alınır alınmaz okside olarak parakuinon ve hidrojen perokside dönüşmekte ve hidroksi radikallerin oluşması aracılığıyla ilk toksik etkisini oluşturmaktadır (Schober 2004). Bununla birlikte 6-OHDA süperoksit serbest radikallerinin oluşumuna da yol açarak oksidatif stres aracılığıyla mitokondriyal kompleks-1'in inhibe olmasına neden olmaktadır (Orth and Tabrizi 2003; Schober 2004; Tolwani et al., 1999). Hidroksil ve süperoksit radikalleri; lipid peroksidasyonu, protein hasarı, glutatyon (GSH) ve katalaz süperoksit dismutaz (SOD ve CAT), anti-oksidan seviyelerinin azalması ve mitokondriyal disfonksiyon gibi oksidatif hasarlara neden olmaktadır (Andersen 2004; Perry et al., 1982; Riederer et al., 1989; Saggi et al., 1989; Surendran and Rajasankar, 2010; Vincent et al., 2004).

Bu hasarlar sonucu gözlenen pro-apoptotik faktörlerin ve sitokrom c'nin serbestlenmesi, kaspaz-3 ve 9 aktivitesi mitokondri membran potansiyelinin (MMP) azalması ile sonuçlanır. Çekirdeğe transfer edilen pro-apoptotik sinyaller ise hücre ölümüne yol açmaktadır (Galluzzi et al., 2009; Kroemer et al., 2007).



## 2.4 MAPK Sinyal yolu (p-38)

İlk kez 1987 yılında tanımlanan MAPK'lar sekiz büyük ökaryotik protein kinaz ailesinden biri olan CMGC ailesine dâhildir (Ray and Sturgill 1988). CMGC ailesi; CDK (siklin bağımlı kinazlar), MAPK (mitojenlerle aktive olan protein kinazlar), GSK3 (glukoz sentez kinazlar) ve Clk (Cdc benzeri kinazlar) gibi farklı gruplar içermektedir. MAPK alt grubu; CMGC ailesinin prototipi olarak kabul görmektedir (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999; Kannan and Neuwald, 2004). MAPK ailesi üyeleri, P+1 bölgesinde Pro bulunan substratları fosforillemeleri ve fosforilasyonda Ser aminoasitlerini tercih etmeleri nedeniyle "proline directed ser-thr kinases" olarak isimlendirilmişlerdir (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999). MAPK ailesi üyelerinin oluşturduğu sinyal ileti ağı, ökaryotik hücre regülasyonunda görev alan en geniş mekanizmalar arasında yer almaktadır (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999). Bütün ökaryotik hücrelerde birbirinden ayrı kümeler oluşturan sinyal gruplarına cevap oluşturabilmek amacıyla özelleşmiş birden fazla sayıda MAPK sinyal yolağı bulunmaktadır. Böylelikle hücreler aynı anda farklı kümelerden gelen sinyallere karşı uygun hücresel cevabı oluşturabilmektedir (Schenk and Snaar-Jagalska, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001).

MAPK yolağı, farklı sinyal molekülleri aracılığıyla uyarılan serin-tirozin kinaz, sitokin ve GPCR gibi hücre yüzey reseptörleri tarafından aktive olmaktadır (Robinson and Cobb, 1997; Schenk and Snaar-Jagalska, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Pearson et al., 2001). Bu sinyal molekülleri arasında ise hormonlar, büyüme ve farklılaşma faktörleri (insülin, EGF, PDGF, FGF / ANG II, endotelin, TNF gibi), viral enfeksiyonlar, kanser yapıcılar ve çevresel stresler yer almaktadır (Kyriakis and Avruch, 2001; Johnson and Lapadat, 2002). Bununla birlikte MAPK'lar; mayoz, mitoz ve farklılaşmış hücrelerde oluşan mitoz sonrası fonksiyonlara da katılmakta ve hareket, metabolizma, programlı hücre ölümü gibi hücresel aktiviteleri düzenlemektedirler (Pearson, Robinson et al., 2001).

MAPK sinyal ağları evrimsel olarak korunmuş ardışık bir şekilde aktive edilen üç bileşenden meydana gelmektedir. Tüm MAPK yolaklarının merkezinde üç grup enzim (MAPKKK, MAPKK, MAPK) bulunmaktadır ve MAPKKK→



MAPKK→ MAPK sıralamasıyla birbirlerini fosforillemekte (Johnson and Lapadat, 2002; Bardwell, 2006; Pearson, et al., 2001, Kroemer et al., 2007). Bu modülün en üstünde bulunan MAPKKK üyelerinin N-terminal kısımlarında düzenleyici alanlar bulunurken C-terminal kısmında protein kinaz alanı bulunmaktadır. Genellikle STE20/PAK kinazlar tarafından fosforillenerek ya da küçük GTP-bağlayıcı proteinler ile (Ras ve Rho ailesi üyeleri gibi) etkileşime girerek aktive edilmektedirler. (Gustin et al., 1998; Gutkind 2000) . Ser/Thr kinaz olan MAPKKK'lar aktive edildiklerinde modüldeki ikinci grup kinazları (MAPKK) Ser ve Thr aminoasitlerinden fosforilleyerek aktive etmektedirler (Gustin et al. 1998; Widmann et al., 1999).

Bir organizmada MAPK modülünü oluşturan üç bileşen içinde MAPKKK'ların sayısı MAPK'ların sayısına eşit ya da daha fazla olmaktadır (Widmann et al., 1999). MAPKKK'ların genellikle sayıca daha fazla olmasının olası sebebi ise; organizmanın/hücresinin karşılaştığı yüksek çeşitlilikteki sinyal sayısındaki fazlalığa karşı seçici bir cevap oluşturulabilmesine olanak tanınmasıdır. Bu yolla sinyaller ayırt edilebilmekte ve uygun cevap eş zamanlı olarak oluşturulabilmektedir. Bir diğer olasılık da MAPKKK'ların substratlarının sadece MAPKK'lar ile sınırlı olmamasıdır. Bir MAPKKK olan MEKK1'in hem MAPK-JNK yolağını hem de NFκB yolağını düzenlemesi bu duruma örnek olarak verilebilir (Widmann et al., 1999; Chang and Karin, 2001; Orth and Tabrizi, 2003; Kyriakis and Avruch 2001). MAPKKK'lar tüm MAPK modülü içinde "sinyal toplayıcı – dağıtıcı" tek birimdir (Powell et al., 2005). MAPKKK'lar tarafından fosforillenen MAPKK'lar substratları olan MAPK'lerin aktivasyon lollarında bulunan hem Thr hem de Tyr'ni fosforile edebilme özelliklerinden ötürü çifte spesifiteli kinazlar olarak bilinmektedirler (Zheng and Guan 1993; Powell et al., 2005). Sinyal modülünün merkezinde yer alan MAPKK'lar, MAPKKK'lar kadar yüksek sinyal özgünlüğüne sahip değildirler, dolayısıyla da sadece sinyal toplayıcı noktalar olarak görev yapmaktadır ve genellikle sayıca MAPKKK ve MAPK'lardan daha az bulunmaktadırlar MAPK'ler ise ağ içinde yukarıdan aşağıya doğru toplanan sinyalleri uygun efektörlere iletmekle görevli sinyal dağıtıcılardır (Widmann et al., 1999; Powell et al., 2005). MAPKK'lar tarafından fosforillenerek aktive edilen MAPK ailesi üyeleri aktivasyon lollarında TxY motifi taşımaları ile diğer üyelerden ayrılırlar.

Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) ailesi sinyal yollarında yer alan c-Jun terminal kinaz, P38 MAPK, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2), serin/treonin kinaz ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolları da oksidatif stres aracılıklı nöronal hücre hasarında benzer rollere sahip olan moleküler mekanizmalardır (Schroeter et al., 2002.; Fuenzalida, et al. 2007).

## 2.5 GSK3- $\beta$ Sinyal yolu

Hücre büyümesi, farklılaşması ve sağkalımı gibi mekanizmalar içinde yer aldığı bilinen fosfoinozidit 3-kinaz (PI3K) gen ailesi, yapı ve fonksiyon farklılıklarına göre 3 sınıfa ayrılmakla beraber bunlardan ancak 1. Sınıf PI3K'nın rolü önemli oranda aydınlatılabilmektedir (Rameh and Cantley, 1999).

1. Sınıf PI3K molekülleri bir katalitik alt ünite (p110) ile onun kinaz aktivitesini düzenleyen bir düzenleyici alt üniteden (p85) meydana gelen sitoplazmik heterodimer komplekslerdir (Garcia et al., 2006).

PI3K molekülleri lipid kinaz ailesine aittir ve PI (4,5)P2 fosfoinositidlerin (PIP2) 3' OH grubunu fosforlayarak onları fosfatidilinositol (3,4,5)P3 (PIP3) dönüştürürler (Whitman et al., 1988). PI3K'nın lipid kinaz aktivitesi dışında protein kinaz aktivitesi de vardır en iyi bilinen substratı AKT'dır (Chan et al., 1999). PI3K'nın sitoplazmik substratlarının aktivasyonu genel olarak bir serin treonin kinaz olan PDK1 aracılığıyla olmaktadır (Anderson et al., 1998). PDK1, PI3K aktivasyonu sonucu oluşan PIP3'e bağlanmak üzere membrana geçerek orada fosforlanır ve aktive olur (Casamayor et al., 1999).

AKT, AGC ailesine ait bir serin/treonin protein kinazdır (Peterson and Schreiber 1999). Memelilerde birbirine oldukça benzer yapıda 3 farklı AKT izoformu vardır (Brodbeck et al., 1999; Jones et al., 1991). Hepsi de ortak olarak NH<sub>2</sub> ucunda bir PH alanı, ortada oldukça büyük bir kinaz alanı ve COOH ucunda da bir düzenleyici alandan meydana gelmektedir. PI3K'nın oluşturduğu PIP3, AKT'nın PH domeni için bir bağlanma bölgesi oluşturur ve AKT bunlara bağlanmak üzere membrana hareket ederek buraya yerleşir (Frech et al., 1997).

AKT membrana yerleştikten sonra buraya daha önceden yerleşmiş ve aktive olmuş olan PDK1 tarafından 308. Treonin aminoasidi üzerinden fosforlanarak ilk aktivasyonu sağlanır (Alessi et al., 1997).

AKT'ın bu ilk fosforilasyonu onun mTORc2 veya DNA-PK tarafından serin 473 fosforilasyonunun sağlanmasını kolaylaştırır (Feng et al. 2004; Sarbassov et al. 2005). AKT'ın ve AKT dışındaki kinazların, hücre döngüsü kontrolündeki temel rolü GSK3 $\beta$  aracılığıyla olmaktadır.

GSK-3; beyinde hem nöron hem de glialarda olmak üzere her ikisinde de bol miktarda bulunur. (Ferrer, Barrachina et al., 2002)

Memelilerde GSK-3, birbirine yüksek homoloji gösteren GSK3 $\beta$  ve GSK3 $\alpha$  olmak üzere iki adet forma sahiptir (Leroy and Brion 1999). Her iki kinaz da benzer substrat özelliklere, transkripsiyon faktör regülasyonuna, enzim ve yapısal protein regülasyonuna sahiptir (Frame and Cohen, 2001). Diğer klasik protein kinazların aksine GSK-3 dinlenme koşulları altında esnasındaki inaktivasyonu aracılığıyla regüle edilir.

GSK3 $\beta$  vücutta pek çok eksprese edilen ve inhibitör sinyal olmadığı sürece sürekli aktif olan bir serin/treonin kinazdır (Harwood, 2001). Hücre metabolizmasında GSK3 $\beta$ 'nin hücre döngüsü, protein yıkımı ve enerji metabolizması gibi pek çok hücrel faaliyetle beraber (Rayasam et al., 2009), kanser, diyabet, inflamasyon ve nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (Luo et al., 2007). GSK3 $\beta$  aktivitesinin düzenlenmesi her ne kadar tam olarak anlaşılammışsa bile fosforilasyon, lokalizasyon ve GSK3 $\beta$  bağlayan proteinlerle etkileşim temelli olarak üç ana düzenleyici mekanizmanın varlığı gösterilmiştir (Jope and Johnson, 2004). Bu mekanizmalar arasında GSK3 $\beta$ 'nin fosforilasyon bağımlı aktivasyon-inaktivasyonu en iyi anlaşılmiş olanıdır. GSK3 $\beta$  üzerindeki 216. Tirozin aminoasidinin fosforilasyonu molekülün aktivasyonuna, 9. Serin aminoasidinin fosforilasyonu ise inhibisyonuna neden olmaktadır (Hughes et al., 1993; Stambolic and Woodgett 1994; Wang et al., 1994).

GSK3 $\beta$ , hücre sağkalımının düzenlenmesinde, mikrotübül dinamiklerinin modülasyonunda ve glikojen metabolizmasında önemli rol oynayan bir kinazdır. (Kaytor and Orr, 2002). Son zamanlarda oksidatif stres, hiperosmotik stres, ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi hücrel streslerin GSK3 $\beta$ 'nın aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (Meier, Thelen et al. 1998; Kaytor and Orr, 2002; Song, De Sarno et al. 2002). Diğer bir çalışmada ER stresinin GSK3 $\beta$ 'yı Ser9 üzerinden defosforile ederek aktive edebileceği gösterilmiştir (Song, De Sarno et al. 2002).

6-OHDA'nin, ER stresini tetikleyerek GSK3 $\beta$  fosforilasyonunu regüle ettiği belirtilmiştir. 6-OHDA aracılıklı olan GSK3 $\beta$ 'nin bu aktivitesi Serin 9 (Ser9) fosforilasyonu üzerinden negatif olarak, Tirozin 216 (Tyr216) fosforilasyonu üzerinden ise pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Grimes and Jope, 2001). Ayrıca; Akt/protein kinaz B (PKB), protein kinaz C (PKC), p70 S6 kinaz, p90Rsk ve protein kinaz A (PKA) gibi çeşitli kinazların da GSK3 $\beta$ 'yı Serin 9 üzerinden fosforile ettiği bilinmektedir (Grimes and Jope, 2001; Kaytor and Orr, 2002).

## 2.6 P90RSK Sinyal yolu

ERK substratları arasında bulunan 90 kDa p90 ribozomal kinazlar ailesi içinde (RSK; p90RSK ya da mitojen aracılıklı aktive olan protein kinaz-1, MAPKAP-K1) gibi üyeler yer almaktadır (Jones et al., 1988; Sturgill et al., 1988; Alcorta et al., 1989; Zhao et al., 1995).

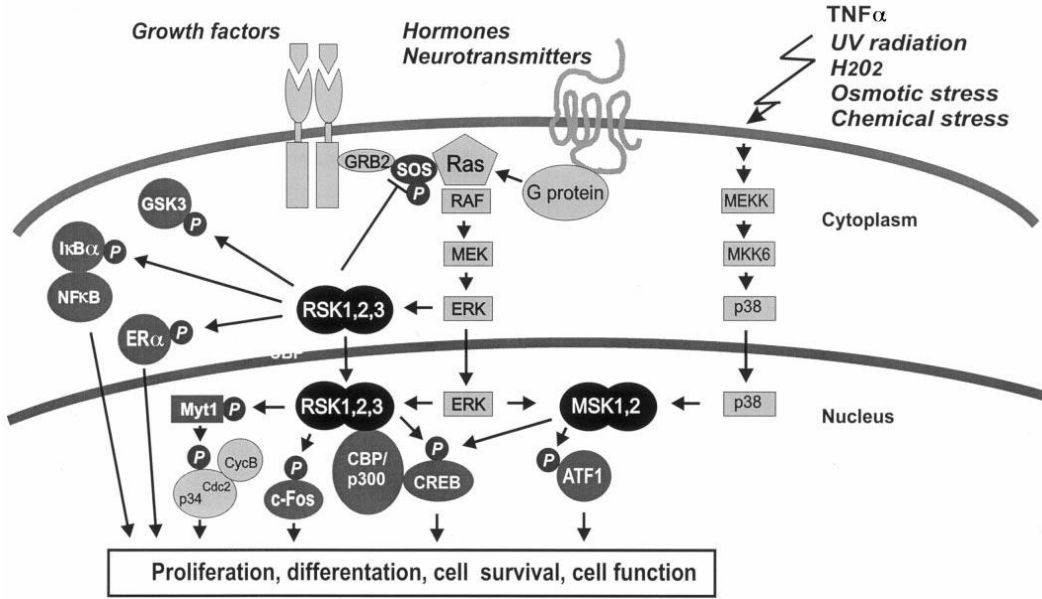
RSK, 1985 yılında Erikson ve Maller tarafından *Xenopus laevis* oositlerinde 40S ribozomal proteinin S6 alt ünitesini fosforilleyen bir hücre içi kinaz olarak keşfedilmiştir (Erikson and Maller 1985; Erikson, 1991; Blenis, 1993). S6 fosforilasyonunun ise, hücre büyümesi için seçilmiş mRNA translasyon mekanizmasının düzenlenmesini teşvik ettiği düşünülmektedir (Jefferies et al., 1997). Moleküler ağırlığı 90kDa olan iki adet S6 protein kinaz (S6KI ve S6KII) tanımlanmıştır (Jones et al., 1988). S6KI ve S6KII homologları (yeni isimleriyle p90rsk veya RSK) sırasıyla fare, tavuk, sıçan, *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*'dan klonlanmıştır (Alcorta et al., 1989; Grove et al.,

1993; Wassarman et al., 1994). İnsanlarda RSK kinaz ailesi; RSK1, RSK2 ve RSK3 olmak üzere 3 adet izoforma sahiptir, bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanır ve % 75-80 amino asit benzerliği göstermektedir (Jones et al., 1988; Moller et al., 1994; Zhao et al., 1995). Genel olarak dağılmış halde bulunmalarına rağmen bu üç RSK ailesi üyelerinin organizmada farklı fonksiyonlarda çeşitli proteinlerin ekspresyon seviyelerinin regülasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir.

RSK, serin-treonin kinazlar arasında tek olup C- terminal ve N- terminal olmak üzere iki adet fonksiyonel kinaz alanına sahiptir. N-terminal kinaz, protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz A (PKA)'yı kapsayan kinazların AGC grubuna sahiptir. N-terminal kinaz, RSK'nın substratlarını fosforilemekle sorumludur ve tanıdığı konsensüs bazofilik motifleri ise Arg:Lys-X-Arg-X-X-Ser:Thr ya da Arg-Arg-X-Ser:Thr dizileri olarak belirlenmiştir (Leighton et al., 1995). C-terminal kinaz ise, kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz grubuna aittir ve ERK ve p38 MAPK'ın substratları olan MNK1 ve MAPKAP-kinaz-2 ile yüksek benzerlik göstermektedir (Zhao et al. 1995; Smith et al. 1999). N-terminal kinaz RSK'nın substratlarını fosforillerken, C- terminal kinaz ise RSK aktivasyon mekanizmaları ile ilişkilidir.

RSK izoformları, Rask-ERK sinyal yolağını uyaran peptit hormonları ve nörotransmitterlerin yanı sıra büyüme faktörleri ve sitokinler gibi tüm hücre dışı sinyal molekülleri tarafından aktive edilmektedir. RSK substratları ise cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB), östrojen reseptör- $\alpha$  (ER $\alpha$ ), I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B ve c-Fos benzeri transkripsiyon faktörlerini içermektedir (Xing et al., 1996; Ghoda et al., 1997; Schouten et al., 1997; Joel et al., 1998). (Şekil 2.7) Bununla birlikte RSK, transkripsiyonel koaktivatör proteinleri CREB-bağlayıcı protein (CBP) ve p300 ile de ilişkilidir (Nakajima et al., 1996). RSK, poliribozomlara bağlanır ve ribozomal kompleksteki birçok proteini fosforilemektedir (Angenstein et al., 1998). Ayrıca RSK'nın; nöral hücre adhezyon molekülü (L1 CAM), Ras GTP:GDP-değişim faktörü, Sos ve p34cdc2-inhibitör kinaz (Myt1) ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'ü fosforillediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sutherland et al., 1993; Wong et al., 1996; Douville and Downward, 1997;

Palmer et al., 1998). RSK substratlarının çok çeşitli olması, RSK'nın hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.7 RSK ve MSK kinazlarının sinyal iletimindeki rolü.

Yapılan çalışmalar ile RSK-B ile mitojen ve stres tarafından aktive edilen protein kinazın (MSK) RSK-ilişkili kinaz ailesine ait üyeler olduğu belirlenmiştir. (Deak, et al. 1998; Pierrat et al., 1998; New et al., 1999). MSK, ERK'in substratıdır ancak p38 MAPK tarafından da ayrıca fosforillenebilmektedir, bu nedenle TNF- $\alpha$  ve hücrel stres tarafından uyarılabilmektedir (Şekil 2.7). MSK; CREB, ATF-1 ve AP-1 aracılı transkripsiyonu da regüle edebilmektedir.

Enflamasyon sürecinde ve adaptif immunitede anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı oldukça duyarlıdır (Kaltschmidt et al., 2005; Mattson, 2005). Birçok nörodejeneratif hastalıkta oksidatif strese karşı NF- $\kappa$ B aktivasyonu gözlenmektedir. Yapılan iki çalışmada ise RSK1'in NF- $\kappa$ B aktivasyonunu uyarabileceği gösterilmiştir (Ghoda et al., 1997; Schouten et al., 1997). Geçtiğimiz on yılda Parkinson hastalıklı bireylerdeki dopaminerjik nöronlarda arttığı rapor edilen NF- $\kappa$ B, 6-OHDA aracılıklı dopaminerjik nöron hücrelerinin ölümünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, NF- $\kappa$ B nörolojik hasarlara karşı temel terapatik

yaklaşımların geliştirilmesinde önemli bir hedef molekül haline gelmiştir (Mattson, 2005).

## **2.7 Amaç**

Bu yüksek lisans tezinde, 6-OHDA ile oluşturulmuş *in vitro* Parkinson modelinde GSK-3 beta ile GSK-3 beta düzenleyicileri olan p90RSK ve p38 sinyal yollarının dopaminerjik hücre ölüm mekanizmalarındaki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA ile oluşturulan *in vitro* Parkinson modeli kullanılmış ve p38, p90RSK ve GSK-3 beta inhibitörlerinin uygulanmasından sonra dopaminerjik nöronların hücre sağkalımı değerlendirilmiştir.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1 Kollajen ile kaplama

Hücre kültüründe kullanılmak üzere plakalar kollajen ile kaplandı. Kollajen (Rat tail collagen Roche), % 20 asetik asit varlığında son konsantrasyonu 2 mg/ml olarak çözüldü. Ana stoktan dilüsyon yapılarak (50mg/ml) hücre kültüründe kullanılacak olan plakaların toplam hacimlerine göre; cm<sup>2</sup> başına 5 ug olacak şekilde hesaplaması yapılarak kaplama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra plakalar 24 saat boyunca laminar akışlı kabin altında bekletilerek kaplama işlemi tamamlandı.

#### 3.2 Hücre Kültürü

SH-SY5Y hücre hattı ATCC (CRL-2226) dan temin edildi. SH-SY5Y hücre hattı için vasat; DMEM/F12 1:1, %10 oranında inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum (FBS), %1 oranında L-Glutamin ve %1 oranında Penisilin + Streptomisin içerecek şekilde hazırlandı. Vasat ortamı hazırlandıktan sonra SH-SY5Y hücrelerinin ortamı 2 günde bir değiştirildi. Işık mikroskobu analizleri sonucu hücrelerin yoğunluğu toplam plaka alanının tamamına yakın olarak bir artış gösterdiğinde pasaj işlemi gerçekleştirildi. *In vitro* kültürlerde değerli hücre hatlarının korunabilmesi, pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişimlerin önlenmesi ve ayrıca bu çalışmalar sırasında güvenli geriye dönebilme olasılığı nedeniyle hücre hatlarının kısa veya uzun süreli stoklanması gerekmektedir. Bu nedenle hücreler % 10 DMSO ile -196 sıvı azot içerisinde yedeklendi. Böylelikle SH-SY5Y hücre hattının sağlıklı bir şekilde *in vitro* devamlılığı sağlandı.

#### 3.3 Farklılaştırma

Hücreler diferansiyasyon amacıyla, 10µM retinoik asit ve % 2 FBS içeren hücre ortamı ile 6 gün süresince muamele edildi. Hücrelerin 2 günde bir ortamları değiştirildi. Işık mikroskobu analizleri sonucunda SH-SY5Y hücre hattının optimum farklılaşma aralığının 3-6 gün olduğu gösterildi (Lopes, Schroder et al.



2010). Diferansiye edilmiş hücre hattına, belirli dozlarda (20-100  $\mu$ M) %0.1 askorbik asit içeren 6-OHDA (Sigma H116) uygulaması yapıldı. Sonuçların tayini için WST-1 test kiti (Cell Proliferation Kit II/Roche) kullanıldı. SH-SY5Y hücre hattında böylelikle *in vitro* Parkinson modeli oluşturularak uygulanacak en ideal 6-OHDA doz aralığı kontrol grubu hücrelerine kıyasla belirlendi.

Oluşturulan *in vitro* Parkinson modelinde GSK3 $\beta$ , p-38 ve p90RSK inhibitörleri kullanılarak bu yolakların Parkinson hastalığında görülen dopaminerjik hücre ölümündeki rolleri araştırıldı.

Yukarıda söz edilen amaçla deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

Grup 1 : Diferansiye edilmeyen SH-SY5Y hücre hattı

Grup 2 : Retinoik asit varlığında diferansiye edilen SH-SY5Y hücre hattı

Grup 3 : Diferansiye edilmiş ve 6-OHDA uygulaması yapılan SH-SY5Y hücre hattı (*in vitro* Parkinson Modeli)

Grup 4 : *In vitro* Parkinson modelinde GSK3 $\beta$  inhibitör (Lithium Carbonate) uygulaması yapılan hücre hattı

Grup 5: *In vitro* Parkinson modelinde p90RSK inhibitör (RSK Inhibitor II BID-1820) uygulaması yapılan hücre hattı

Grup 6: *In vitro* Parkinson modelinde p-38 inhibitör ( SB203508) uygulaması yapılan hücre hattı

### **3.4 *In vitro* Parkinson Modeli Oluşturulması**

Bu modeli oluşturmak için çalışmada toksik ajan olarak 6-OHDA (Sigma H116) kullanıldı. 6-OHDA ana stok konsantrasyonu 20 mM olacak ve %0.1 askorbik asit içerecek şekilde dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Optimum doz aralığını belirlemek için diferansiye edilmiş hücre hattında, 24 saat süresince 6-OHDA'nın farklı konsantrasyonları (20-100 $\mu$ M) denendi. Sonuçları analiz etmek için WST-1

sitotoksite testi uygulandı. Verilerin istatistiksel analizini değerlendirmek için SPSS paket programı 16 nolu sürümü kullanıldı. Daha sonra tüm değerler, kontrolün %'si olarak ifade edildi.

### **3.5 WST-1 Sitotoksisite Testi**

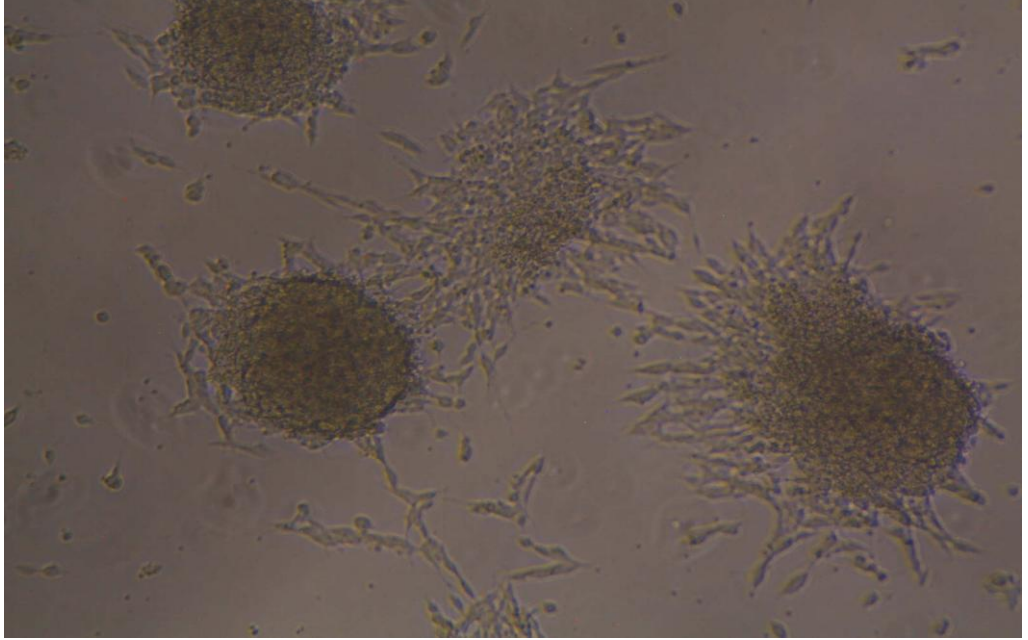
WST-1 testi hücrel proliferasyonu değerlendiren renk değişimine dayalı (kolorimetrik) standart bir testtir. Çalışma prensibi WST-1 solüsyonunda bulunan tetrazolyum halkasının, canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturması esasına dayanır (Jost, Kirkwood et al. 1992).

Hücre canlılık testi WST-1 kiti (Cell Proliferation Kit II/Roche) protokolüne uygun olarak yapıldı. WST-1 analizinde, uygun sayıda 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilen hücreler, planlanan deney setlerine göre madde uygulaması yapıldıktan sonra, bu hücreler üzerine her 100 µl için 10µl WST-1 solüsyonu eklenerek ve her yarım saat sonrasında oluşan renkli formazan kristallerinin miktarı 450 nm dalga boyunda okutma yapılarak, kitte önerilen '450nm-650nm-kör' formülüne uygun olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçların yüzde kontrolden farkları T-testi ile analiz edildi.

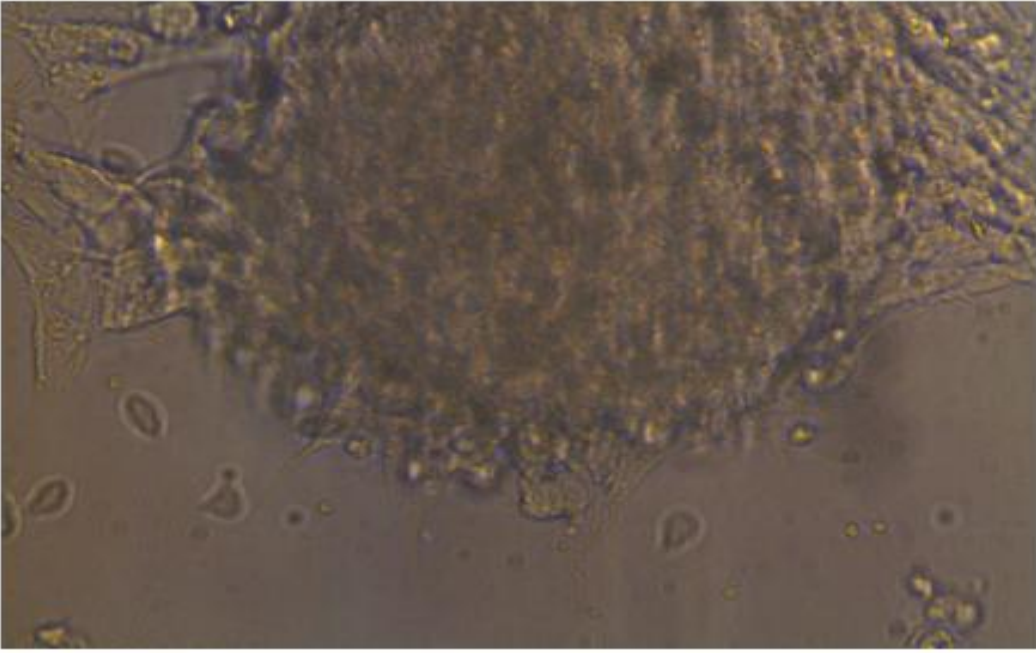
## 4 SONUÇLAR

### 4.1 Diferansiye Edilen Hücre Hattı

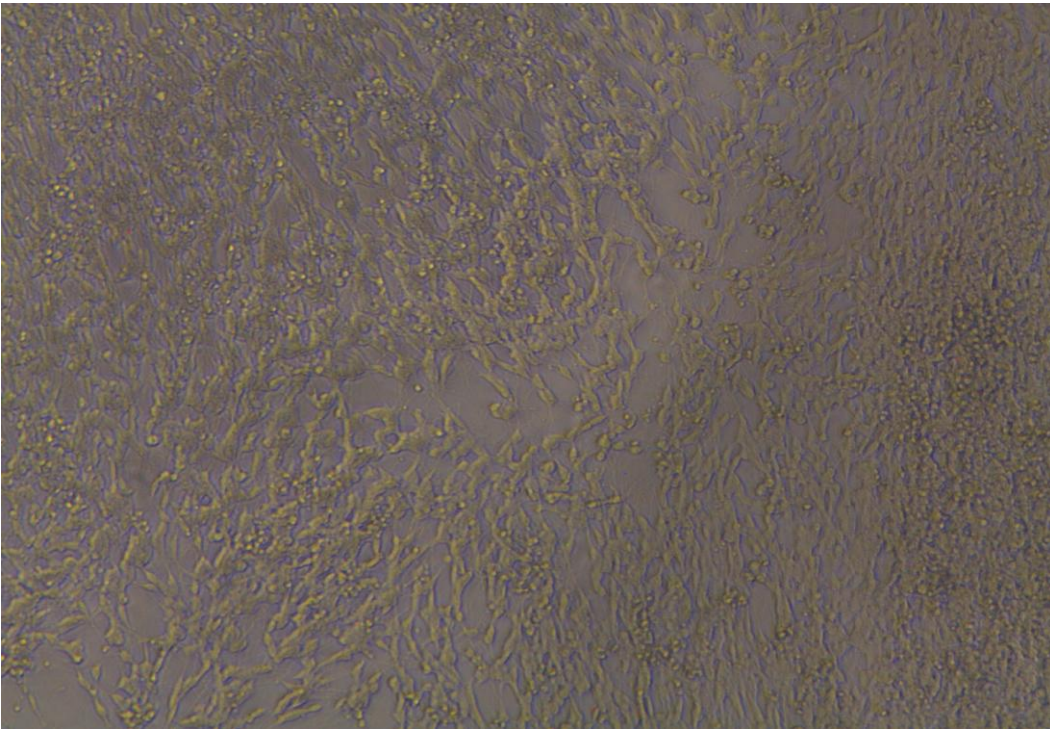
SH-SY5Y hücreleri, literatür taramasından yola çıkılarak düşük serumda hazırlanan (% 2 FBS ve 10 $\mu$ M retinoik asit içeren) hücre ortamı ile bir hafta boyunca muamele edildi. Hücrelerin iki günde bir ortamları değiştirilerek, ışık mikroskobu analizleri sonucunda SH-SY5Y hücre hattının en ideal farklılaşma düzeyinin üçüncü günden itibaren başladığı tespit edildi. Diferansiye edilmemiş hücre hattı (Şekil 4.1.A ve 4.1.B) ile ideal şartlarda diferansiyasyonun görüldüğü hücre hattı (Şekil 4.1.C ve 4.1.D) aşağıdaki resimlerde görülmektedir.



Şekil 4.1.A Diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücreleri 10 x

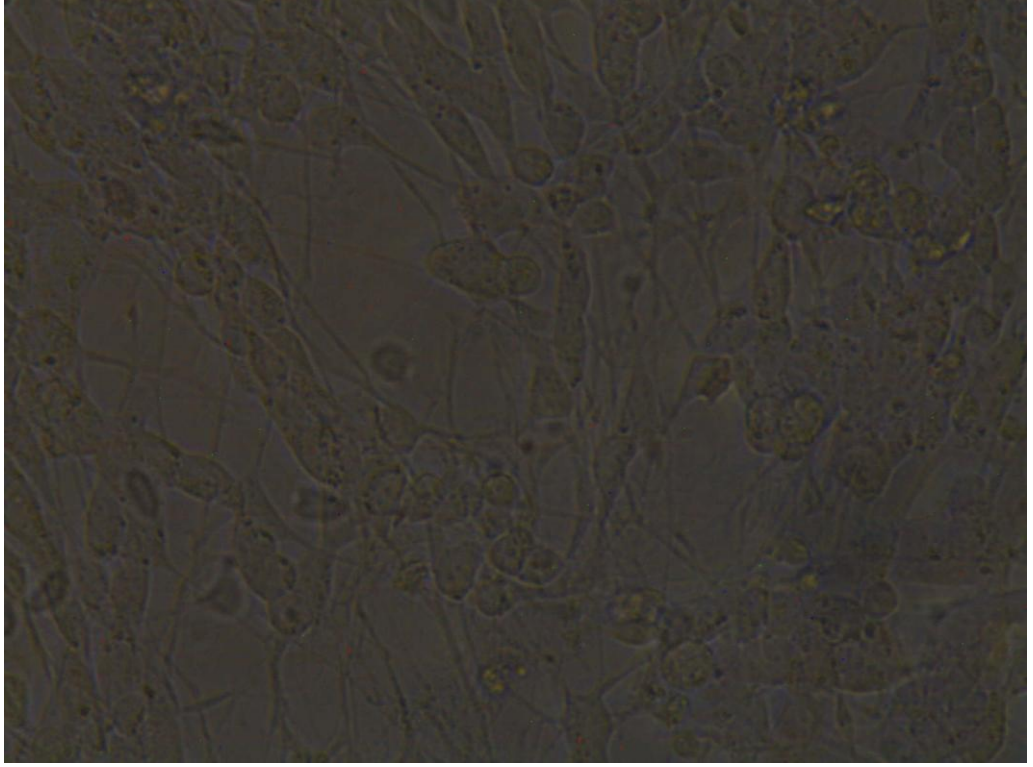


**Şekil 4.1 B** Diferansiye edilmemiş SH-SY5Y hücreleri 40 x



**Şekil 4.1 C** Diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücreleri

% 2 FBS ve 10 $\mu$ M retinoik asit uygulaması ile diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücreleri (10 x).

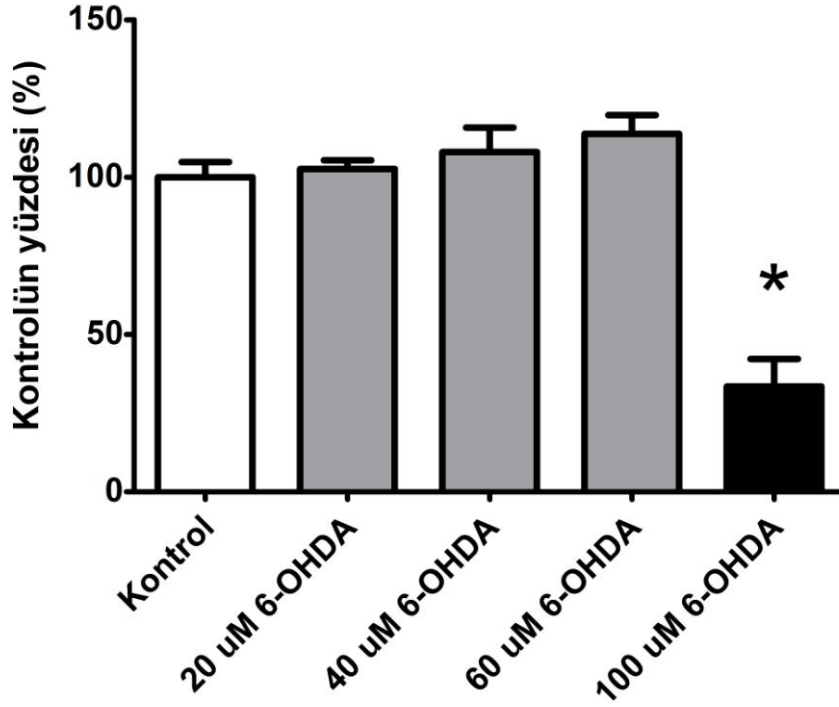


**Şekil 4.1 D** Diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücreleri

% 2 FBS ve 10µM retinoik asit uygulaması ile diferansiye edilmiş SH-SY5Y hücreleri (40 x).

#### **4.2 6-OHDA Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi**

Planlanan *in vitro* Parkinson modelini oluşturmak üzere öncelikle nöroblastoma hücreleri 96 kuyu içeren plakalara, her kuyuda  $1,5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreleri farklılaştırma uygulamasına başlandı. 72 saat sonunda hücreler, 24 saat süre boyunca 6-OHDA'nın farklı dozlarına (20-100µM) maruz bırakılarak WST-1 testi aracılığıyla değerlendirildi. Modelin çalıştığı en ideal konsantrasyon aralığı kontrol grubuna kıyasla 100 µM 6-OHDA olarak belirlendi ve yapılan T-testi sonucunda istatistiksel olarak da anlamlı olduğu gösterildi (Şekil 4-2).



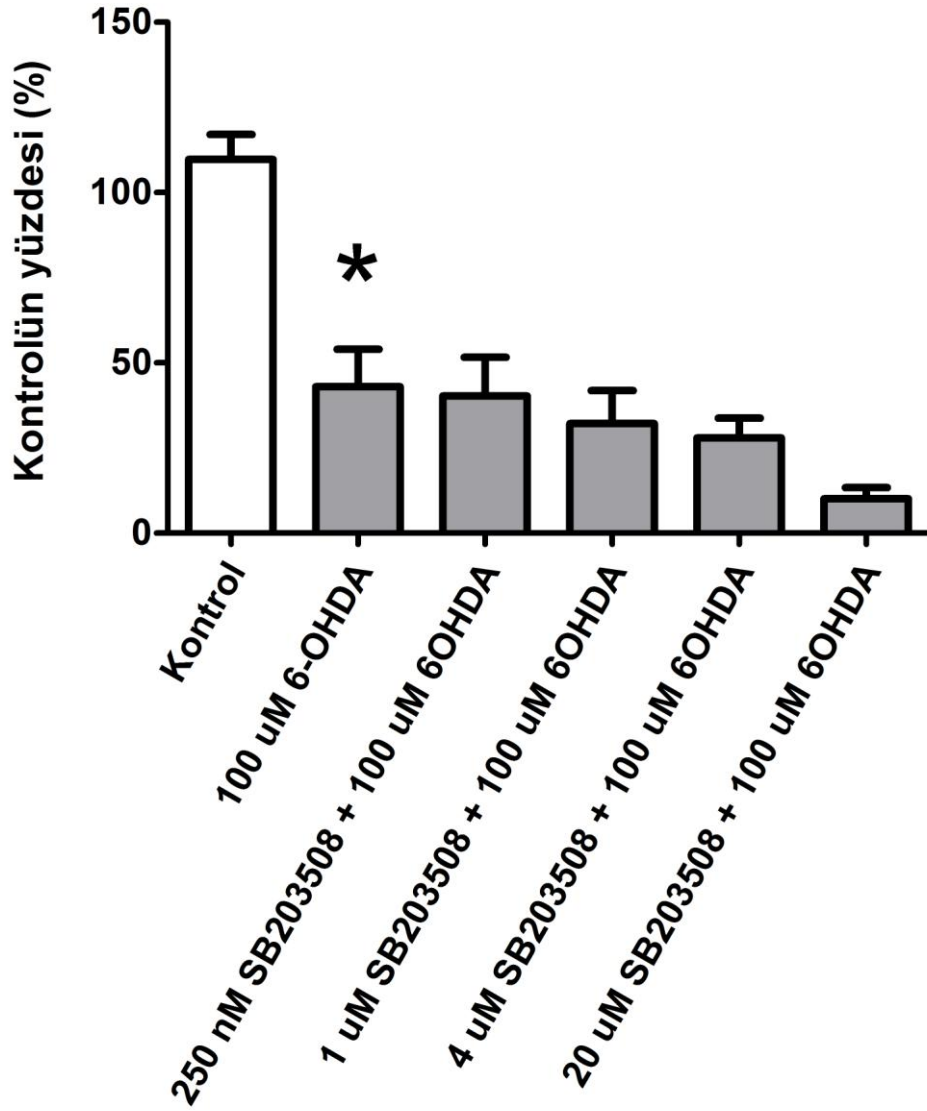
Şekil 4.2 6-OHDA uygulaması WST-1 sonuçları

72 saat süreyle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında farklı dozlarda 6-OHDA uygulaması WST-1 sonuçları (\* M=33.4 , SD=29.1 t(31)=7.2 p<0,0001)

### 4.3 p38 Sinyal Yolağı İlişkisi

SH-SY5Y hücreleri, 96 kuyu içeren plakalara sayıca  $1,5 \times 10^4$  olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreleri farklılaştırabilmek için daha önce anlatıldığı şekilde retinoik asit uygulandı. Uygulamanın 72. saatinde hücreler, iki saat boyunca farklı doz aralıklarında (0,25µM- 20µM) p-38 inhibitörüne (Sigma-SB203508) maruz bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelere 24 saat süresince, daha önce etkili olduğu tesbit edilen dozda (100 µM) 6-OHDA uygulaması yapılarak WST-1 testi aracılığıyla sonuçlar belirlendi. Daha sonra tüm veriler, kontrolün yüzdesi olarak değerlendirildi. Yapılan analiz sonucunda, 6-OHDA uygulamasının kullandığımız modele uygun olarak hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğu ancak, p38 sinyal yolağının SB203508 ile inhibisyonun 6-OHDA ile ortaya çıkan bu azalmanın önüne geçemediği değerlendirildi (Şekil 4.3). Bu nedenle 6-OHDA toksisitesi ile meydana gelen hücre ölümünde p-38 yolağının önemli derecede etkili olmadığı sonucuna varıldı.





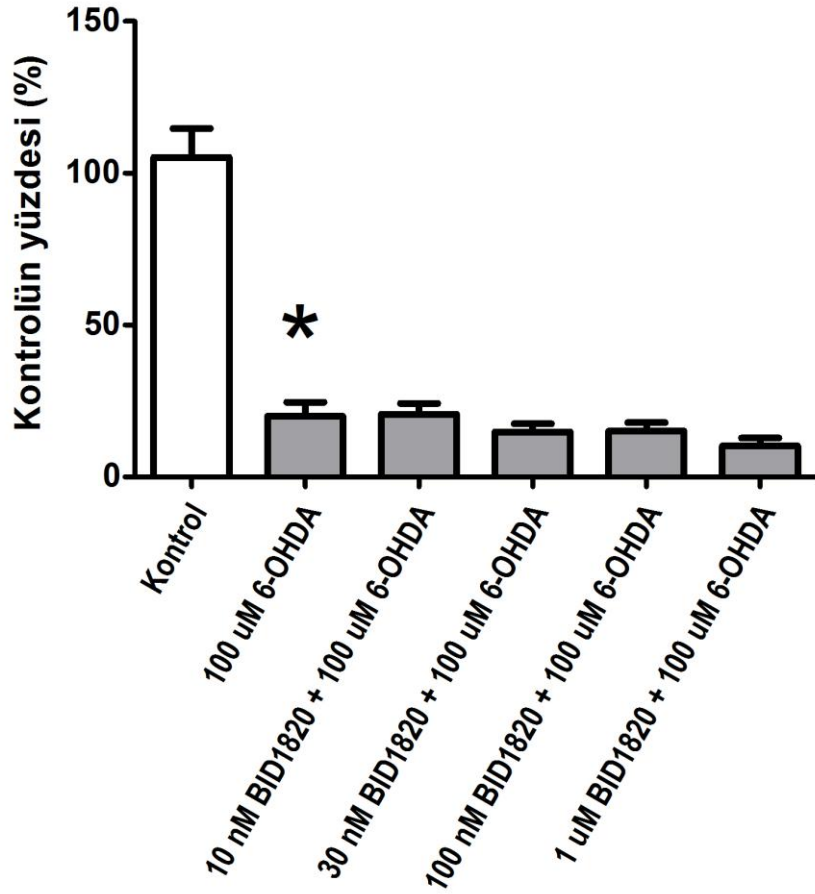
Şekil 4.3 p38 inhibitör uygulamasının hücre sağkalımına etkisi.

72 saat süreyle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında, SB203508 ve SB203508 + 100uM 6-OHDA uygulaması WST-1 sonuçları (\* M=43.1 , SD=31.0 t(14)=5.065 p<0,0001)

#### 4.4 p90RSK Sinyal Yolağı İlişkisi

SH-SY5Y hücreleri, 96 kuyu içeren plakalara sayıca  $1,5 \times 10^4$  olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreleri farklılaştırabilmek için daha önce anlatıldığı şekilde retinoik asit uygulandı. Uygulamanın 72. saatinde hücreler, iki saat boyunca farklı doz aralıklarında (10nm-30nm-100nm ve 1uM) p90RSK inhibitörüne (Sigma-BID-1820) maruz bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelere 24 saat süresince, daha

önce etkili olduğu tesbit edilen dozda (100  $\mu$ M) 6-OHDA uygulaması yapılarak WST-1 testi aracılığıyla sonuçlar belirlendi. Daha sonra tüm veriler, kontrolün yüzdesi olarak değerlendirildi. Yapılan analiz sonucunda, 6-OHDA uygulamasının kullandığımız modele uygun olarak hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğu ancak, p90RSK sinyal yolağının BID-1820 ile inhibisyonun 6-OHDA ile ortaya çıkan bu azalmanın önüne geçemediği değerlendirildi (Şekil 4.4). Bu nedenle 6-OHDA toksisitesi ile meydana gelen hücre ölümünde p90RSK yolağının önemli derecede etkili olmadığı sonucuna varıldı.



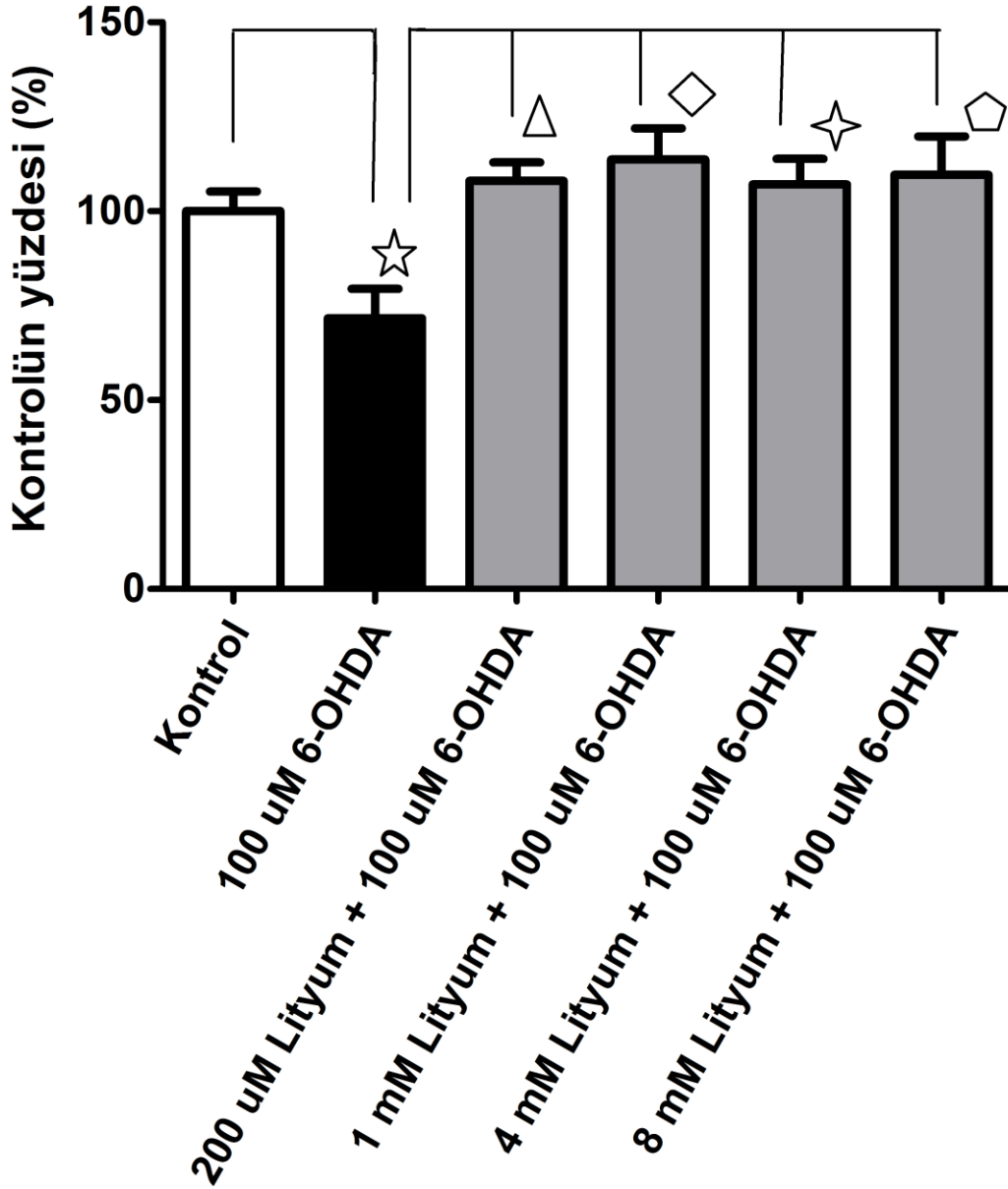
Şekil 4.4 p90RSK inhibitör uygulamasının hücre sağkalımına etkisi.



72 saat süreyle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında, farklı dozlarda BID-18820 ve BID-18820+100uM 6-OHDA uygulaması WST-1 sonuçları (\* M=19.9 , SD=12.9 t(13)=8.417 p<0,0001)

#### **4.5 GSK-3 beta Sinyal yolağı ilişkisi**

Nöroblastoma hücreleri, 96 kuyu içeren plakalara sayıca  $1,5 \times 10^4$  olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreleri farklılaştırabilmek için daha önce anlatıldığı şekilde retinoik asit uygulandı. Uygulamanın 72. saatinde hücreler, iki saat boyunca farklı doz aralıklarında (0.2mM - 8mM) GSK-3 beta inhibitörüne (Lityum) maruz bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelere 24 saat süresince, daha önce etkili olduğu tesbit edilen dozda (100  $\mu$ M) 6-OHDA uygulaması yapılarak WST-1 testi aracılığıyla sonuçlar belirlendi. Daha sonra tüm veriler, kontrolün yüzdesi olarak değerlendirildi. Yapılan analiz sonucunda, 6-OHDA uygulamasının kullandığımız modele uygun olarak hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğu ancak, p90RSK sinyal yolağının lityum ile inhibisyonun 6-OHDA ile ortaya çıkan bu azalmanın önüne geçemediği değerlendirildi (Şekil 4.5). Ayrıca, GSK-3 beta sinyal yolağının farklı dozlardaki lityum ile inhibisyonun, kontrol grubu ile kıyaslandığında 6-OHDA ile ortaya çıkan azalmanın önüne geçtiği değerlendirildi. Bu nedenle 6-OHDA toksisitesi ile meydana gelen hücre ölümünde GSK-3 beta sinyal yolağının önemli derecede etkili olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 4.5 GSK-3 beta inhibitör uygulamasının hücre sağkalımına etkisi.

72 saat süreyle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında, farklı dozlarda Lityum ve Lityum+100uM 6-OHDA uygulaması WST-1 sonuçları (\* M=71.6SD=19.25 t(10)=3.017 p=0,013), (Δ M=108.0 SD=12.0 t(10)=-3.927 p<0,01), (◇ M=113.6 SD=20.3 t(10)=-3.680 p<0,01), (☆ M=107,11SD=16.5 t(10)=-3.427 p<0,01), (◊ M=109.6 SD=24.7 t(10)=-2.969 p=0,014)

## 5. TARTIŞMA

Parkinson hastalığının etiyojisi henüz tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen *in vitro* deney setlerinde Parkinson modeli oluşturularak, epidemiyolojik çalışmalar ve genetik analizler yapılabilmektedir. Bu çalışmalar Parkinson hastalığının patogenezinin anlaşılmasında önemli bir bakış açısı sağlamaktadır (Dawson and Dawson, 2003). Yaygın olarak primer sıçan orta beyin hücre kültürü, Parkinson hastalığında biyokimyasal çalışmalar için kullanılmaktadır. Bu hücrelerin kökeni insan kaynaklı hücre kültürlerine ait değildir. Dolayısıyla bu hücreler, Parkinson modeli oluşturmak üzere potansiyel farklılaşma nitelikleri sınırlı olan % 6-15 oranında TH-positif nöron hücreleri içerirler (Liu et al., 2008). Bu nedenle, PH çalışmaları için erişilebilir bir model oluşturmak oldukça zordur. İdiyopatik PH'nda moleküler ve nörokimyasal parametreleri çalışmak için insan nöroblastoma veya sıçan feokromasitoma hücre hatları (SH-SY5Y ve PC12) kullanılmaktadır (Lee et al., 2002; Gomez-Lazaro et al., 2008). Bu hücre hatları tümör hücresi olmasına rağmen, onkojenik ve mitojenik özelliklere sahiptir (Biedler et al., 1978). *In vitro* hücresel Parkinson modeli oluşturmak üzere, 7 gün süresince düşük serum ve retinoik asit varlığında insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattının, morfolojik ve kimyasal özelliklerine bakılarak dopaminerjik nöron benzeri yapılara farklılaştığı gösterilmiştir. Parkinson hastalığının *in vitro* modeli olarak kullanılması için insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattı üzerinde retinoik asitin farklılaştırma özellikleri (Miloso et al., 2004; Guarnieri et al., 2009), morfolojik ve nöronal belirleyiciler kullanılarak geniş bir şekilde araştırılmıştır (Tieu et al., 1999; Cheung et al. 2009). Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinin retinoik asit ile farklılaştırılması ışık mikroskobu analizi sonucunda morfolojik olarak gösterilmiştir. Dolayısıyla farklılaştırma verilerimizin (Şekil 4.1 A, B, C, D) morfolojik açıdan önceki yapılan çalışmalarla tutarlı olduğu görülmektedir.

*In vitro* Parkinson modelini oluşturmak için, farklılaştırılmış nöroblastoma hücre hattı üzerine farklı dozlarda 6-OHDA toksisitesi uygulanarak sonuçlar WST-1 hücre sağkalım testi ile değerlendirilmiştir. Yapılan önceki çalışmalar, farklılaştırılmış nöroblastoma hücrelerinin bu nörotoksine olan duyarlılığını hem sitotoksite testi ile, hem de hücrenin apoptotik yolu üzerinden göstermişlerdir (Tieu et al., 1999; Cheung et al., 2009).

Memelilerde p38 MAPK'lar çeşitli hücrel streslerle aktive olurlar. Bu kaskadların aktivasyonun, hücre apoptozuna neden olarak Parkinson hastalığının ilerlemesinde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Wilms et al., 2003, Karunakaran and Ravindranath, 2009 ve Yasuda et al., 2011).

Bu sebepten dolayı nöronlardaki p38 MAPK sinyal yolağı, Parkinson hastalığı gibi nörodejenaratif hastalıklar için tedavi yaklaşımları açısından bir hedef haline gelmiştir. Erken hayvan hücre aktarım (translant) deneylerinde, p38 MAPK inhibitörü kullanarak transplante edilmiş dopaminerjik hücrelerin sağ kalımında bir artış olduğu gösterilmiştir (Zawada et al., 2001). Diğer çalışmalarda, p38 MAPK inhibitörlerinin (SB239063, PD169316) *in vitro* Parkinson modelinde uygulanan nörotoksositeye karşı hücreleri koruduğu bulunmuştur (Choi et al., 2004, Wang et al., 2005, Karunakaran et al., 2008 ve Karunakaran and Ravindranath, 2009). Bu tez çalışması için kullanılan Parkinson modelinde ise, p38 inhibitörü olarak kullanılan SB203508'in nöroblastoma hücreleri üzerinde 6-OHDA toksik ajanına karşı koruyucu olmadığı görülmektedir. Bu durumun, çalışmamızda kullanılan deneysel yöntemlerden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

RSK, ERK tarafından aktive olmakta ve Ras-ERK yolağını aktive edebilen büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterlere yanıt olarak hücre içi sinyallere aracılık etmektedir. RSK; gen transkripsiyonu, protein sentezi ve proliferasyon gibi farklı hücrel süreçler ile ilişkili olan sitozolik ve nükleer proteinleri fosforillemektedir. MSK, ERK ve p38MAPK tarafından aktive olmakta ve Ras aktivatörlerinin yanı sıra hücrel stres uyarılarına da yanıt vermektedir. MSK baskın olarak nükleusta lokalize olmaktadır ve transkripsiyon faktörlerini fosforillemektedir (Morten Frodin et al., 1999). Yapılan çalışmalar ile RSK-B ile mitojen ve stres tarafından aktive edilen protein kinazın (MSK) RSK-ilişkili kinaz ailesine ait üyeler olduğu belirlenmiştir. (Deak, et al. 1998; Pierrat et al., 1998; New et al., 1999). MSK, ERK'in substratıdır ancak p38 MAPK tarafından da ayrıca fosforillenebilmektedir, bu nedenle TNF- $\alpha$  ve hücrel stres tarafından uyarılabilmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, nöroblastoma hücrelerine uygulanan nörotoksik strese karşı RSK sinyal yolağının ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

GSK3 $\beta$ , hücre sağkalımının düzenlenmesinde, mikrotübül dinamiklerinin modülasyonunda ve glikojen metabolizmasında önemli rol oynayan bir kinazdır (Kaytor and Orr, 2002). Son zamanlarda oksidatif stres, hiperozmotik stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi hücrel streslerin GSK3 $\beta$ 'nin aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (Meier, Thelen et al. 1998; Kaytor and Orr, 2002; Song, De Sarno et al. 2002). 6-OHDA'nin, ER stresini tetikleyerek GSK3 $\beta$  fosforilasyonunu regüle ettiği belirtilmiştir. 6-OHDA aracılıklı olan GSK3 $\beta$ 'nin bu aktivitesi Serin 9 (Ser9) fosforilasyonu üzerinden negatif olarak (Song, De Sarno et al. 2002), Tirozin 216 (Tyr216) fosforilasyonu üzerinden ise pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Grimes and Jope, 2001).

Yapılan bir çalışmada 6-OHDA indükleyici *in vitro* Parkinson modelinde dopaminerjik hücre ölümünde GSK-3 beta sinyal yolağının koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle GSK-3 beta'nın selektif inhibitörlerinin kullanımının Parkinson hastalığına karşı geliştirilecek ilaç hedefli tedavide önemli bir potansiyele sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Gang Chen et al., 2004). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, kullanılan GSK-3 beta inhibitörünün (Lityum) 6-OHDA toksisitesi ile meydana gelen hücre ölümünde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında öncelikle *in vitro* Parkinson modeli oluşturulmuş, daha sonra bu model üzerinde özellikle hücre metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olan bazı sinyal yollarının etkisi araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, GSK-3 beta sinyal yolağının oluşturulan modelde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu sonucun, Parkinson hastalığının etyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve buradan yola çıkarak, hastalığa karşı yeni tedavi stratejileri geliştirilebilmesi için aracılık edeceği umulmaktadır.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Aarsland D, Tandberg E, Larsen JP and Cummings JL.,** 1996, Frequency of dementia in Parkinson disease. *Archives of Neurology.* 53: 538–542pp,

**Adler C. and Ahlskog JE. Current Clinical Practice:** ,2000, Parkinson's disease and Movement Disorders. New Jersey:

**Alan E, Guttmacher M. and Collins FS.,** 2003, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *New Eng J Med.* 348: 1356-1364pp,

**Alcorta, D. A., C. M. Crews, et al.,** 1989, Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase, *Molecular and Cellular Biology* **9**(9): 3850-3859pp.

**Alessi, D. R., S. R. James, et al.,** 1997, Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B, *Current Biology* **7**(4): 261-269pp.

**Andreas S. ,** 2004, Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: "6-OHDA and MPTP, *Cell and Tissue Research*, 318: 215-224pp,

**Andersen, J. K.,** 2004, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nature Medicine* 10 Suppl: S 18-25pp.

**Anderson, K. E., J. Coadwell, et al.,** 1998, Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B, *Current Biology* 8(12): 684-691pp.

**Angenstein, F., W. T. Greenough, et al.,** 1998, Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: a possible factor regulating synaptic protein synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25): 15078-15083pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Banerjee, R., A. A. Starkov, et al.**, 2009, Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1792(7): 651-663pp.

**Bardwell, L.**, 2006, Mechanisms of MAPK signalling specificity, *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5): 837-841pp.

**Beal M.F.**, 1995, Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann., Neurol*, 38: 357-366pp,

**Beal M.F.**, 1998, Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases, *Biochem. Biophys. Acta*, 1366: 211-223pp.

**Beckman KB and Ames BN.**, 1998, The free radical theory of aging matures, *Physiol.Rev.* 78: 547–581pp.

**Björklund A, & Hökfelt T (Eds.)**, 2004, *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Vol. 2. Classical Transmitters in the CNS, Part I.*

**Björklund A, & Lindvall O.**, 2004, Dopamine-containing systems in the CNS.

**Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. and Freedman, L.S.**, 1978., Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones, *Cancer Res.* 38, 3751–3757pp

**Blenis, J.**, 1993, Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13): 5889-5892pp.

**Bloom, F.E., Algeri, S., Groppetti, A., Revuelta, A. and Costa, E.**, 1969, Lesions of central norepinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure, *Science*, 166, 1284-1286pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Blum, D., S. Torch et al.**, 2001, Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease, *Progress in Neurobiology* 65(2): 135-172pp.

**Bogerts B, Hantsch J and Herzer M.**, 1983, A morphometric study of the dopaminecontaining cell groups in the mesencephalon of normals, Parkinson patients, and schizophrenics, *Biological Psychiatry*. 18(9): 951–969pp.

**Bourre JM, Nonneil M, Dumont O, Piciotti M, Claaf R, Portugal H. and Nalbone Lafont H.** Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fattyacid composition, *Biochim biophys Acta*. 1043: 149-152pp.

**Brodbeck, D., P. Cron, et al.** 1999, A human protein kinase B gamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain, *Journal of Biological Chemistry* 274(14): 9133-9136pp.

**Brown NP, Bron AJ, Harding JJ. and Dewar HM.**, 1998, Nutrition supplements and the eye, *Eye* 12: 127-133pp.

**Chalon S, Delion-Vancassel S, Belzung C, Guilloteau D, Leguisquet AM, Besnard JC. and Durand G.**, 1998, Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats, *J Nutr.*, 128: 2512-2519pp.

**Çakmur R.**, 2003, Parkinson hastalığının epidemiyolojisi ve klinik özellikleri, *Türkiye klinikleri Nöroloji Dergisi*, 15-17s.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Choi, W.S., Eom, D.S., Han, B.S., Kim, W.K., Han, B.H., Choi, E.J., Oh, T.H., Markelonis, G.J., Cho, J.W. and Oh, Y.J.,** 2004, Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons, *The Journal of Biological Chemistry* 279, 20451–20460pp.

**Carol J. Thiele,** 2004, Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death ( Erişim tarihi:7 Mayıs 2004).

**Casamayor, A., N. A. Morrice, et al.,** 1999, Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo, *Biochem, J* 342 ( Pt 2): 287-292pp.

**Chan, T. O., S. E. Rittenhouse, et al.,** 1999, AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation, *Annu Rev Biochem*, 68: 965-1014pp.

**Chang, L. and M. Karin,** 2001, Mammalian MAP kinase signalling cascades *Nature*, 410(6824): 37-40pp.

**Cheng, J. Q., A. K. Godwin, et al.,** 1992, AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19): 9267-9271pp.

**Cheung, Y. T., W. K. W. Lau, et al.,** 2009, Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research, *Neurotoxicology*, 30(1): 127-135pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalffy B, Jiang Y, Ciechanover A, Orr HT, Beaudet AL and Zoghbi HY.,** 1999, Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24: 879–892pp.

**Cohen, P. ,**1997, The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells, *Trends Cell Biol*, 7(9): 353-361.

**Cohen P, Frame S.,** 2001, The renaissance of GSK3, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(10):769-76pp.

**Dauer W and Przedborski S. Parkinson's disease:,** 2003, mechanisms and models, *Neuron*, 39: 889–909pp.

**Dawson, T.M. and Dawson, V.L.,** 2003, Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease, *Science* 302, 819–821pp.

**Deak, M., A. D. Clifton, et al.,** 1998, Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB, *Embo Journal*, 17(15): 4426-4441pp.

**Dunnett SB and Bjorklund A.,** 1999, Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease, *Nature*, 399: A32–39pp.

**Douville, E. and J. Downward,** 1997, EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2, *Oncogene* 15(4): 373-383.

**Duggan, H,** 2010, Central and Peripheral Nervous System'',  
<http://myspsychologyblog.com/central-peripheral-nervous-system>

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Erikson, E. and J. L. Maller,** 1985, A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(3): 742-746pp.

**Erikson, R. L.,** 1991, Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6, *Journal of Biological Chemistry*, 266(10): 6007-6010pp.

**Evans P.H.,**1993, Free radicals in brain metabolism and pathology, *British Med. Bull*, 49: 577-587pp.

**Fahn S.,** 1995, Parkinsonism. In: Rowland LP, editor. *Merrit's Textbook of Neurology.9th ed. Baltimore: Md. Lipincott Williams ft Wilkins*, 713-730pp.

**Fearnley JM and Lees AJ.,** 1991, Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity, *Brain*, 114: 2283–2301pp.

**Ferrer I, Barrachina M. and Puig B.,** 2002, Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, Epub.

**Findley LJ. and Koller WC.,** 1995, Handbook of tremor Disorders: Clinical features oftremor in extrapyramidal syndromes, *New York: Marcel Dekker Inc Rajput AH*, 275-29pp.

**Feng, J., J. Park, et al.,** 2004, Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase, *Journal of Biological Chemistry*, 279(39): 41189-41196pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Frech, M., M. Andjelkovic, et al.**, 1997, High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity, *Journal of Biological Chemistry* 272(13): 8474-8481pp.

**Fuenzalida, K., R. Quintanilla, et al.**, 2007, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis, *Journal of Biological Chemistry* 282(51): 37006-37015pp.

**Galluzzi, L., K. Blomgren, et al.**, 2009, "Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury, *Nature Reviews Neuroscience* 10(7): 481-494pp.

**Ganong, F.W.**, 2002, Tıbbi Fizyoloji, *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Bölüm II*, 50-55s.

**Garcia, Z., A. Kumar, et al.**, 2006, Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division, *Embo Journal* 25(4): 655-661pp.

**Gerlach M., Rieder P. and Youdim M. B. H.**, 1996, Molecular mechanisms for neurodegeneration.

**Ghoda, L., X. Lin, et al.**, 1997, The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha and stimulates its degradation in vitro, *Journal of Biological Chemistry* 272(34): 21281-21288pp.

**Giasson BI, Uryu K, Trojanowski JQ and Lee VM.**, 1999, Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro, *J. Biol. Chem.*, 274: 7619-7622pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Grimes, C. A. and R. S. Jope**, 2001, The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling, *Progress in Neurobiology*, 65(4): 391-426pp.

**Grove, J. R., D. J. Price**, et al., 1993, Regulation of an epitope-tagged recombinant Rsk-1 S6 kinase by phorbol ester and erk/MAP kinase, *Biochemistry*, **32**(30): 7727-7738pp.

**Gustin, M. C., J. Albertyn**, et al., 1998, MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4): 1264-1300pp.

**Gutkind, J. S.**, 2000, Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors, *Sci STKE*, 2000(40): rel.

**Halliwell B.**, 1992, Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59: 1609–1623pp.

**Halliwell B. and Gutteridge J. M.**, 1985, Oxygen radicals and the nervous system. *Trends. Neurol. Sci.* 1: 22-26pp.

**Harwood, A. J.**, 2001, Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor, *Cell* 105(7): 821-824pp.

**Hornykiewicz O and Kish SJ.**, 1987, Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. In: Yahr M and Bergmann KJ, editors. *Parkinson's Disease. New York: Raven Pres*, 19–34pp.

**Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L.** et al., 1992, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *JNeurol Neurosurg Psych.*, 55: 181-184pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Hughes AJ, Daniel SE. and Lees AJ.,**1993, The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases, *Adv Neurol.*, 60: 595-599pp.

**Hughes, K., E. Nikolakaki,** et al., 1993, Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation, *Embo Journal* 12(2): 803-808pp.

**Jenner P and Olanow CW.,** 1998, Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 44: 72-84pp.

**Jefferies, H. B., S. Fumagalli,** et al., 1997, Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k., *Embo Journal*, 16(12): 3693-3704pp.

**Joel, P. B., J. Smith,** et al., 1998, pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167, *Molecular and Cellular Biology*, 18(4): 1978-1984pp.

**Johnson, G. L. and R. Lapadat,** 2002, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinase, *Science*, 298(5600): 1911-1912pp.

**Jones, P. F., T. Jakubowicz,** et al., 1991, Molecular cloning of a second form of rac protein kinase, *Cell Regul*, 2(12): 1001-1009pp.

**Jones, S. W., E. Erikson,** et al. 1988, A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(10): 3377-3381pp.

**Jope, R. S. and G. V. Johnson,** 2004, The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3, *Trends in Biochemical Sciences*, 29(2): 95-102pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Jost, L. M., J. M. Kirkwood**, et al., 1992, Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells, *J Immunol Methods* 147(2): 153-165pp.

**Ju, M. S., P. Lee**, et al., 2010, Protective effects of standardized Thuja orientalis leaves against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, *Toxicology in Vitro*, 24(3): 759-765pp.

**Gomez-Lazaro, M., Bonekamp, N.A., Galindo, M.F., Jordan, J. and Schrader, M.**, 2008, 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells, *Free Radic. Biol. Med.* 11, 1690–1699pp.

**Guarnieri, S., Pilla, R., Morabito, C., Sacchetti, S., Mancinelli, R., Fano, G. and Mariggìò, M.A.**, 2009, Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 27, 135–147pp.

**Ikeda I, Mitsui K. and Imaizumi K.**, 1996, Effect of dietary linoleic, alpha-linolenic and arachidonic acids on lipid metabolism, tissue fatty acid composition and eicosanoid production in rats, *J Nutr Sci Vitaminol.* 42: 541-551pp.

**Kaltschmidt, B., D. Widera**, et al., 2005, Signaling via NF-kappaB in the nervous system, *Biochim Biophys Acta* 1745(3): 287-299pp.

**Kannan, N. and A. F. Neuwald**, 2004, Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha." *Protein Sci* 13(8): 2059-2077pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Karunakaran, S. and Ravindranath, V.**, 2009, Activation of p38 MAPK in the substantia nigra leads to nuclear translocation of NF-kappaB in MPTP-treated mice: implication in Parkinson's disease, *Journal of Neurochemistry* 109, 1791–1799pp.

**Karunakaran, S., Saeed, U., Mishra, M., Valli, R.K., Joshi, S.D., Meka, D.P., Seth, P. and Ravindranath, V.**, 2008, Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, *The Journal of Neuroscience* 28, 12500–12509pp.

**Kaytor, M. D. and H. T. Orr**, 2002, The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease, *Curr Opin Neurobiol*, 12(3): 275-278pp.

**Kidd, P. M.**, 2000, Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management, *Altern Med Rev*, 5(6): 502-529pp.

**Koller WC, Wong GF. and Lang A.**, 1989, Posttraumatic movement disorders: a review, *Mov Disord.*, 4: 20-36pp.

**Kroemer, G., L. Galluzzi**, et al., 2007, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death, *Physiological Reviews*, 87(1): 99-163pp.

**Kyriakis, J. M. and J. Avruch**, 1996, Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines, *Bioessays*, 18(7): 567-577pp.

**Kyriakis, J. M. and J. Avruch**, 2001, Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiological Reviews* 81(2): 807-869pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Lee, C.S., Han, J.H., Jang, Y.Y., Song, J.H. and Han, E.S.,** 2002, Differential effect of catecholamines and MPP on membrane permeability in brain mitochondria and cell viability in PC12 cells, *Neurochem. Int.* 40, 361–369pp.

**Lee, D. H., C. S. Kim,** et al., 2011, Astaxanthin protects against MPTP/MPP plus -induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, 49(1): 271-280pp.

**Leighton, I. A., K. N. Dalby,** et al., 1995, Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation, *Febs Letters*, 375(3): 289-293pp.

**Leroy, K. and J. P. Brion,** 1999, Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain, *J Chem Neuroanat*, 16(4): 279-293pp.

**Lewis, T. S., P. S. Shapiro,** et al., 1998, Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv Cancer Res*, 74: 49-139pp.

**Lewis, J,** 2009, Facts about Charcot-Marie-Tooth disease and related disease, *Muscular Dystrophy Association Publication*, 800, 572-1717pp.

**Liu Y. Longmore R.B.,** 1997, Dietary sandalwood seed oil modifies fatty acid composition of mouse adipose tissue, brain, and liver *Lipids*

**Lopez GH, Ilincheta de Boschero MG, Castagnet PI. and Giusto NM.,** 1995, Age associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Compara Biochem Physiol.* 112: 331-343pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Lotharius, J. and P. Brundin**, 2002, Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein, *Nature Reviews Neuroscience* 3(12): 932-942pp.

**Luo, J., J. Chen**, et al., 2007, Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?, *Laboratory Investigation*, 87(2): 97-103pp.

**Malcolm CA, McCulloch DL, Montgomery C, Shepherd A. and Weaver LT.**, 2003, Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visualeyoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 88(5): 383-390pp.

**Marsden CD.**, 1983, Neuromelanin and Parkinson's disease, *J. Neural Transm. Suppl.*, 19: 121-141pp.

**Mattson, M. P.**, 2005, NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons, *Neurochemical Research*, 30(6-7): 883-893pp.

**Mattson, M. P., S. L. Chan**, et al., 2002, Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior, *Physiological Reviews*, 82(3): 637-672pp.

**Michele GD, Filla A, Volpe G**, et al., 1996, Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: A case control study in Southern Italy, *Mov Disord.* 11(1): 17-23pp.

**Miloso, M., Villa, D., Crimi, M., Galbiati, S., Donzelli, E., Nicolini, G. and Tredici, G.**, 2004, Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent, *J. Neurosci. Res.*, 75, 241-252pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Moller, D. E., C. H. Xia,** et al., 1994, Human rsk isoforms: cloning and characterization of tissue-specific expression, *Am J Physiol*, 266(2 Pt 1): C351-359pp.

**Morten Frodin and Steen Gammeltof,** 1999, Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151, 65–77pp.

**Nakajima, T., A. Fukamizu,** et al., 1996, The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK, *Cell* 86(3): 465-474pp.

**New, L., M. Zhao,** et al., 1999, Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase, *Journal of Biological Chemistry*, 274(2): 1026-1032pp.

**Okuyama H.,** 1992, Minimum requirements of n-3 and n-6 essential fatty acids for the function of the central nervous system and for the prevention of chronic disease, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 200: 174-176pp.

**Orth, M. and S. J. Tabrizi,** 2003, Models of Parkinson's disease, *Mov Disord*, 18(7): 729-737pp.

**Ozansoy M. ve Başak AN.,** 2004, Parkinson hastalığının genetiği ve nörodejenerasyonun moleküler biyolojisi, *Parkinson Hast. Hareket Boz. Der.*, 7(2):109-120s

**Palmer, A., A. C. Gavin,** et al., 1998, A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1, *Embo Journal*, 17(17): 5037-5047pp.

**Parkinson, J.,** 2002, An essay on the shaking palsy. 1817, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2): 223-236pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Pearson, G., F. Robinson,** et al., 2001, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr Rev*,22(2): 153-183pp.

**Perry, T. L., D. V. Godin,** et al., 1982, Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency?, *Neuroscience Letters*, 33(3): 305-310pp.

**Peterson, R. T. and S. L. Schreiber,** 1999, Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family, *Current Biology*, 9(14): R521-524pp.

**Pierrat, B., J. S. Correia,** et al., 1998, RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK), *Journal of Biological Chemistry*, 273(45): 29661-29671pp.

**Pollanen MS, Dickson DW. and Bergeron C.,** 1993, Pathology and biology of the Lewy Body, *J Neuropathol Exp Neurol.*,52: 183-191pp.

**Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. Pathology and biology of the Lewy** Przedborski S, and Jackson-Lewis V., 2000, ROS and Parkinson's disease: a view to a kill. In: Poli G, Cadenas E and Packer L. editors. *Free Radicals in Brain Pathophysiology*. New York: Marcel Dekker, Inc, 273–290pp.

**Porter, C.C., Totaro, J.A. and Stone, C.A.,** 1963, Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the heart of mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 140, 308-316pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Porter, C.C., Totaro, J.A. and Burcin, A.,** 1965, The relationship between radioactivity and norepinephrine concentrations in the brains and hearts of mice following administration of labelled methyl dopa or 6-hydroxydopamine (6-OHDA), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 150, 17-21pp.

**Przedborski S. and Jackson V. ,**1998, Mechanisms of MPTP toxicity, *Mov Disord.*, 13(1):35-38pp.

**Powell, D. W., W. M. Pierce, et al.,** 2005, Defining mitogen-activated protein kinase pathways with mass spectrometry-based approaches, *Mass Spectrom Rev*, 24(6): 847-864pp.

**Rameh, L. E. and L. C. Cantley,** 1999, The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function, *Journal of Biological Chemistry*, 274(13): 8347-8350pp.

**Ray, L. B. and T. W. Sturgill,** 1988, Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 263(25): 12721-12727pp.

**Rayasam, G. V., V. K. Tulasi, et al.,** 2009, Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake, *Br J Pharmacol*, 156(6): 885-898pp.

**Riederer, P., E. Sofic, et al.,** 1989, Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in Parkinsonian brains, *J Neurochem*, 52(2): 515-520pp.

**Robinson, M. J. and M. H. Cobb,** 1997, Mitogen-activated protein kinase pathways, *Curr Opin Cell Biol*, 9(2): 180-186pp.

**Rogers, K,** 2011, The human body: The brain and the nervous system, *Britannica and Rosen Educational Services*, 19-142pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Ross RAC, Jongen JCF and van der Velde EA.**, 1996, Clinical course of patients with idiopathic Parkinson's disease, *Mov Disord.*, 11(3): 236-246pp.

**Saggu, H., J. Cooksey, et al.**, 1989, A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra, *J Neurochem*, 53(3): 692-697pp.

**Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al.**, 2005, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 307(5712): 1098-1101pp.

**Saudou F, Finkbeiner S, Devys D. and Greenberg ME.**, 1998, Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions, *Cell*, 95: 55-66pp.

**Schenk, P. W. and B. E. Snare-Jagalska**, 1999, Signal perception and transduction: the role of protein kinases, *Biochim Biophys Acta*, 1449(1): 1-24pp.

**Schober, A.**, 2004, Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP, *Cell and Tissue Research*, 318(1): 215-224pp.

**Schon, E. A. and G. Manfredi**, 2003, Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction, *Journal of Clinical Investigation*, 111(3): 303-312pp.

**Schouten, G. J., A. C. Vertegaal, et al.**, 1997, IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase, *Embo Journal*, 16(11): 3133-3144pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Schroeter, H., C. Boyd, et al.**, 2002, MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide, *Neurobiology of Aging*, 23(5): 861-880pp.

**Schoenberg BS.**, 1987, Descriptive epidemiology of Parkinson's disease: diseasedistribution and hypothesis formulation. *Adv Neurol.* 45: 277-283pp.

**Senoh, S. and Witkop, B.**, 1959a, Formation and rearrangements of aminochromes from a new metabolite of dopamine and some of its dervaties, *J. Am. Chem. Soc*, 81, 6231-6235pp.

**Senoh, S. and Witkop, B.**, 1959b, Nonenzymatic conversion of dopamine to norepineprine and trihydroxyphenethylamine, *J. Am. Chem. Soc*, 81, 6222- 6231pp.

**Senoh, S., Creveling, C.R., Udenfriend, S. and Witkop, B.**, 1959a, Chemical, enzymatic and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine, *J. Am. Chem. Soc*, 81, 6236-6240pp.

**Senoh, S., Witkop, B., Creveling, C.R and Udenfriend, S.**, 1959b, 2,4,5-trihydroxyphenethylamine, a new metabolite of 3,4 dihydroxyphenethylamine, *J. Am. Chem. Soc*, 81, 1768-1769pp.

**Shankar J, Andersen C and JK.**, 2004, Dopaminergic neurons, *Cancer and Aging at theCrossroads.* 37: 942-946pp.

**Smith, J. A., C. E. Poteet-Smith, et al.**, 1999, Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo, *Journal of Biological Chemistry*, 274(5): 2893-2898pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Song L, De Sarno P. and Jope RS.**, 2002, Central role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation, *Acta Neuropathol*, 104(6):583-91pp.

**Stillwell W, Ehringer W. and Jenki LJ.**, 1993, Docosahexaenoic acid increases permeability of lipid vesicles and tumor cells, *Lipids*, 28: 103-108pp.

**Strange P.G.**, 1996, Brain Biochemistry and brain disorders. Oxford University Press, London.

**Stambolic, V. and J. R. Woodgett**, 1994, Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  in intact cells via serine 9 phosphorylation., *Biochem J*, 303 ( Pt 3): 701-704pp.

**Stone, C.A., Stavorski, J.M., Ludden, C.T., Wengler, H.C., Ross, C.A., Totaro, J.A. and Porter, C.C.**, 1963, Comparison of the some pharmacological effects of certain 6-substituted dopamine derivatives with the reserpine guanethidine and metaraminol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 142,147-156pp.

**Sturgill, T. W., L. B. Ray**, et al., 1988, Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II, *Nature* 334(6184): 715-718pp.

**Surendran, S. and S. Rajasankar**, 2010, Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches, *Neurol Sci*, 31(5): 531-540pp.

**Sutherland, C., D. G. Campbell**, et al., 1993, Identification of insulin-stimulated protein kinase-1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonines phosphorylated during activation by mitogen-activated protein kinase, *Eur J Biochem*, 212(2): 581-588pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Suzuki H, Park SJ, Tamura M. and Ando S.**, 1998, Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stemphospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet, *Mech Ageing Dev.* 16: 119-128pp.

**Şenel, F.**, 2003, Beyinin gizemi, *Bilim ve Teknik Dergisi Eylül Sayısı Eki*.

**Thoenen, H. and Tranzer, J.P.**, 1968, Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol, Exp. Ther.*, 261, 271-288pp.

**Tolwani, R. J., M. W. Jakowec**, et al., 1999, Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models, *Lab Anim Sci*, 49(4): 363-371pp.

**Tieu, K., Zuo, D.M. and Yu P.H.**, 1999, Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of Bcl-2 and p53 proteins, *J. Neurosci. Res.*, 58, 426-435pp.

**Ungerstedt, U.**, 1968, 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons, *Eur. J. Pharmacol*, 5, 107-110pp.

**Uretsky, N.J. and Iversen, L.L.**, 1970, Effects of 6-hydroxydopamine on catecholamine containing neurones in the rat brain, *J. Neurochem*, 17, 269pp.

**Vincent, A. M., J. W. Russell**, et al., 2004, Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy, *Endocr Rev*, 25(4): 612-628pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Wang, Q. M., C. J. Fiol**, et al., 1994, Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, 269(20): 14566-14574pp.

**Wassarman, D. A., N. M. Solomon**, et al., 1994, The *Drosophila melanogaster* ribosomal S6 kinase II-encoding sequence, *Gene*, 144(2): 309-310pp.

**Weber G. F**, 1994, The pathophysiology of reactive oxygen intermediates in central nervous system, *Med. Hypothes.*, 43: 223-230pp.

**Whitman, M., C. P. Downes**, et al., 1988, Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate, *Nature*, 332(6165): 644-646pp.

**Widmann, C., S. Gibson**, et al., 1999, Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiological Reviews*, 79(1): 143-180pp.

**Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L. and Lucius, R.**, 2003, Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease, *The FASEB Journal* 17, 500–502pp.

**Wong, E. V., A. W. Schaefer**, et al., 1996, Involvement of p90rsk in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1, *Journal of Biological Chemistry*, 271(30): 18217-18223pp.

**Xing, J., D. D. Ginty**, et al., 1996, Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase, *Science*, 273(5277): 959-963pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Yasuda, S., Sugiura, H., Tanaka, H., Takigami, S. and Yamagata, K.,** 2011, p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases, *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 11, 45–59pp

**Zawada, W.M., Meintzer, M.K., Rao, P., Marotti, J., Wang, X., Esplen, J.E., Clarkson, E.D., Freed, C.R., Heidenreich, K.A.,** 2001. Inhibitors of p38 MAP kinase increase

**Zhao, Y., Bjørnbæk, C., Weremowicz, S., Morton, C.C. and Moller D.E.,** 1995, RSK3 encodes a novel p90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4353–4363pp.

**Zhao, Y., C. Bjorbaek,** et al., 1995, RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation., *Molecular and Cellular Biology*, **15**(8): 4353-4363pp.

**Zheng, C. F. and K. L. Guan,** 1993, Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases, *Journal of Biological Chemistry*, 268(32): 23933-23939pp.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı: G.Gamze BEYOĞLU**

**Doğum Tarihi ve Yeri: 28.03.1986/Aydın**

**Uyruğu: T.C.**

**E-mail: beyoglugamzeg@gmail.com**

## EĞİTİM BİLGİLERİ

**Lisans:** Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Yüksek Lisans:** Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Biyoteknoloji AB

## KATILMIŞ OLDUĞU ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRELER

27/08/2008 – Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi  
31/08/2008 (katılımcı olarak)

27/08/2009 – Ege Üniversitesi Uluslararası Katılımlı 3. Moleküler  
31/08/2009 Biyoloji ve Genetik Araştırma ile Uygulama Platformu  
(katılımcı ve düzenleme kurulu üyesi olarak)

04/03/2009 İletişim ve Davranış Geliştirme Adlı Eğitim Semineri

20/12/2008 ODTÜ 1. Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar  
Sempozyumu

27/10/ 2009 Ege Üniversitesi Yapay Doku ve Organ Sempozyumu

18/04/2011 James Watson Semineri Boğaziçi Üniversitesi

12-13/09/2011	Medipol Üniversitesi Nöron Kültürü Kursu
04-08/07/2011	Tübitak MAM Mikroorganizma Moleküler Genetik Uygulamaları Kursu
23-24/09/2011	1.Ulusal Biyoteknoloji Zirvesi ODTU
24-25/11/2011	1. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu
06-08/06/2012	Temel Hücre Kültürü ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu-I
31/03/2013	Ege Üniversitesi 5. Geleneksel Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu
28/04/2013	11. Ulusal sinir Bilim Kongresi

### **GÖREV ALDIĞI ARAŞTIRMA PROJELERİ**

**Lisans tezi** : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, İZMİR; Proje Adı: Tübitak 2209 Öğrenci Projesi “Kontrollü Koşullar Altında *Cylindrotheica Closterium* Farklı Ağır Metal dozajlarda uygulanması ve DNA izolasyonu RPD-PCR ile gösterilmesi.” Proje Sorumlusu: Prof. Dr. Atakan SUKATAR

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İZMİR; Proje Adı: EGF aracılıklı olarak değişen HN1 ekspresyonunun prostat ve meme tümör hatlarında işlevinin tanımlanması; Proje Sorumlusu: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ; TÜBİTAK, Proje No: 110S134 (01/03/2012 – 31/08/2012 tarihleri arasında bursiyer olarak)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İZMİR; Proje Adı: Hayvan depresyon modelinde Histonlardaki Epigenetik değişikliklerin rolü: Erken stress deneyimi sonrası oluşan kromatin yeniden yapılanması; Proje Sorumlusu: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ; BMBF-TÜBİTAK, Proje No: (TBAG) 210T066, (Mayıs- Eylül 2012 proje de araştırmacı olarak çalıştım)

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji AB, İZMİR; Proje Adı: SH-SY5Y Hücreleri Kullanılarak 6-OHDA Aracılığıyla Oluşturulan *İn vitro* Parkinson Modelinde P90RSK ve P38 Sinyal Yolaklarının GSK3B Düzenlemesine Etkilerinin Araştırılması; Proje Sorumlusu: Prof. Dr. Ersin O. Koylu; BAP-TÜBİTAK, Proje No: 13-BAM-003(E.Ü. Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Projesi)