

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YABANIL TIP PARKİN İFADE EDEN İNSAN NÖROBLASTOMA
HÜCRELERİNDE FOSFOPROTEOM ANALİZİ**

MEHİN ZÜLFİGAROVA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmenliğinin
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ – 2017

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YABANIL TIP PARKİN İFADE EDEN İNSAN NÖROBLASTOMA
HÜCRELERİNDE FOSFOPROTEOM ANALİZİ**

MEHİN ZÜLFİGAROVA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmenliğinin
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: Doç. Dr. Gürler AKPINAR

KOCAELİ – 2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

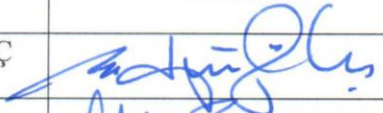
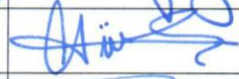
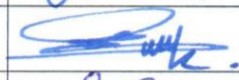
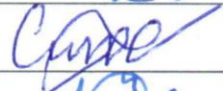
Tez Adı: Yabancı Tip Parkin İfade Eden İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Fosfoproteom Analizi

Tez Yazarı: Mehin ZÜLFİGAROVA

Tez Savunma Tarihi: 12.06.2017

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gürler AKPINAR

İşbu çalışma, jürimiz tarafında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ	
ÜYE (DANIŞMAN)	Doç. Dr. Gürler AKPINAR	
ÜYE	Prof. Dr. Murat KASAP	
ÜYE	Prof. Dr. Uzay GÖRMÜŞ	
ÜYE	Yrd. Doç. Aylin KANLI	

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../ 2017

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Amaç

Bu çalışmanın amacı; SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında Yabanıl tip (WT) ve mutant Parkin proteinlerinin (Q311R ve A371T) ifadesi sonrasında oluşan fosforilasyon düzeyindeki değişiklikleri proteomik yaklaşımlarla araştırmak, ubikitinlenme ve fosforilasyon arasındaki çapraz etkileşime ışık tutmaktır.

Yöntem

Hücrelerden elde edilen protein özütleri iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrıştırıldı. Fosforile olmuş proteinler ProQ Diamond boyası ile tayin edilerek protein spotları jellerden kesildi ve ardından, proteinler MALDI-TOF/TOF analizi ile tanımlandı.

Bulgular

WT ve mutant tetrasiklin indüksiyonu yapılmış ve yapılmamış hücrelerden elde edilen proteinlerden 2D tabanlı karşılaştırmalı spot analizi yapıldı. Fosfoprotein boyaması sonrasında jellerde 35 ± 3 fosforillenmiş protein spotu, toplamda ise Sypro boyaması sonrasında 215 ± 15 protein spotu gözlenmiştir. WT Parkin ifade eden hücrelerde 10, mutant Parkin ifade eden hücrelerde ise 6 proteinin fosforilasyon seviyelerinde indüksiyon sonrası artış olduğu görüldü.

Sonuç

Beklentimiz WT Parkin indüksiyonunun ubikuitinlasyonunu artırarak ubikitinlenme ve fosforilasyon arasındaki çapraz etkileşimi baskın hale getirmesi ve dolayısıyla dolaylı yoldan fosforilasyon ilişkili yolların düzenlenmesi yönündedir. Nitekim STRING analizinin PI3K-AKT yolağını işaret etmesi ubikuitin bağımlı fosforilasyon şemasının değiştiğini göstermektedir. Diğer taraftan mutant Parkin indüksiyonu sonrasında tanımlanan fosforile proteinlerin ise Parkinson hastalığı ve endoplazmik retikulumda protein işlenmesi ile ilgili sonuçlar alınmıştır. WT ve mutant Parkin eksprese eden hücrelerdeki farklı hücresel yolların ön plana çıkması mutant Parkin'in normal WT'e göre farklı fonksiyonu olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Parkin, SH-SY5Y, 2DE, Protein Fosforilasyonu, ProQ Diamond, MALDI-TOF/TOF.

ABSTRACT

Objective

The purpose of this thesis was to investigate the changes in phosphorylation levels in SH-SY5Y neuroblastoma cell line after expression of the Wild-type and the mutant Parkin proteins (Q311R and A371T). Determination of the changes in phosphorylation levels upon Parkin expression should allow elucidation of the cross-talk between ubiquitination and phosphorylation.

Methods

The protein extracts prepared from Parkin expressing and non-expressing cells were prepared and subjected to 2D gel electrophoresis. Phosphorylated proteins were detected by ProQ Diamond stain and differentially regulated protein spots were excised from the gels. Then, the proteins were identified by MALDI-TOF/TOF analysis.

Results

Consecutive phosphoprotein and total protein staining of the gels revealed the presence of 35 ± 3 phosphoprotein spots and 215 ± 15 total protein spots on the gels. A total of 16 phosphoprotein spots of which 10 belonged to the WT Parkin expressing cells and of 6 belonged to the mutant Parkin expressing cells were identified as differentially regulated.

Conclusions

The induction of the WT Parkin expression should increase ubiquitination events in the cells and stimulate the cross-talk between ubiquitination and phosphorylation. Indeed, STRING analysis linked the regulated proteins to PI3K-AKT pathway, which is one of the most important signaling pathways regulating cell division. On the other hand, the results of phosphorylated proteins which had been identified after an induction of the mutant Parkin protein were found to be related to Parkinson's disease and endoplasmic reticulum protein processing. Observation of such difference in indicated pathways upon either the WT or the mutant Parkin expressions may imply that the mutant Parkin protein is functionally different than the WT Parkin protein.

Key words: Parkin, SH-SY5Y, 2DE, Protein Phosphorylation, ProQ Diamond, MALDI-TOF/TOF.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir konuda benden desteğini esirgemeyen, tez çalışmamda benimle birebir ilgilenen, karşılaştığım sorunların çözümünde elinden gelen yardımı gösteren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a çok teşekkür ederim.

Yardımlarıyla tezime büyük katkısı olan, bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Murat KASAP'a çok teşekkür ederim.

Her sorumuzu sabırla cevaplayan ve bundan hiç yorulmayan anabilim dalı başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Doğan GÜLKAÇ'a, tezin hazırlanmasında yardımlarını eksik etmeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin KANLI'ya çok teşekkür ederim.

Eğitime başladığım ilk günden beri tanıdığım, beni her konuda motive eden laboratuvar arkadaşım Arş. Gör. Eylül Ece İŞLEK' e, sevinçlerimizi ve kederlerimizi birlikte paylaştığımız, bana hep destekçi olan laboratuvar arkadaşlarım Arş. Gör. Kübra KARAOSMANOĞLU YÖNETEN, Ayımuğu ABULA, Nil GÜZEL, Mert SELİMOĞLU, ve Arş. Gör. Mehmet SARIHAN'A dostlukları için teşekkür ederim.

Bana yabancı olduğumu hissettirmeyen, her zorlukta olumlu tavırlarıyla yanımda olan, manevi annem Yeşim İŞLEK ve manevi babam Hakan İŞLEK' e teşekkür etmeyi kendime bir borç bilirim.

Bugüne gelmeme sebep olan, maddi-manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, ne olursa olsun her zaman yanımda olan Canım Aileme: annem Gülgeç ZÜLFİGAROVA, babam Telman ZÜLFİGAROV, ablam Nebahet MEMMEDOVA, abim Murat ZÜLFİGAROV, eniştem Ferit MEMMEDOV ve ailemizin neşe kaynakları olan yeğenlerim Hatice ve Feride MEMEDOVA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLGİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan bilgi ve çizimler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin bir yayıdan kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir intihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

... / ... / 2017

Adı Soyadı

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLGİSİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xixi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Protein Araştırmaları ve Proteomiks.....	1
1.2 Fosfoproteomiks Çalışmaları.....	4
1.3. Parkinson Hastalığı	5
1.3.1. Parkinson Hastalığının Patolojisi	7
1.3.2. Parkinson Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Yöntemler.....	16
1.3.3. Parkinson Hastalığı ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan <i>in vitro</i> Model Hücre Hatları.....	16
1.4. PARK 2 Geni ve Parkin Proteini	18
1.5. Post-Translasyonel Modifikasyonlar	20
1.6. Protein Fosforilasyonu ve Ubikitinlenme	22
1.7. Parkin Proteini ile PINK1 Arasındaki ilişki	25

2. AMAÇ	29
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	30
3. 1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	30
3.2. Hücre Kültürü	33
3.2.1. Hücrelerin Büyütülmesi	33
3.2.2. Hücrelerden Saklama Alınması.....	33
3.2.3. Hücrelerin Çözülmesi.....	34
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	34
3.2.5. Hücrelerin Sayılması	34
3.3. Klonlamalar	36
3.3.1. SH-SY5Y Hücre Hattının <i>in Vitro</i> Ortamda Büyütülmesi ve T-Rex Sistemi.....	36
3.3.2. Yabancı Tip ve Mutant Tip Parkin Proteinini Tetrasiklin Kontrolü Altında Eksprese Edilen Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması	39
3.4. Fosfoproteomiks Çalışması için Kalikulin A Muamelesi.....	39
3.5. Protein Özütlelerinin Hazırlanması	41
3.5.1. SH-SY5Y Hücrelerinden Protein Özütlelerinin Hazırlanması	41
3.5.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	41
3.5.3. Proteinlerin Çöktürülmesi	42
3.5.4. Fosfoproteinlerin Saflaştırılması	42
3.5.5. PeppermintStick Fosfoprotein Markörü.....	45
3.5.6. SDS-PAGE Protein Jel Elektrofrezisi.....	46

3.5.7. Western Blotlama.....	47
3.6. Kullanılan Proteomiks Yöntemler	49
3.6.1. 2DE- Jel Elektroforezi.....	49
3.6.2. Fosfoproteinlerin ProQ Diamond ile Boyanması.....	50
3.6.3. Jel İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi (In-Gel Digestion).....	52
3.6.4. Peptit Örneklerinin MALDI TOF/TOF Analizi için Hazırlanması.....	52
3.6.5. MALDI TOF/TOF Analizi.....	53
3.6.6. Analizlerde Kullanılan Yazılımlar ve Veri Bankaları.....	53
4. BULGULAR	55
4.1. SH-SY5Y Hücre Hatlarından WT ve Mutant Parkin Ekspresyon Görüntülenmesi	55
4.2. WT Parkin İfadesi Sonrası Fosfoprotein Profilineki Değişiklikler	58
4.3. Mutant Parkin İfadesi Sonrası Fosfoprotein Profilineki Değişiklikler	63
4.4. Fosfoproteinlerin Zenginleştirilmesi ve 2D Analizi	68
4.5. WT ve Mutant Parkin İndüksiyonu Sonrası Artış Gözlenen Fosfoproteinlerin Yolak Analizleri için STRING Programının Kullanılması.	76
4.6. WT Parkin ve Mutant Parkin İfadesi Sonrası Tanımlanan Proteinlerin Arttırılmış Etkileşim Ağı Sonrası Yapılan PANTHER Analizi.	79
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	86
7. KAYNAKÇA	87
8. ÖZGEÇMİŞ.....	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AmBic	Amonyum bikarbonat
APS	Amonyum persülfat
ARJP	Otozomal resesif juvenil parkinsonizm
ATP	Adenizin trifosfat
BSA	Bovine serum albumin
DA	Dopamine
DAT	Dopamintransporter
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DAT	Dopamin aktif taşıyıcı
DTT	Dithiothreitol
DJ1	Protein deglikaz
EDTA	Etilen-diamin-tetraasidik asit
ER	Endoplazmik retikulum
FBS	Fetal sığır serumu
GTP	Guanozoin trifosfat
IAA	İyodaasetamid
IBR	In-between RING domain
Kda	Kilo Dalton
LC	Lewy cisimleri
MALDI-TOF/TOF	Matrix-assistedLaserDesorption/Ionization-time of flight/time of flight
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NA	Norepinefrin
NASP	Nüklear otoantijenik sperm protein

NFDM	Non-fat dry milk
OD	Otozomal dominant
OR	Otozomal resesif
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PARL	Mitokondriyal intramembran Protein
PARK2	E3 ubiquitin protein ligaz Parkin
PBS	Fosfat tuz tampon çözeltisi
PH	Parkinson hastalığı
PINK1	PTEN-induced kinaz 1 geni
PTM	Translasyon sonrası modifikasyon
PZR	Polymeraz zincir reaksiyonu
RBR	Ring between ring finger
RING1 ve RING2	Really interesting new gene domain
REP	Repressor element of Parkin
RNA	Ribonükleik asit
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SN	Substantia nigra
SNCA	Alfa-sinüklein geni
SNpc	Substantia nigra pars kompakta
TBS	Tris tuz tampon çözeltisi
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphine
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TK	Tirozin kinaz
TH	Tirozin hidroksilaz
Ub	Ubikuitin
UBL	Ubiquitin-like domain
UPD ve ya RING0	Unique Parkin domain
UPS	Ubikuitin proteozom sistemi

VMAT2

YT veya WT

α -SYN

Veziküler monoamin taşıyıcısı

Yabani tip

Alfa-sinüklein



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Translasyon sonrası modifikasyonlar, proteomik çeşitliliği artıran kilit mekanizmalardı	2
Çizim 1.2. Sistem Biyolojisi.....	3
Çizim 1.3. Substantia nigra'nın sağlıklı ve parkinson hastası olan bireyler arasında karşılaştırılması	8
Çizim 1.4. Nigrostriyal yolağın hücre gövdelerinin şematik görüntüsü	9
Çizim 1.5. Parkinson hastalığının premotor belirtileri ve risk faktörleri	12
Çizim 1.6. Parkinson hastalığının gelişimi için risk faktörleri epidemiyolojik araştırmaları	13
Çizim 1.7. Parkin proteininin mutasyona uğramış bölgeleri ve yapısal düzenlenmesi.....	20
Çizim 1.8. Reseptör tirozin kinaz aktivasyonu.....	23
Çizim 1.9. Serin, treonin ve tirozin amino asitlerinin fosforilasyonları	24
Çizim 3.1. Thoma lamının karelerinin içerisindeki boyanmış hücrelerin sayımı	36
Çizim 3.2. TRex-gen ekspresyon sistemi ve çalışma prensibi	37
Çizim 3.3. Gen ekspresyonunun durdurulması	38
Çizim 3.4. WT ve mutant SH-SY5Y hücre hatlarına indüksiyon yapıldıktan sonra Kaliulin A eklenmesi	40
Çizim 3.5. Fosfoprotein saflaştırma prosedürü	43
Çizim 3.6. Fosfoprotein saflaştırma kolonu her bir örnek için hazırlandı	45
Çizim 3.7. Örneklerin filtre edilmesi.....	45
Çizim 3.8. PeppermintStick fosfoprotein markörü	46

Çizim 4.1. WT ve mutant Parkin ekspresyon eden SH-SY5Y hücre hatlarının anti-Parkin antikoru ile WB analizleri	55
Çizim 4.2. Hücre kültüründen elde edilen proteinlerin fosforilasyon seviyesini görebilmek için SDS jeller ProQ Diamond fosfoprotein boyası ve bir de total protein boyası olan Sypro Ruby ile boyandı	56
Çizim 4.3. Yapılan ve iyi sonuç vermeyen ilk 2D jellere ait ProQ ve Sypro boyamaları....	57
Çizim 4.4. TCA-aseton çöktürmesi ile elde edilen proteinlerin 2D jel elektroforezi.....	58
Çizim 4.5. WT Tet indüksiyonu yapılmış (ind) ve yapılmamış (unind) hücrelerden elde edilen proteinlerin, ProQ ve Sypro boyaması yapılmış 2D jeller	59
Çizim 4.6. WT ind hücrelerinde ekspresyon seviyesinde artış gözlenen protein spotlarının ProQ ve Sypro boyamalarının yakın plan karşılaştırılmaları	60
Çizim 4.7. WT ind hücrelerinde tanımlanan spotların 2D jellerdeki konumları.....	62
Çizim 4.8. Mutant (AE) Tet indüksiyonu yapılmış (ind) ve yapılmamış (unind) hücrelerden elde edilen proteinleri, ProQ ve Sypro boyaması yapılmış 2D jeller	64
Çizim 4.9. Mutant ind hücrelerinde ekspresyon seviyesinde artış gözlenen protein spotlarının ProQ ve Sypro boyamalarının yakın plan karşılaştırılmaları	65
Çizim 4.10. Mutant ind hücrelerde tanımlanan spotların 2D jellerdeki konumları.....	67
Çizim 4.11. Fosfoprotein zenginleştirilmesi sonrası elde edilen fraksiyonlara ait 2D jellerin ProQ ve Sypro boyamaları	69
Çizim 4.12. Fosfoprotein zenginleştirme kolonu kullanılarak elde edilen fosfoproteinlerin tanımlama sonrası 2D jel üzerindeki konumları	74
Çizim 4.13. WT Parkin indüksiyonu sonrasında artmış bulunan 9 fosfoproteininin STRING analizi	77

Çizim 4.14. Mutant Parkin indüksiyonu sonrasında artmış bulunan 6 fosfoproteininin STRING analizi	78
--	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Parkinson hastalığının motor olan ve motor olmayan klinik belirtileri.....	6
Çizelge 1.2. Parkinson hastalığının genetiğinde rol oynayan genler ve kromozomal bölgeler	14
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan tampon çözeltileri ve hazırlanışları	30
Çizelge 3.2. SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları	46
Çizelge 3.3. Western Blot analizinde kullanılan primer (1°) ve sekonder (2°) antikorların listesi	49
Çizelge 3.4. Fosfoproteinlerin ProQ Diamond boyası ile boyanma prosedürü	50
Çizelge 3.5. Sypro Ruby ile boyama prosedürü	51
Çizelge 4.1. WT Parkin indüksiyonu sonrası elde edilen fosfoproteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları	61
Çizelge 4.2. WT Parkin indüksiyon sonrası tanımlanan fosfoproteinlerin Uniprot veri bankasına göre fosforilasyon yerleri.....	63
Çizelge 4.3. Mutant Parkin indüksiyonu sonrası elde edilen fosfoproteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları	66
Çizelge 4.4. Tanımlanan fosfoproteinlerin Uniprot veri bankasına göre fosforilasyon yerleri	68
Çizelge 4.5. Fosfoproteinlerin zenginleştirme kolonu kullanılarak elde edilen fosfoproteinlerin MALDI TOF/TOF analizi sonuçları.....	71
Çizelge 4.6. Zenginleştirme sonrası elde edilen fosfoproteinlerin Uniprot veri bankasına göre fosforilasyonların yerleri	74
Çizelge 4.7. WT Parkin indüksiyonu yapılan hücrelere ait PANTHER analizi tablosu	79

Çizelge 4.8. Mutant Parkin indüksiyonu yapılan hücrelere ait PANTHER analizi tablosu .80



1. GİRİŞ

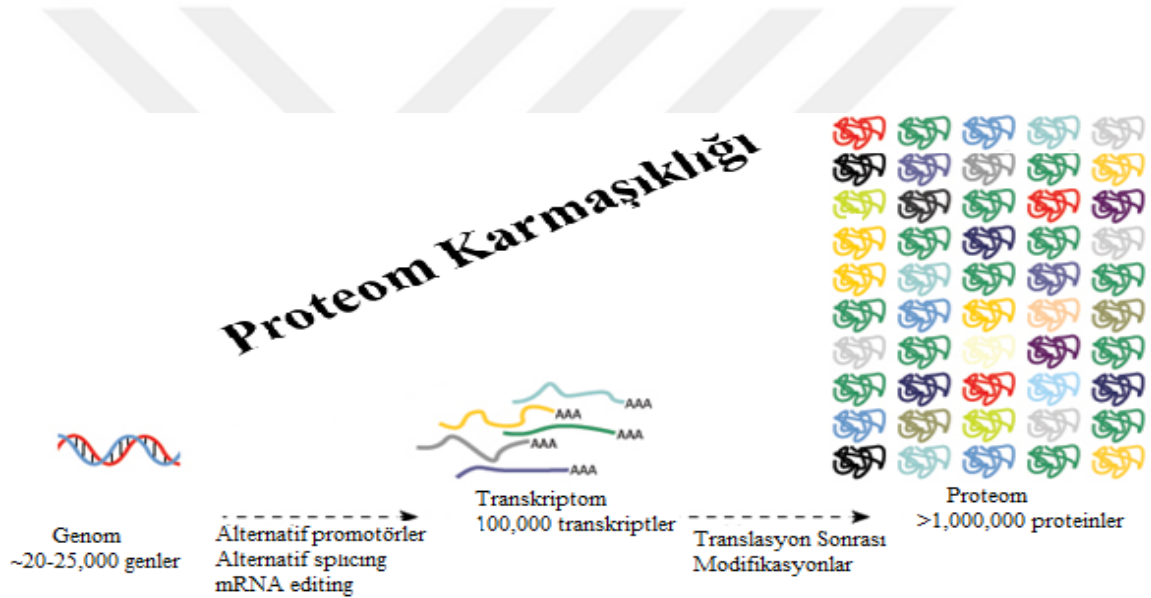
1.1 Protein Araştırmaları ve Proteomiks

Proteinlerin yapılarını, fonksiyonlarını ve birbirileri ile olan etkileşimlerini inceleyen araştırma alanına “proteomiks” denilmektedir (Anderson ve diğ. 1998). Proteomikse ilişkin araştırmaların tarihi protein çalışmaları ile başlamış olmasına rağmen, metod olarak kökenleri 1975’li yıllara uzanmaktadır (Chem 1975). Kelime kökeni olarak ele alındığında genomiks, proteomiks gibi terimlerin sonuna eklenen “omik” eki Yunanca’dan “ome” ekinden gelerek tümlük, bütünlük anlamı kazandırmaktadır. Bu nedenle “genom” bir hücre ya da canlıya ait tüm genleri, “proteom” da tüm proteinleri ifade ettiği söylenilebilir. “Proteom” terimi ise ilk defa 1994 yılında, Avusturalyalı biliminsanı Dr. Marc R. Wilkins tarafından, doktora tezinde “belirli bir genomun sentezlemiş olduğu bütün proteinleri” ifade etmek amacıyla kullanılmıştır (Wasinger ve diğ. 1995). Genom araştırmaları, özellikle de “İnsan Genom Projesi”nin tamamlanması ile genlerin yapı, fonksiyon ve ekspresyonlarına ait ayrıntılı bilgilerin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Genom Projesinin bitmesi ile "post-genomik çağa" geçilmiş ve artık diğer -omiks'ler üzerinde daha geniş ölçüde durulmaya başlanmıştır. Bu alanların da başında hücrelerin asıl fonksiyonel yapıları olan proteinlere odaklanılan "proteomiks" gelmektedir. Bir organizmanın proteomu; dokudan dokuya hatta bir hücreden diğer bir hücreye çevresel faktörler, yaş, cinsiyet, hastalıklar ve fizyolojik durumlar (hücre siklusu, apoptoz gibi) gibi iç ve dış onlarca faktör ile etkileşerek sürekli değişim halindedir (Akpınar ve diğ. 2011).

Proteomiks; yeni proteinlerin tanımlanması, fonksiyonları, ekspresyon seviyeleri, hücresel lokalizasyonları, translasyon sonrası modifikasyonları (PTM), üç boyutlu yapıları ve diğer proteinlerle olan ilişkilerinin ortaya çıkarılması konuları ile ilgilenmektedir. Proteomiks çalışmalarının bir diğer amacı da; hücresel yollarda yer alan proteinlerin belirlenmesi ve bu yolların daha iyi anlaşılacak birbirleri ile olan etkileşimlerinin ortaya çıkarılmasıdır.

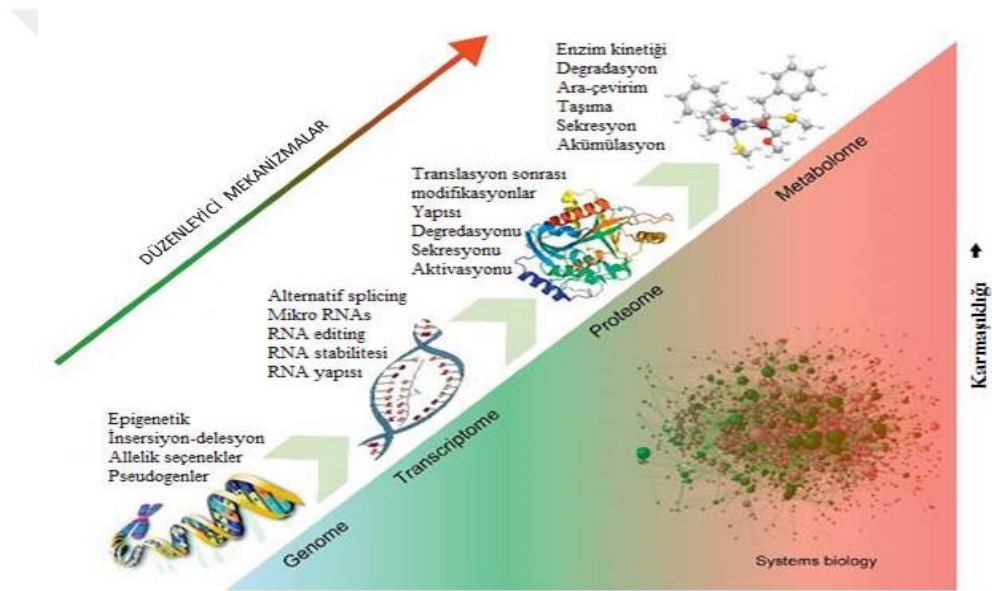
Proteomik analizler klinik tanı, hastalıklara özgü biyolojik belirteçlerin bulunması, strese, yaşlanmaya, ilaçlara karşı verilen cevaplarda ve hastalık durumlarında değişen protein profillerinin belirlenmesi ve yeni ilaçların dizayn edilmesi ile de kendisine yeni

uygulama ve araştırma alanları bulmaktadır. Proteomik çalışmaları sayesinde diagnostik ve prognostik biyobelirteçlerin geliştirilmesi, yeni teröpatik hedeflerin bulunması ve kişiye özel tedavilerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Davidson ve diğ. 2005). Kütle spektrometresi (MS), sıvı kromatografisi MS (LC/MS), protein mikroyarray teknolojisi ve diğer protein profillemeye yöntemlerindeki hızlı ilerlemeler sayesinde hastalıklara özgü biyolojik belirteçlerin belirlenmesinde önemli gelişmeler görülmektedir (Khalilpour ve diğ. 2016). DNA çalışmaları ile kıyaslandığında, proteinler ile çalışmak çok daha zordur. İnsan genomunda en son verilere göre yaklaşık 20.000–25.000 protein kodlayıcı gen bulunmaktadır (Perteve ve diğ. 2010), bununla birlikte bir insan hücresinde ortalama olarak 300.000 ile 500.000 arasında protein vardır, bu sayıya posttranslasyonel modifikasyonları da eklediğimizde sayı çok daha karmaşık hale gelmektedir (Cong ve diğ. 2002) (Çizim1.1).



Çizim 1.1. Translasyon sonrası modifikasyonlar, proteomik çeşitliliğini arttıran kilit mekanizmalardır. Genom 20.000-25.000 gen içeriyor olsa da proteomun 1 milyondan fazla proteini kapsadığı tahmin edilmektedir. Transkripsiyonel ve mRNA düzeylerindeki değişiklikler, transkriptomun genoma oranla artmasına neden olmaktadır. Bununla beraber sayısız farklı translasyon sonrası modifikasyonlar da proteomun, transkriptoma ve genoma oranla katlanarak artmasına neden olmaktadır.

Hücrenin işlevi ile ilgili yapılan araştırmalar göz önüne alındığında, proteomik çalışmalar genomik çalışmalara göre daha avantajlıdır. Çünkü proteinler hücredeki işleyişlerden bizzat sorumlu fonksiyonel moleküllerdir. Ayrıca PTM, RNA editing gibi regülasyonlar genom çalışmalarında belirlenemez, fonksiyonu çok etkileyen bu değişimler ve fonksiyonel genomik çalışmaları olarak sınıflandırılırken; proteomik çalışmaları ise sadece proteomik yaklaşımlar kullanılarak ortaya çıkarılabilir. Genomik çalışmalar yapısal, fonksiyonel ve ekspresyona bağlı proteomik çalışmaları ile sınırlanırken; proteomik çalışmaları yapısal, fonksiyonel ve ekspresyona bağlı yaklaşımlar sunarak genomik çalışmalara oranla hücresel işlev hakkında daha aydınlatıcı bilgiler sunabilmektedir (Baak ve diğ. 2003; Chung ve diğ. 2007; Aslam ve diğ. 2017) (Çizim 1.2.).



Çizim 1.2. Sistem Biyolojisi. Sistem biyolojisi; hastalıklarda meydana gelen biyolojik süreçleri ve patolojik değişiklikleri bütünsel bir biçimde ortaya koymak için farklı moleküler yapılar arasındaki etkileşimleri analiz etmeye çalışmaktadır. DNA seviyesindeki düzenleyici prosesler; RNA'lar, proteinler ve metabolitler de dahil olmak üzere moleküllerin ekspresyon seviyesini etkilemektedir. Bu düzenleyiciler, farklı düzenleyici mekanizmalara ilave olarak etki etmektedir (Barallobre-Barreiro ve diğ. 2013).

1.2 Fosfoproteomiks Çalışmaları

Proteinlere bir veya birden fazla fosfat grubu eklenmesi olayına fosforilasyon, eklenen fosfat moleküllerinin uzaklaştırılmasına da defosforilasyon ismi verilmektedir. Fosfoproteomiks ise; proteomiks'in bir alt sahası olmakla beraber, proteinlerin translasyonu sonrası fosforile olmuş proteinlerin araştırılmasını konu edinmektedir. Fosforilasyon proteinlerde gözlenen en yaygın geri dönüşümlü PTM'dir (Martin ve diğ. 2001) ve hücrel sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynayan en önemli mekanizmlardan biridir. Ökaryotlarda özellikle protein fosforilasyonu serin (S), treonin (T) ve tirozin (Y) amino asitleri üzerinden olmaktadır. Bu amino asitler üzerinden fosforile olan proteinler hücrel total proteinlerin %30'unu teşkil etmektedir (Martin 2001). Prokaryotlarda ise fosforilasyon ökaryotlardan farklı olarak histidin (H), lizin (K) ve arjin (A) amino asitleri üzerinden olmaktadır (Cozzon. 1988; Stock ve diğ. 1989). Proteinlerin fosforilasyonu, kinaz enzimleri tarafından gerçekleştirilen fosfat grubunun eklendiği bir reaksiyon (Ford ve diğ. 2007) iken defosforilasyon fosfatazlar tarafından gerçekleştirilen proteinlerden fosfat gruplarını uzaklaştırıldığı bir reaksiyondur. Kinazlar ve fosfatazlar birbirlerinin fonksiyonlarının tersini yaparak hücrel olaylarda dengeleyici rol oynarlar. Fosforilasyon ve defosforilasyon sonucu çoğu enzim ve reseptörün yapısında (konformasyon) değişim olur, bu değişimler enzim veya reseptörün hücrel fonksiyonunu dolayısıyla hücrenin kaderini etkilerler. İnsan genomunda şimdiye kadar belirlenmiş 518 protein kinaz (Manning ve diğ. 2002) ve 150 protein fosfataz (Cohen. 2002) olup, bu genlerin ürünleri sayesinde fosforilasyon-defosforilasyon işlemleri düzenlenmektedir. Proteinlerin fosforillenme seviyelerindeki değişimler ile proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz gibi pek çok hücrel biyolojik süreç kontrol edilebilmektedir. Gerçekleştirilen ekspresyon çalışmaları ile hangi protein ve yolların fosforilasyon sonucunda aktive olabileceği ve hangi fosforile proteinlerin potansiyel olarak yeni ilaçlar açısından hedef olarak kullanılabileceği anlaşılabilmektedir (Lim 2005). Kompleks hastalıklar birden fazla genden ve dolayısıyla da proteinlerden kaynaklanmaktadır. Kompleks hastalıkların birden fazla proteinin farklı seviyelerdeki fosforilasyon düzeylerinden etkilenmesi bu hastalıkların gelişimini ve şiddetini etkileyen çok çeşitli biyolojik süreçlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Liu 2013).

Fosfoproteomiks deneylerinde ortaya çıkan fosforilasyon bağımlı sinyal iletişim ağlarının, çeşitli hastalıklarla ilişkili olması fosforilasyonun hücrel önemini arttırmaktadır. Bu nedenle stabil fosfat değişimlerinin tanımlanmasının, hastalıkların erken teşhisi ve etkili tedavisi için önemli olduğu düşünülmektedir (İliuk ve diğ. 2013). İlaçlar ile ilgili genom analizlerine bakıldığında kinazların tüm olası ilaç hedeflerinin yaklaşık %20'sini kapsadığı öne sürülmüştür (Hopkins ve diğ. 2002; Russ ve diğ. 2005). Aslında bazı kinaz inhibitörleri kanser tedavisinde yararlı ilaçlar olarak kabul edilse de; bir takım serin/treonin kinazlar ve tirozin kinazlar da (TK) riskli hedef olarak gösterilmektedir (Hsu ve diğ. 2011; Klammer ve diğ. 2012). Bunun için de hastalık veya ilaç uygulaması üzerindeki ilk yaklaşım, kinaz aktivitesinin dinamikliğini izlemektir (Lapenna ve diğ. 2009; Solit ve diğ. 2010). Fosfoproteomiksin fosfoproteinlerin tipleri ve sayıları ile ilgili bilgileri arttırabilmesinin yanı sıra fosfoproteom çalışmalarının en büyük amacı; sinyal yollarına dayalı tüm fosforilasyon analizlerinin hızlı bir şekilde yapılabilmesidir.

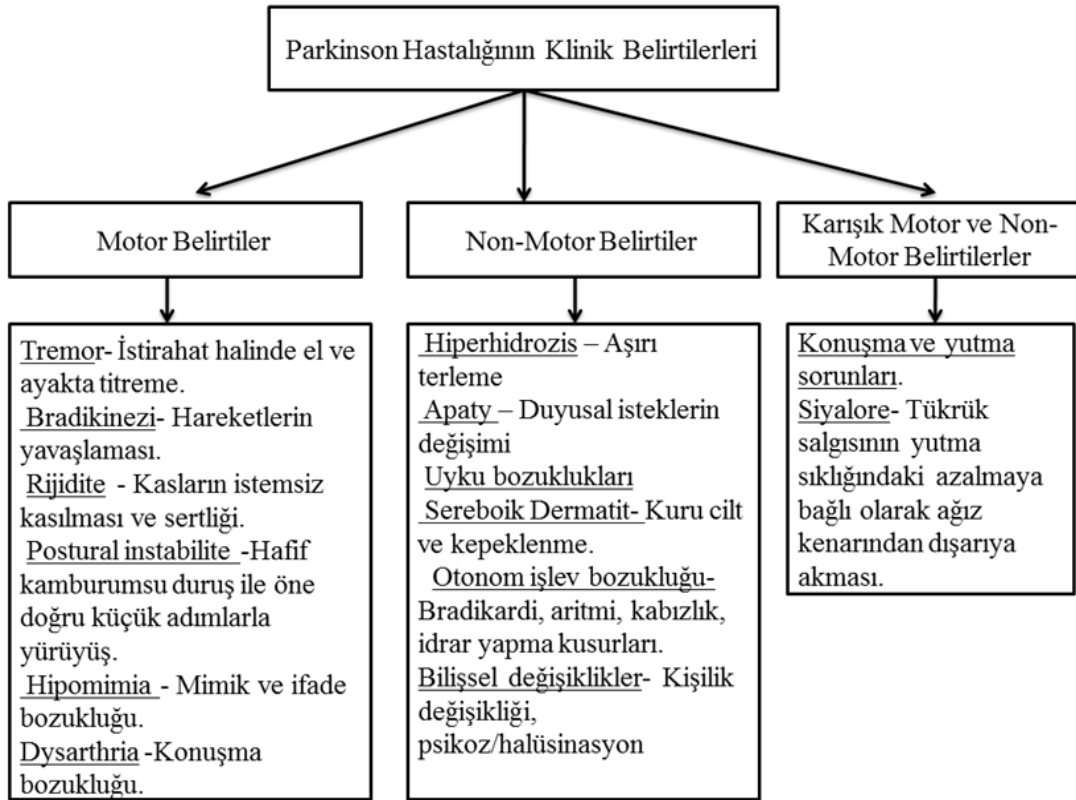
1.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH) ilk kez 1817 yılında James Parkinson'un yazdığı 'An assay on the Shaking Plasy' adlı makalesinde tanımlanmıştır (Wirdefeldt ve diğ. 2011). Hastalığa, onu tanımlayan J. Parkinson'un ismi verilmiştir (McCall 2009). PH titremeli felç olarak adlandırılmış ve duyu ile idrak kabiliyetlerinde hasar görülmediği halde, kas gücünün azalması, vücudun hareket halinde olamayan kısımlarında meydana gelen istemsiz titreme, gövdenin öne doğru bükülmesi ve kısa sürede yürüyüş hızındaki artış PH'nın belirleyici semptomlarıdır. Hastalığın doğal seyri sürecinde oluşan diğer önemli semptomlar; ayakta durma dengesinin bozulması (postural instabilite), hareketin olmayışı (akinesia), hareketlerde yavaşlama (brady kinesia), kas sertliği (rigidite) ve istirahat tremorudur. Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (Goetz 2011). Dünyada 10 milyon insan bu hastalıkla mücadele etmekte ve her yıl binlerce insan bu hastalığa yakalanmaktadır. (Delenclos ve diğ. 2016). PH genellikle 50-60 yaşlarında başlayan yavaş seyirli, kronik bir hastalıktır. Hastalık kendisini 20 yaşından önce gösterirse "Primer juvenil parkinsonizm", 20-40 yaşları arasında başlarsa genç başlangıçlı (early onset) parkinsonizm olarak adlandırılır.

Görölme sıklığı kadınlara oranla erkeklerde (E/K: 3/2) biraz daha fazladır (Rijk ve diğ. 2000; Foltynie ve diğ. 2004; Poorkaj ve diğ. 2004).

PH'nın belirtileri; Motor Belirtiler, Non-motor Belirtiler ve Karışık Motor/Non-motor Belirtiler olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırılabilir (Dewey 2000; Dewey 2003; Naidu ve diğ. 2008; Rana ve diğ. 2001; Kalia ve diğ. 2015) (Çizelge 1.3). Önceleri PH'ı motor sistem hastalığı olarak bilinse de, son dönemlerde PH motor ve nonmotor pateni ile çok daha kompleks bir sendrom olarak kabul edilmiştir. PH'nın bu kadar zengin ve değişik semptomlar göstermesi, hastalığın erken döneminde tanı ve tedavisinin gecikmesine neden olmaktadır (Rinne 1989).

Çizelge 1.1 Parkinson hastalığının motor olan ve motor olmayan klinik belirtileri.

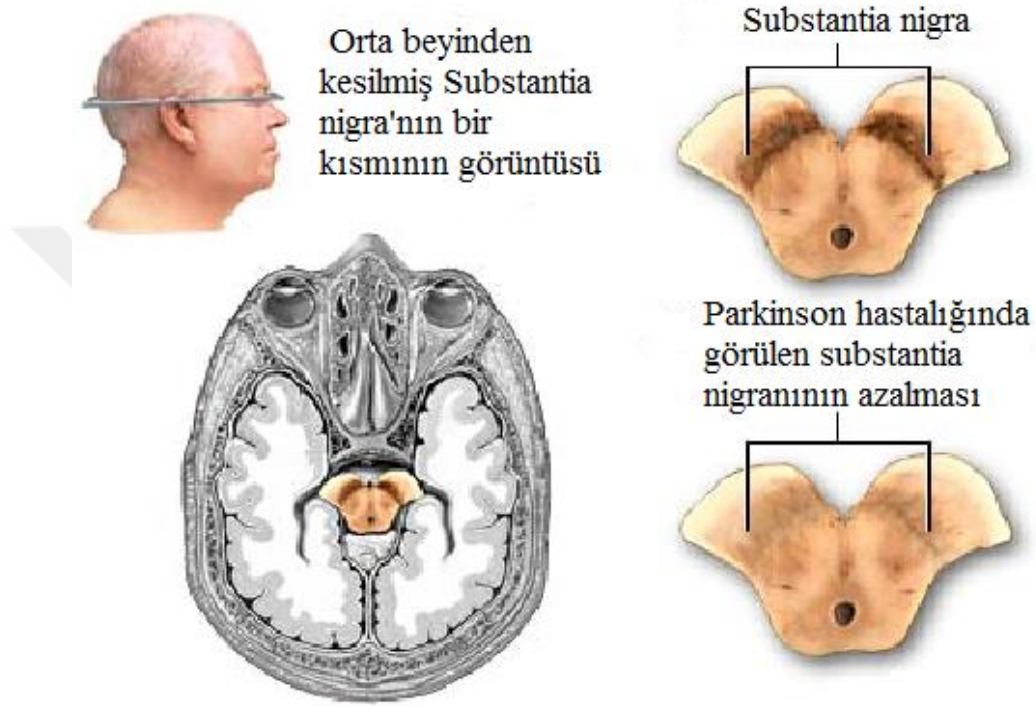


1.3.1. Parkinson Hastalığının Patolojisi

PH'nın patolojisi özellikle 'beyin sapı' beyinin alt kısmında bulunan substansiya nigra pars kompartmanındaki (SNpC) nöronların kaybı olarak kendini göstermektedir (Cookson 2005) (Çizim 1.3). Memeli beyinlerinde 'nörotransmitter' olarak kullanılan dopamini (DO) 1950 yılında Arvid Carlson bulmuştur (Carlsson 1958). Arvid Carlson beyindeki dopaminin %80'inin bazal gangliyanın içerisinde bulunduğunu göstermiştir. Daha sonra, Oleh Hornykiewicz farklı hastalar ile PH beyinleri arasındaki dopaminin farkını striatumdan daha da çok putamende bulmuştur. 1960'da Ehringer ve Hornykiewicz SN'daki nöron kaybının ve dopamin eksikliğinin PH oluşumundaki etkisinin farkına varmışlardır (Polymeropoulos ve diğ. 1997). Aynı yılda da PH'na karşı tedavide dopamin öncüsü olan 'levo-dopa' (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) kullanılmaya başlanılmıştır. PH tedavisinde kullanılan ilaçlar bugüne kadar dopaminerjik nöron dejenerasyonunu engelleme ya da yavaşlatma yönünde etkili olamayıp, yalnızca semptomları hafifletmektedir (Vidailhet ve diğ. 1999). PH'na neden olan mutasyonlardan farkedilen ve ilk keşfedilen gen olan SNCA (Alfa-sinüklein geni, Alpha-synuclein), birçok araştırmacı tarafından hastalığın etiyolojisinde en önemli unsur olarak kabul edilen α -sinüklein proteinini kodlayan gendir. SNCA genindeki Ala53Thr mutasyonunun kalıtsal PH'na sebep olduğu bilinmektedir (Polymeropoulos ve diğ. 1997). Bugüne kadar kalıtsal formda PH'na sebep olan 18 bölge belirlenmiştir (Kumar ve diğ. 2011).

PH'nın patolojik olarak tanısı otopsi sonrası alınan beyin dokularındaki hücre ölümünden kaynaklı depigmentasyon ve Lewy cisimcikleri (LC)'nin bulunması ile yapılmaktadır. LC'leri ilk olarak Heinrich Lewy tarafından 1929'da substantia inominata nöronlarında rapor edilmiştir. Daha sonra Treiakov tarafından SNpC nöronlarında çökelti oluşumları tanımlanarak LC adı verilmiştir. LC, alfa-sinüklein (α -SYN) ve ubikuitin pozitif protein ve lipid çökeltileri olarak tanımlanan intrasitoplazmik çökeltilerdir (Elibol 2008; Engelder 2008). LC yapısında α -SYN, ubikuitin ve şimdiye kadar belirlenmiş yaklaşık 80 protein bilinmektedir (Licker ve diğ. 2009). LC'nin en önemli komponentinin α -SYN olduğu bilinmesine rağmen, agregasyonun moleküler mekanizması, biyolojik rolü ve PH patolojisine etkisi halen belirsizdir. LC'leri SNpC'daki nöronların sitoplazmalarında olduğu gibi kortekste non-dopaminerjik nöronlarda da bulunabilen, merkezi bir çekirdek

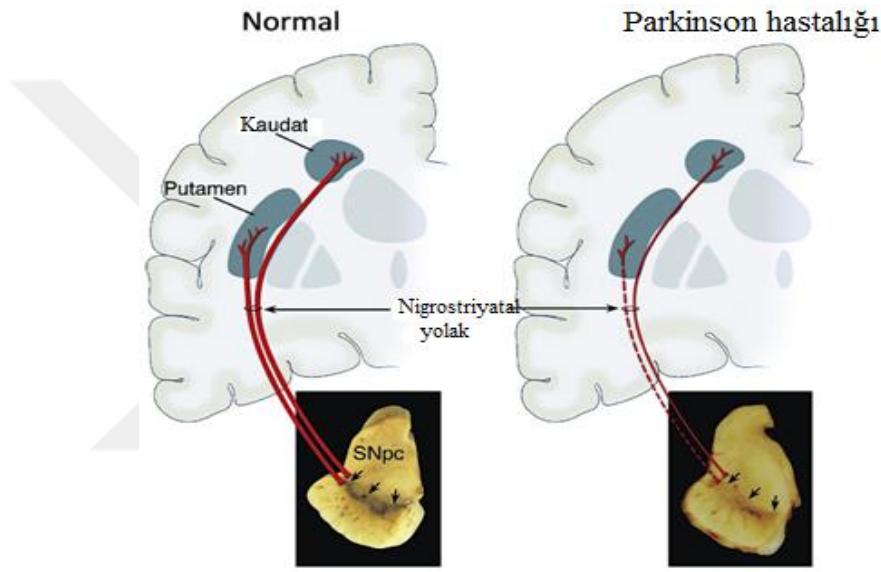
ve bir merkezden yayılan filamentlerden oluşan yuvarlak proteinöz yapılardır. Normal bir kişinin orta beyni ile PH'ı olan bir hastanın orta beyni karşılaştırıldığında; PH'ının Substantia Nigra'sında azalmış pigmentasyon görülmektedir. Gözlenen belirgin depigmentasyon solukluk, SNpC'daki nöromelanin içeren kompaktadaki nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların kaybindan kaynaklanmaktadır (Joseph ve diğ. 2015) (Çizim 1.3).



Çizim 1.3. Substantia nigra'nın sağlıklı ve Parkinson hastası olan bireyler arasında karşılaştırılması (Joseph ve diğ. 2015).

Dopamin, DOPA'nın dekarboksilasyonu yoluyla beynin en üst lobundaki SNpC'de ve adrenal bezlerde üretilen, katekolamin ailesinin elektroaktif bir nörotransmitteridir. Beyindeki sinir hücrelerinde sinyal taşınmasından sorumludur. Dopamin az sayıda hücre tarafından üretilmektedir. Bu hücrelere örnek olarak uyarıldıklarında dopamin salınımı yapan dopaminerjik nöronlar (DN) verilebilir (Sharma ve diğ. 2005; Kalia ve diğ. 2015). Dopamin, striatuma etki ederek motor hareketlerin uyarılmasında ve koordinasyonunda rol oynar. PH'da ise SNpC'daki DA üreten nöronların kaybı sonucunda korteksin motor hareketleri düzenleme kapasitesi azalmaktadır (Kidd 2000). Çizim 1.4'te gösterildiği gibi

normal nigrostriatal yolağın hücre gövdeleri SNpC’de bulunan dopaminerjik nöronları içermektedir. Bu nöronların uzantıları bazal gangliya ulaşarak, striatumda (putamen ve kaudat) sinapslar oluşturmaktadır. SNpC bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronlarda yani putamen ve kaudatdaki nöromelaninden kaynaklanan normal pigmentasyon görülmektedir. Nöromelanin siyah kahve rengimsi bir pigmentdir (Fedorow ve diğ. 2005). Fakat PH’da ise; SNpC ile putamen (kesik çizgi) ve kaudat (ince çizgi) arasındaki nigrostriatal yolak dejenere olmaktadır. Böylelikle SNpC’deki dopaminerjik nöronların kaybından kaynaklanan pigment azalması görülmüştür (Dauer ve diğ. 2003; Fahn ve diğ. 2004).



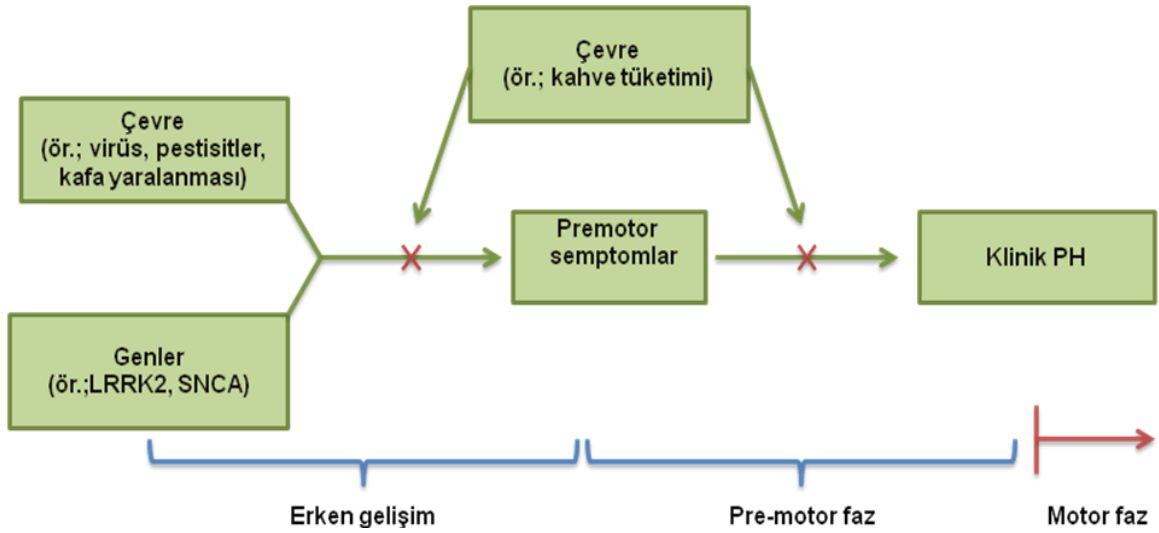
Çizim 1.4. Nigrostriyal yolağın hücre gövdelerinin şematik görüntüsü (Dauer ve diğ. 2003).

PH’da nöronal hasarın yüksek korteks yapılarına ulaşmadan önce periferik sinirlerden beyin sapına ve orta beyine yayılım gösteren ve artan bir düzende ortaya çıktığı varsayılmıştır. PH’nın patolojik olarak klasik tanısı; otopsi sonrası alınan beyin dokularında LC bulunmasıdır. Her ne kadar LC’lerin içeriği kesin olarak bilinmese de, α -sinüklein, genetik ve sporadik olarak PH’da mevcut olan LC’lerinin ana bileşenlerinden biridir. PH’daki nöronal dejenerasyonun nedeni içinde α -SYN’in nöronal birikimi gösterilmektedir (Singleton ve diğ. 2016). α -SYN, insan beyninde bol miktarda bulunan bir proteindir. Kalp, kas ve diğer dokularda daha küçük miktarlarda bulunmaktadır. Beyinde,

esas olarak nöron aksonlarında bulunarak presinaptik terminal yapılarını oluşturmaktadır. Bu yapılar da fosfolipid ve proteinlerle etkileşime girmektedirler. Presinaptik terminaller, sinaptik veziküllerden nörotransmitterleri bırakır ve nörotransmitterlerin salınımı nöronlar arasındaki sinyalleşme ve normal beyin fonksiyonu için önemlidir (Xia ve diğ. 2002). α -SYN proteininin, Tirozin Hidroksilaz (TH), Dopamin Aktif Taşıyıcısı (DAT) ve Veziküler Monoamin Taşıyıcısı (VMAT2) gibi sinir terminallerindeki dopamin içeriğinden sorumlu temel proteinlerle doğrudan etkileşerek dopamin metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir. Bundan dolayı; α -SYN patolojisi dopamin metabolizmasının bozulması ile ilişkilidir ve nöron ölümüne sebep olmaktadır (Caviness ve diğ. 2002). PH'nın bir proteinopati hastalığı olduğu yani bir proteinin yanlış katlanması sonucunda oluşan bir hastalık olduğu bilinmektedir (Robinson.,2008). PH gibi diğer nörodejeneratif hastalıklar da proteinlerin yanlış katlanması ya da ekstraselüler oluşum ile karakterize edilebilmektedir (Kasap ve diğ. 2017). α -SYN proteinini kodlayan SNCA geninin PH üzerindeki etkisi tam olarak belli değildir. α -SYN'nin çözünebilir agregatlarının, PH'den etkilenen nöronlar ve LC'leri üzerinde toksik etkisinin olup olmadığı uzun zamandır tartışma konusudur. Bu etkilerin iki şekilde olabileceği düşünülmektedir: (1) LC'lerin toksik agregat biçimleri tarafından, (2) LC ve aksonlarının direkt olarak nöronal hücre ölümüne yol açmasına bağlı olarak (Lill ve diğ. 2011). Buna ek olarak Braak ve arkadaşları tarafından beyindeki α -SYN patolojisinin yayılımı ile ilgili iki ana temel hipotez ileri sürülmüştür (Braak ve diğ. 2003). Bunlardan daha eski olanı “seçici hassasiyet hipotezi”; daha yeni olanı ise “patojenik yayılmış hipotezi”dir. İlk hipoteze göre; α -SYN özellikle olumsuz bir etkiye duyarlı nöronların bir alt kümesinde toplanarak, sonrasında az duyarlı hücre formları oluşturmaktadır. Bu modelde patolojinin komşu nöronlara yayılmasına metabolik faktörler ya da çevreleyen patojenik süreçler aracılık etmektedir. Buna karşın, patojen yayılım hipotezi, bir nöronda üretilen anormal α -SYN proteinleri ya da agregatlarının trans-sinaptik olarak komşu bir nörona aktarılması sonucu “prion-protein-benzeri” olarak tanımlanan bir biçimde bağlanmış beyin bölgelerine yayılım gösterdiğini varsaymaktadır (Brettschneider ve diğ. 2015; Walsh ve diğ. 2016). Katlanan veya aşırı üretilen α -SYN proteinleri agregat halinde kümelenerek beynin belirli bölgelerinde nöronal fonksiyonları bozabilmektedir. Kümelenen α -SYN toksik seviyede birikip nöronların ölmesine ve dopamin regülasyonunun bozulmasına sebep olabilmektedir (Spira ve diğ.

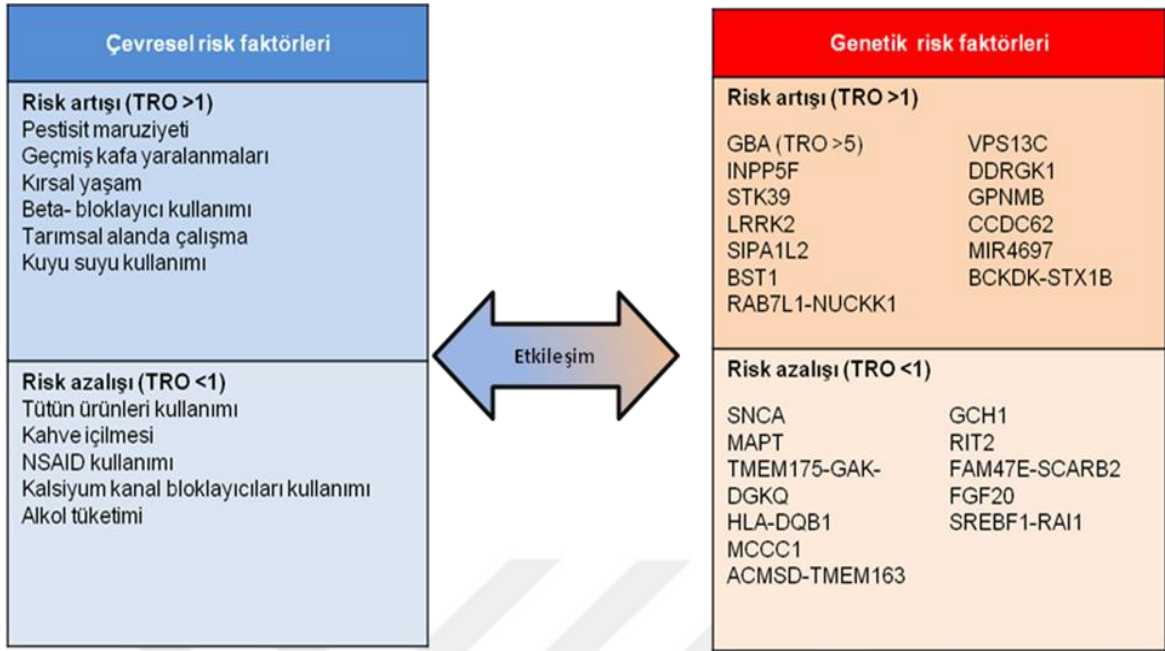
2001). Yanlış katlanan veya aşırı miktarda üretilen α -sinüklein, şüpheli veya gereksiz gördüğü proteinleri kaldırarak, dopamin üreten nöron hücrelerini birbirine yapıştırıp onların işlevlerini bozmaktadır. Sonuçta; PH'nın belirtileri ortaya çıkmaktadır. Nöron hücrelerin kaybı, beyin ve kas arasındaki iletişimi zayıflatmaktadır. En sonunda, hareket mekanizması kontrol edilemez hale gelmektedir (Saucedo-Cardenas ve diğ. 1998). Yanlış katlanmış α -SYN proteini, PH olan kişilerin beynindeki bazı nöronlarda LC'lerinin önemli bir bileşeni olarak bulunmaktadır. LC'leri PH'da nöronların ölümünde rol oynamaktadır (Gwinn-Hardy ve diğ. 2000; Lill ve diğ. 2011). PH vakalarının çoğunluğu idiyopatik olmasına rağmen hastalığın küçük bir yüzdesi genetik olarak kalıtsal mutasyonlarla ve ailesellik ile ilişkilidir (Dawson ve diğ. 2003; Schapira 2008). PH'nın büyük bir çoğunluğunu oluşturan sporadik (kişiye özel) formu ise hem çevresel hem de genetik faktörlerin etkilendiği düşünülen kompleks bir hastalıktır (Gasser 2007). Diğer bazı nörolojik hastalıklarda da PH hastalığına benzer semptomların ve LC'lerinin birikiminin olduğu görülmektedir (Lewy Body Dementia Association: <http://www.lewybodydementia.org/>). Buna dayanarak yalnız LC'lerinin varlığının direkt PH tanısında kullanılması doğru değildir. Bu hastalığın belirtisini tek bir neden üzerinden değerlendirmek yanlış olur; çünkü hastalığın belirtilerinin %70'den fazlası, dopaminerjik nöronların ölümü beyinde tamamlandıktan sonra hastalığın başlangıcından bir süre sonra ortaya çıkmaktadır.

Çevresel faktör: PH'nın gelişimi tek bir faktöre bağlı olarak ilerlememektedir. Premotor semptomlar üzerine yapılan araştırmaların PH etiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yol açabileceği görülmüştür. Premotor semptomların, PH'dan önce ara fenotipleri temsil etmesi, PH gelişiminin erken evrelerinde genetiğin ve çevrenin rollerini anlamamıza yardımcı olabilmektedir. Örneğin, nörotoksikantlar veya virüsler, burun boşluğundan veya sindirim sisteminden vücuda girebilir (Hawkes ve diğ. 2007) ve duyarlı kişilerde, koku alma ampulü veya enterik sinirlerde Lewy patolojisini başlatabilirler (Doty 2008; Hawkes ve diğ. 2009; Reichmann. 2011). Zamanla bu, hiposmi veya kabızlık gibi premotor semptomlara yol açar ve sonunda PH ilerleyebilir. Bu nedenle, çoklu premotor semptomların varlığı ile ilişkili çevresel ve genetik faktörleri saptamak ve daha da önemlisi, premotor semptomların klinik PH'nın ilerlemesini engelleyebilecek faktörleri tanımlamak önemlidir (Çizim 1.5).



Çizim 1.5. PH'nın premotor belirtileri ve risk faktörleri. Çevresel veya genetik faktörler, nöroinflamasyon gibi mekanizmalar yoluyla nörodejenerasyon başlatabilmektedir. Duyarlı kişilerde, bu ilk olarak PH klinik başlangıcından yıllarca önce premotor semptomlara neden olabilmektedir. Eğer bu nörodejenerasyon etkili bir müdahale olmadan devam ederse, premotor semptomlar sonunda açık PH'na dönüşebilir; Bununla birlikte, kahve içmek gibi müdahalelerle, bu premotor ilerleme, geri döndürülemez hale gelmeden durdurulabilir (Chen ve diğ. 2013).

Bilim adamları genellikle PH'nın genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonu sonucu ortaya çıktığını kabul etmektedirler. Genlerin ve çevresel faktörlerin ilişkisinin oldukça karmaşık olduğu bilinmektedir. Pestisit, herbisit ve insektisitlerin (çoğunlukla toksinler) PH için çevresel risk faktörleri olduğu bilinmektedir (Goldman 2013) (Çizim 1.6). Örneğin, sentetik olarak üretilen ve pestisitlere yapısal olarak benzeyen 1-metil-4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) bileşiğinin bazı organik çözücülere maruz kalması sonucu PH gelişebileceği ve eroin bağımlılarında parkinsonizme neden olan bir ajan olabileceği doğrulanmaktadır (Greggio ve diğ. 2007). Fakat MPTP toksinine bağlı parkinsonizmin çarpıcı özelliği; daha yaygın santral sinir sistemi harabiyeti yapması beklenirken, tamamen PH'nın anatomik ve klinik özelliklerini göstermesidir (Przedborski ve diğ. 1998). PH'da risk faktörü olabileceği düşünülen diğer faktörler; ekzojen nörotoksinler, karbonmonoksit, karbondisülfid, hidrojen sülfid, eser elementler, siyanid, vernik incelticileri, organik solventler ve nitrik oksitlerdir (Adler ve diğ. 2000).



*TRO-Tahmini risk oranı

Çizim 1.6. PH'nın gelişimi için risk faktörleri Epidemiyolojik araştırmaların sonuçları, PH'nın gelişme riskini arttıran (TRO> 1) veya azaltan (TRO <1) çeşitli çevresel ortama maruz kalmaları ile ortaya çıkarmıştır (solda). Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının bulguları, belirli genlerdeki polimorfizmlerin (sağda) Parkinson hastalığının gelişimi için risk oluşturan genetik risk faktörlerini tanımlamaktadır. En güçlü genetik risk faktörü, 5'in üzerinde bir TRO ile ilişkili olan β -glukoserebrosidaz'ın Asn370Ser mutasyonudur. Çevresel ve genetik risk faktörleri arasındaki karşılıklı etkileşim üzerinde çalışılmaktadır (Kalia ve diğ. 2015).

Genetik faktör: PH'larının %85'i sporadik olmakla birlikte, %15'i ailesellik göstermektedir ve bunun da %5'lik kısmı Mendel tipi kalıtım göstermektedir (Cordato ve diğ. 2004). Çizelge 1.2'de bu güne kadar PH'da tanımlanmış en az 23 farklı genin hastalık ile olan ilişkisi gösterilmektedir (Polymeropoulos ve diğ. 1997; Popescu ve diğ. 2016).

Çizelge 1.2. Parkinson hastalığının genetiğinde rol oynayan genler ve kromozomal bölgeleri. OD-otozomal dominant, OR-otozomal resesif.

Lokus	Kalıtım Şekli	Gen	Protein Fonksiyonu	Tanısı	Kromozomal bölge	Kaynak
PARK1	OD	α -sinüklein	Sinaptik	Genç başlangıçlı Parkinsonizm	4q21-q23	Polymeropoulos ve diğ. 1997
PARK2	OR	Park2	E3 Ligaz	Genç başlangıçlı Parkinsonizm	6q25.2-q27	Kitada ve diğ. 1998
PARK3	OD	Bilinmiyor		Geç başlangıçlı Parkinsonizm	2p13	Gasser ve diğ. 1998
PARK4	OD	Park4		Genç başlangıçlı Parkinsonizm	4p15	Liu ve diğ. 2002
PARK5	OD	UHCL	Ubikuitin hidrolaz/ligaz	Geç başlangıçlı Parkinsonizm	4p14	Liu ve diğ. 2002
PARK6	OR	PINK1	Protein Kinaz	Genç başlangıçlı Parkinsonizm	1p35-p36	Tang ve diğ.,2006
PARK7	OR	DJ-1	Oksidatif strese cevap	Genç başlangıçlı Parkinsonizm	1p36	Tang ve diğ. 2006
PARK8	OD	LRRK2	Protein Kinaz	Geç başlangıçlı Parkinsonizm	12q12	Dachsel ve diğ. 2010
PARK9	OR	ATP13A2	Hücrelerarası katyon homestazını ve nöronların bütünlüğünü sağlamak	Kufor-Rakeb sendromu; Demanslı atipik PH	1p36	Santoro ve diğ. 2011
PARK10				Geç başlangıçlı Parkinsonizm	1p32	Hicks ve diğ. 2002; Wan ve diğ. 2014
PARK11	OD	GIGYF2		Genç başlangıçlı Parkinsonizm	2q36-q37	Giovannone ve diğ. 2003; Lautier ve diğ. 2008
PARK12	Risk Faktör			Geç başlangıçlı Parkinsonizm	Xq21-q25	Pankratz ve diğ. 2003
PARK13	OD	OMİ/HTR A2	PINK1/Parkin	Geç başlangıçlı Parkinsonizm	2p13	Whitworth ve diğ. 2008;Yun ve diğ. 2008

PARK14	OR	PLA2G6		Geç başlangıçlı Distoni Parkinsonizm	22q13.1	Paisan-Ruiz ve diğ. 2009
PARK15	OR	FBX07	UPS yolağı	Geç başlangıçlı Parkinsonizm Pramidal Sindromu	22q12- q13	Panagariya ve diğ. 2007; Ho ve diğ. 2008
PARK16	Risk Faktör	RAB7L1		Geç başlangıçlı Parkinsonizm	1q32	Pihlstrom ve diğ. 2015
PARK17	OD	VPS35		Geç başlangıçlı Parkinsonizm	16q11.2	Wang ve diğ. 2016
PARK18	OD	EIF4G1		Geç başlangıçlı Parkinsonizm	3q27.1	Nuytemans ve diğ. 2013
PARK19	OR	DNAJC6		Genç başlangıçlı Parkinsonizm	1p31.3	Edvardson ve diğ. 2012
PARK20	OR	SNYJ1		Geç başlangıçlı Parkinsonizm	21q22.1 1	Chen ve diğ. 2015
PARK21	OD	DNAJC13		Geç başlangıçlı Parkinsonizm	3q22.1	Vilarino- Güell ve diğ. 2014
PARK22	OD	CHCHD2			7p11.2	Qingsong Hu ve diğ. 2016
PARK23	OR	VPS13C		Genç başlangıçlı Parkinsonizm	15q22.2	Lesage ve diğ. 2016

1.3.2. Parkinson Hastalığı'nın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Yöntemler

Farmakoloji sayesinde PH'daki ilerleyici nörodejenerasyonu durdurulamaması, derin beyin stimülasyonu (*Deep Brain Stimulation. DBS*), nörotrofik faktör esaslı terapiler, gen terapisi, fetal orta beyin transplantasyonu ve kök hücreye dayalı tedavi gibi alternatif terapötik yaklaşımların gelişmesine neden olmuştur. Derin beyin stimülasyonu hastalığın ileri evrelerinde kullanılamamaktadır. Genellikle beyin hızı düzenleyicisinin subtalamik çekirdeği veya globus pallidus pars interna'ya (bazal ganglia) cerrahi olarak implantasyonunu içermektedir. Hız ayarlayıcı yüksek frekanslı elektriksel darbeler göndererek PH semptomlarının hafifleterek bu anti PH ilaçlarının dozunun azaltılmasına yardımcı olmaktadır. İlaç tedavisi artık etkili ve yan etkileri görülmeye başladığı ileri vakalarda derin beyin stimülasyon yöntemi uygulanır. (Marras ve diğ. 2008). Parkinson tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olan dopamin öncüsü levo-dopa, özellikle erken evrelerde kullanıldığında PH tedavisinde oldukça etkili bir ilaçtır. Sistemik dolaşımı beyin hücre dışı sıvısından ayıran ve PH' larının striatumundaki dopamin düzeylerini eski haline getiren kan-beyin bariyerini geçmektedir. Bununla birlikte, levo-dopa periferik sinir sistemi tarafından metabolize olmaktadır bu da diskinezi, ilaç kaynaklı yararın daha kısa sürmesi (yıpranma) ve uzun süreli levo-dopa ile ilişkili on-off pulsatil yanıt dalgalanmaları gibi sıkıntı yaratan yan etkilere neden olmaktadır (Olanow ve diğ. 2006; Bronstein ve diğ. 2011). Dopamin prekürsörü levo-dopa gibi dopamin replasman tedavileri tipik olarak semptomların hafifletilmesinde rol oynasa da, hastalık ilerledikçe potansiyellerini kaybetmektedir (Kasap ve diğ. 2011; Abeliovich ve diğ. 2016). Bugüne kadar semptomatik tedaviler yapılsa da, hastalığın tamamını ortadan kaldırabilecek bir tedavi bulunmamaktadır.

1.3.3. Parkinson Hastalığı ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan *in vitro* Model Hücre Hatları

PH'ı kompleks ve multifaktöriyel doğasını taklit etmeye çalışan çeşitli *in vitro* modeller (Hücre hatları, Primer Hücre Kültürleri ya da Lezyon Modelleri gibi)

bulunmaktadır. Bu modeller sayesinde, PH'nın patojenik mekanizması ve bu mekanizma ile ilgili gen/proteinler belirlenmeye çalışılmaktadır:

- Primer Tirozin Hidroksilaz Nöronlar (Primary TH neurons).
- Primer Kortikal ve Hipokampal Nöronlar (Primary cortical and hippocampal neurons).
- Primer İnsan Fibroblastları (Primary human fibroblasts).
- SH-SY5Y Hücre Hattı (SH-SY5Y Cell Line).

Nörodejenerasyon çalışmaları için hücresel modeller içerisinde öncelikle katekolaminerjik insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) tercih edilmektedir. SH-SY5Y hücreleri SK-N-SH hücrelerinin üçüncü alt klonudur ve simpatik adrenerjik ganglia orijinli nöroblastoma metastazı olan hastanın kemik iliği biyopsisinden elde edilmiştir (Biedler ve diğ. 1973). Bu hücreler tirozin ve dopamin- β -hidroksilaz eksprese edebildiklerinden dolayı dopamin (DA) ve norepinefrin (NA) sentezleyebilmektedirler (Oyarce ve diğ. 1991). Ayrıca DA homeostazını düzenleyen ve sadece dopaminerjik nöronlarda sentezlenen dopamintransporter (DAT) ve DA reseptörlerini ifade etmektedir ve bu hücrelerde DA saklama vezikülü özelliği bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı SH-SY5Y hücre hattında, hücreler arası ortama dopamin eklenmesiyle sitoplazmik DA konsantrasyonu artabilmektedir (Takahashi ve diğ. 1994; Xie ve diğ. 2010).

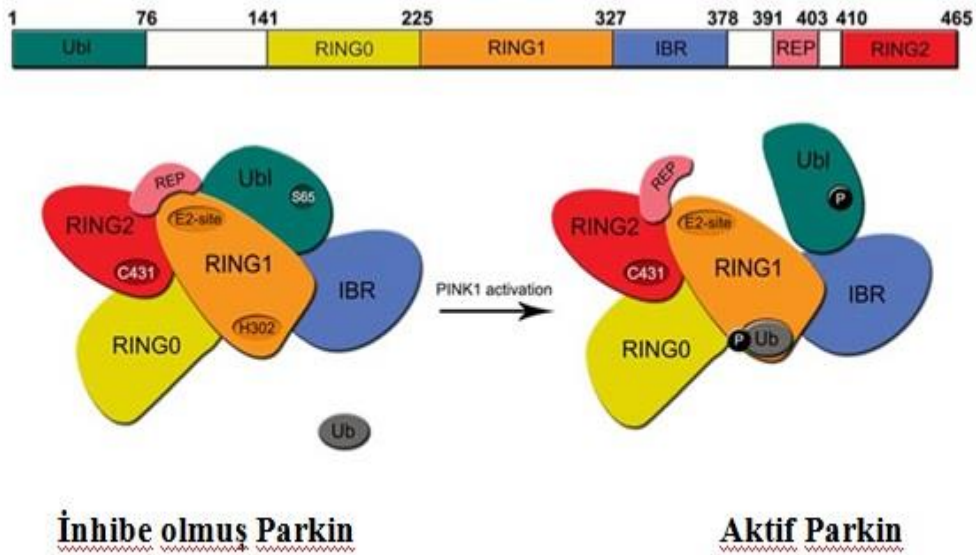
Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda transfeksiyon ile SH-SY5Y Mutant ve Yabani Tip (WT) stabil hücre hatları oluşturulmuş ve erken başlayan PH'na sebep olabilen Parkin proteinine ait iki mutasyonun (Q311R ve A371T) nöroblastoma hücre proteomu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Özgül ve diğ. 2013). Mutantlardan biri olan Q311R Parkin'in RING1 domaininde; A371T ise IBR domaininde yerleşmektedir. RING1 bölgesindeki Parkin mutasyonları E2 bağlanma aktivitesini ve IBR bölgesindeki Parkin mutasyonları ise proteinin yapısal bütünlüğünü ve stabilitesini bozabilmektedir. Bu nedenle, bu mutasyonların Parkin proteini ve Parkin ifade eden hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Riley ve diğ. 2013). Mutasyonlar ve hastalık arasında bir bağlantı kurulmaya çalışılmıştır. Çalışmalar sırasında elde edilen verileri karşılaştırmak için WT Parkin proteini kontrol olarak kullanılmıştır. Bulgular mutant Parkin proteininin E3 ubiquitin ligaz aktivitesini kaybetmeden yabani tip Parkin proteinine göre hücrenin

nükleusunda daha fazla konumlandığını, hücre içerisinde parçalanmadan daha uzun süre kaldığını, hücre tarafından farklı şekilde translasyon sonrası değişimlere tabi tutulduğunu ve hücre proteomunu farklı şekilde etkilediği görülmüştür. Özellikle mutant Parkin protein ekspresyonunun hücreyi strese sokarak şaperon protein sentezini arttırması, bulunan ekspresyonu değişmiş bazı proteinlerin PH ile ilişkisinin bilinmiş olması ile doğrulanmıştır (Özgül ve diğ. 2013). Deneylerimizde laboratuvarımızda daha önce üretilmiş olan yukarıda bahsedilen WT ve mutant SH-SY5Y hücre hatları kullanılmıştır.

1.4. PARK 2 Geni ve Parkin Proteini

Kromozomun 6q 25-27 bölgesinde bulunan PARK2 lokusu ilk defa Japon bir ailede bulunmuştur. Erken başlayan otozomal ressesif “Juvenil Parkinsonizm” (ARJP) olarak da tanımlanmıştır (Kitada ve diğ. 1998). 1998’den beri PARK2 geni ile alakalı bir çok mutasyon bulunarak, bu mutasyonların parkinsonizmle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Kasap ve diğ. 2009; Walden H ve Muqit 2017). PARK2 geni insanda en büyük 2 genden biri olmakla beraber, 12 ekzondan oluşmuş ve büyüklüğü 1.4 Mbç’dır. Kodladığı Parkin proteini ise E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir. Parkin proteinin çoğunluğu sitozolde, bir kısmı ER’da (Endoplazmik Retikulum), mitokondride ve çekirdekte lokalize olmaktadır. Parkin, hedefi olan proteinlere ubiquitin ekleyerek onları parçalanmak üzere proteozoma göndermektedir (Belin ve Westerlund 2008; Farrer ve diğ. 2001). Parkin proteini 465 amino asit uzunluğunda, 52kD büyüklüğündedir. N-terminalinde ubiquitine benzer bir domain (UBL), C-terminalinde “Ring finger” (RBR)(RING1-IBR-RING2) motifi içeren domain ve bunların arasında da iki bölgeyi birbirine bağlayan ara segment bulunmaktadır (Shimura ve diğ. 2000). N-terminali iki çinko iyonunu bağlar ve çapraz bağlantılı RBR içine katlanır, C-terminali ise tek çinko iyonu içermektedir (Eisenhaber ve diğ. 2007). N-terminalinde bulunan UBL bölgesi (1-76 amino asit arası) ubiquitin ile amino asit seviyesinde % 62 oranında benzerlik göstermektedir (Kitada ve diğ. 1998). Ayrıca UBL bölgesi Parkin ekspresyonun kontrolünde (Finney ve diğ. 2003), substrat tanıma (Shimura ve diğ. 2000) ve 26S proteazom alt ünitesi olan Rpn10 ile etkileşim açısından da önemlidir (Sakatave diğ. 2003). UBL ve RING0 domainleri Parkin geninin aktivitesinden ziyade aktivitenin düzenlenmesi için gereklidir. Çinko kısaçlı RING0 domaini RBR domainlerinin iç kısmına bağlı segmentinde yan-yan (N-terminalinde) bulunmaktadır.

Parkin baskılayıcı elementi (REP); IBR ve RING2 domainleri arasında bulunmaktadır (Çizim 1.7). Parkin-aracılığı ile gerçekleşen ubiquitinlenmede E2 enzimleri ilk önce RING1 domainine yönlendirirler ve taşıdıkları yüklü ubiquitinlenme son olarak substratın birincil amino grubuna izo-peptid bağı oluşumu aracılığı ile transfer edilmeden önce RING2 domaininde katalitik sisteine (C431) transfer olurlar. RING0 inhibe olmuş Parkinin kendi içinde katlanması sonucunda RING1 ve RING2 arasına gelir ve RING1 aktivitesini inhibe eder (Cheng-Wu Zhang ve diğ. 2016). Aynı zamanda, kapatılmış konformasyon ayrıca putativ E2 bağları REP gelişmesini sağlayıp promotorunu benimser, E2 böylece RING1'in işini engeller (Trempe ve diğ. 2013; Wauer ve Komander 2013). PINK1, Parkinin UBL domainindeki Serine65 (S65) üzerinden fosforile olmasını sağlar. Ubikuitin fosforillenmesi ile RING1'in birlikte görev alması, UBL'nin RING1 domaininden uzaklaşması ve Parkinin yapısının yeniden düzenlenmesi sağlanılarak Parkin aktivasyonu gerçekleştirilir (Cheng-Wu Zhang ve diğ. 2016). Yapılan diğer çalışmalarda Parkin aktivasyonunun iki basamaklı bir süreç olduğu yani UBL domaininin serin 65 (S65) bölgesinden fosforillenmesi (Matsuda ve diğ. 2010; Kondapalli ve diğ. 2012; Shiba-Fukushima ve diğ. 2012) ve aynı tarafta ubikuitin fosforillenmesi (Kane ve diğ. 2014; Koyano ve diğ. 2014) gerçekleştiği bilinmektedir. İlginçtir ki; fosforillenmiş Parkin Ubl domaini RING1'den kopmaya meyilli iken; fosforillenmiş ubikuitinin ise RING1'e olan meyili artmaktadır. Bu yüzden de Ubl ve ubikuitinin benzer işaretli dizileri paylaşmalarına rağmen, RING1 ile aralarındaki iletişim Parkin'in fosforillenmesi ile zıt olarak düzenlenmektedir. Ubl'nin RING1' den (S65 fosforillenmesini takiben) ayrılması ve RING1'den histidin (H302) kalıntısının ayrılarak fosforillenmiş ubikuitine bağlanması sonucu, Ubl domaininin yapısında konformasyonel değişikliğe yol açarak Parkin inhibe olmuş halinden uzaklaştırır (Çizim 1.7) (Cheng-Wu Zhang ve diğ. 2016). Parkin'in hücrede bir çok substratı tanımlanmış olup, bunların olası patojenik etkileri araştırılmaktadır.



Çizim 1.7. Parkin proteininin mutasyona uğramış bölgeleri ve yapısal düzenlenmesi (Cheng-Wu Zhang ve diğ. 2016).

1.5. Post-Translasyonel Modifikasyonlar

Proteinlerin bir çoğunun yapısal ve işlevsel özelliklerinin tamamlanabilmesi için translasyonları sonrasında bazı modifikasyonlara uğradıkları bilinmektedir. Hücreler bu mekanizmayı kullanarak içsel ve dışsal faktörlere karşı protein ekspresyonu seviyesini düzenlemek yerine bazı proteinleri translasyon sonrası modifikasyon (PTM) ile modifiye ederek cevap vermektedirler (Özgül 2012). PTM'ler, proteinlerin amino asit rezidülerine kovalent olarak bağlanarak ilgili proteinlerin konformasyonlarının, aktivitelerinin ve etkileşime gireceği diğer protein partnerleri ile olan ilişkilerini değiştiren biyokimyasal modifikasyonlardır (Walsh 2006). Modifikasyon için kullanılan moleküller, protein üzerindeki belirli amino asitlere modifikasyona bağlı olarak değişen enzimler aracılığı ile bağlanmaktadır (Blom ve ark. 2004). Bu tip modifikasyonlara örnek olarak; fosfat ve metil gibi küçük moleküllerin ya da karbonhidrat ve lipid gibi büyük ve karmaşık moleküllerin bağlanması verilebilmektedir. PTM'ları gerçekleştiren enzimlerin sayısı binleri bulunmaktadır (Yalçın 2012 ve Hunter 2007). Aşağıda proteinlere fonksiyon kazandırılmasında ve gen ekspresyonunun çeşitlenmesinde rol oynayan, ökaryotik

hücrelerde sık karşılaşılan ve nispeten daha detaylı çalışılan farklı formlardaki PTM'lerden bahsedilmiş ve bu tezin konusu olan fosforilasyon üzerinde durulmuştur.

Fosforilasyon; sinyal iletişimde kullanılan proteinlerin regülasyonunu ve organizmanın bütün yollarını etkilemektedir (Yalçın 2012). En yaygın görülen geri dönüşümlü PTM, fosforilasyondur (Johnson ve diğ. 1993). Genomik dizilemeler sonucunda tüm ökaryotik genlerin %4'ünün, fosforilasyonu katalizleyen kinazları kodladığı gösterilmiştir (Lopez ve diğ. 2012). Eksprese edilen tüm ökaryotik proteinlerin yaklaşık 1/3'ünün belirli noktalarda fosforilasyona uğradığı ve protein fosforilasyonunun ubiquitinlenmede rol oynadığı belirtilmiştir (Hubbard ve diğ. 1993). Fosforilasyon birçok hücresel olayda (metabolizmada, hemostazda, transkripsiyonel ve translasyonel modifikasyonlarda, proteinlerin degradasyonunda, hücre sinyalinde ve haberleşmesinde, farklılaşmasında ve hücrenin hayatta kalmasında) rol oynamaktadır (Lopez ve diğ. 2012; Hubbard ve diğ. 1993). Memeli hücrelerindeki proteinlerin %30'u kinaz enzimleri tarafından fosforillenmektedir (Jacob ve diğ. 2011).

Asetilasyon; bir proteine asetil grubunun (CH_3CO) bağlanmasıdır. Proteinler enzimli işlemlerde ve enzimsiz işlemlerde de asetillenebilmektedirler (Tom 2010). Hücre biyolojisinde asetilasyon proteinlerin modifikasyonunda çok önemlidir ve proteomiks çalışmalarda memeli proteinlerinde 1000'den fazla asetillenmiş protein tanımlanmaktadır (Choudhary ve diğ. 2009; Fritz ve diğ. 2012; Tom 2010) Asetilasyon; hem translasyon sırasında hem de PTM olarak yani translasyon sonrasında meydana gelebilmektedir. Asetilasyona uğrayan proteinlere örnek olarak; Histonlar, p53 ve Tubulin verilebilmektedir (Zhao ve diğ. 2010). Histonların asetilasyonu, gen transkripsiyonunu ve DNA replikasyonunu etkilemektedir. Çekirdek histonların (örn; H3) N-ucu kuyruklarında Lizin birimlerinin yan zincirlerine asetil gruplarının eklenmesi, Histon moleküllerinin DNA ile etkileşimini zayıflatarak gen transkripsiyonunu ve replikasyonunu aktive etmektedir (Lodish ve diğ.2008).

Metilasyon; proteinlerin metil transferaz enzimleri tarafından Arjinin ve Lizin amino asitleri üzerinden metillenmesidir (Walsh 2006). Metilasyonun, proteinin aktivitesini ve yapısını etkilediği bilinmektedir (Rattan ve diğ. 1992). Histon gibi DNA ya bağlanan

proteinlerin metilasyonu iyi bilinmektedir. Histon kuyruklarında Lizin 9 da metillenme gen transkripsiyonunu inhibe edici etkiye sahiptir (Lodish ve diğ.2008).

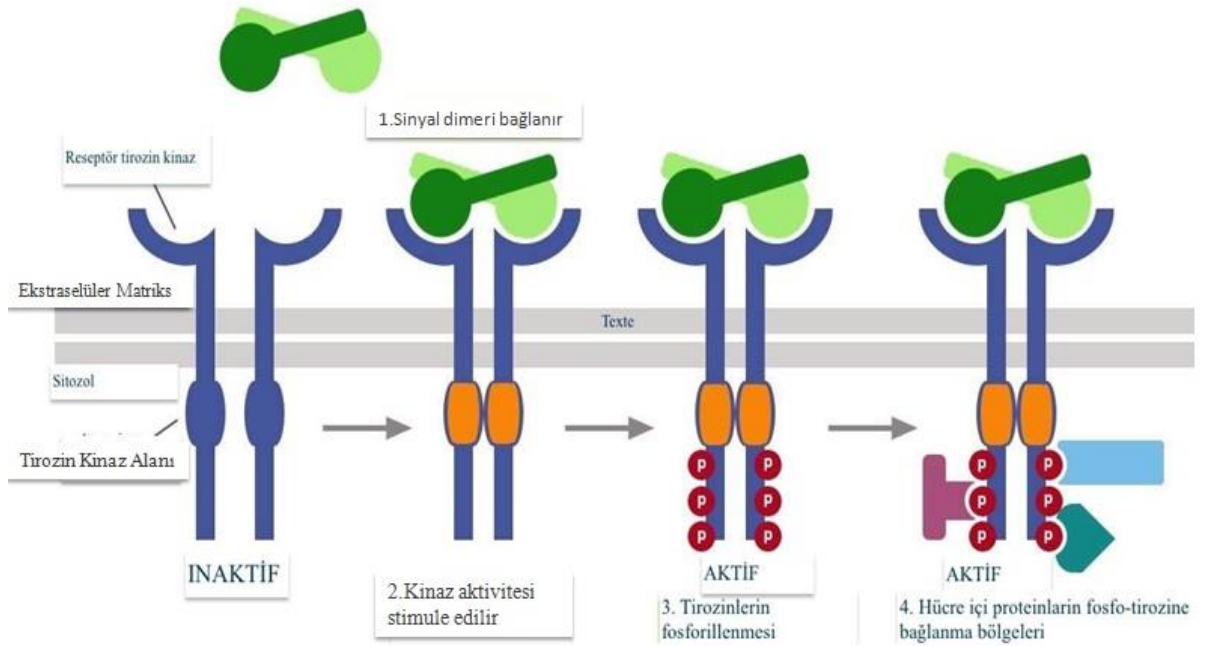
Glikozilasyon'a uğrayan proteinlerin çoğunluğu endoplazmik retikulum'da (ER) sentezlenmektedir. Glikozilasyon sayesinde proteinlerin ER'da katlanıp üç boyutlu yapısını kazanmaları, proteinlerin gerekli hücre içi kompartmanlara taşınmaları ve hücrelerin birbirleri ile etkileşiminde tanınma noktaları olarak görev almaları sağlanmaktadır (Cooper 2000).

Ubikitinlenme; 76 amino asitten oluşan ubikuitin adı verilen proteininin hedef proteine kovalent olarak bağlanması ile gerçekleşmektedir (Fuchs ve diğ. 2006). Hedef proteine Lizin amino asidi aracılığı ile bağlanan küçük bir protein olarak enzimatik üç aşamalı bir reaksiyonun oluşumuna neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar; E1, E2, E3 enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir ve neticesinde proteinler proteosom yolağına girerek degrade olmaktadır (Hershko ve diğ. 1998).

1.6. Protein Fosforilasyonu ve Ubikitinlenme

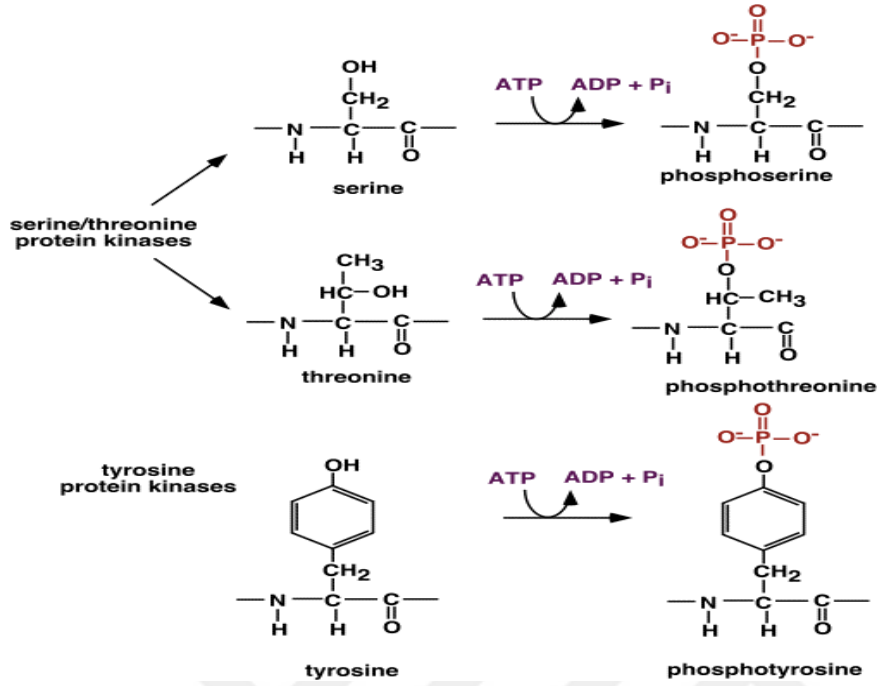
Fosforilasyon; proteine veya başka bir organik moleküle fosfat grubunun (PO_4^{3-}) eklenmesi ile meydana gelmektedir. (Humphrey ve diğ. 2015; Korkuc ve diğ. 2016). Fosforilasyon proteinlerin termodinamik ve kinetik olarak yapısını etkilemektedir. Bir fosforil grubunun eklenmesi, proteine iki negatif yük ilave ederek proteinin katalitik aktivitesini ve substrat bağlanma etkisini değiştirebilmektedir (Lopez ve diğ. 2012). Fosforilasyon ile birçok proteinin fonksiyonu ve aktivitesi; enzimler sayesinde kontrol edilebilmektedir. Tıpkı bir 'moleküler anahtar' görevi görmektedir. Protein fosforilasyonu özellikle hücrel olaylarda önemli roller oynamaktadır. Diğer bir taraftan da, fosforillenmiş 'dönüşümlü-reversible' olan proteinler; hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmaların önemli bir düzenleyici mekanizması olarak görev almaktadır (Levene ve diğ. 1906; Lipmann ve diğ. 1932; Burnett ve diğ. 1954; Cozzzone. 1988; Stock ve diğ. 1989; Chang. 1998; Barford ve diğ. 1998). Protein fosforilasyonunun temel anlamı; hücrel proteinlerin bulundukları bir halden diğer başka bir hale geçerek aktivitesini değiştirmektir. Dolayısıyla; protein fosforilasyonu biyolojik sistemlerin birçok sinyal iletişim yolları için mevcut 'moleküler anahtar' gibi nitelendirilmektedir.

İnsan genomunda bulunan genlerin yaklaşık %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (Van 2003). Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler bulunmaktadır. Tirozin kinazlar (TK), adenosin trifosfat (ATP) yapısında bulunan fosfat atomunun polipeptitlerdeki tirozin rezidülerine transfer edilmesinde rol oynamaktadır. İnsanda en az 90 TK ve 43 TK benzeri gen bulunmaktadır. Bunlar hücresel proliferasyon, diferansiyasyon, hücrenin canlılığı ve hücre hareketliliği gibi önemli düzenleyici fonksiyonlarda rol almaktadır. Membranda bulunan proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. Reseptör yapısındaki TK'lar ekstraselüler alana ligandın bağlanması ile aktive olmaktadır. Sonuçta reseptör oligomerleri oluşur, sitoplazmik membrana bitişik olan bölgenin inhibitör etkinliğini ortadan kaldırarak ve kinaz aktivasyon bölgesindeki regülatör tirozin molekülünün otofosforilasyonu gerçekleştirir. Bu değişiklikler neticesinde kritik amino asit rezidülerinin yeniden düzenlenmesi gerçekleşerek artmış katalitik aktivite meydana gelir ve otofosforilasyon sonucu sinyal proteinlerini hücre membranına toplayarak çoklu sinyal yollarını aktive ederek sinyal proteinleri için bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır (Schlessinger 2000) (Çizim 1.8).



Çizim 1.8. Reseptör tirozin kinaz aktivasyonu.

Serin fosforilasyonu en sık görülen fosforilasyon örneğidir, bunu da treonin amino asidi izlemektedir. Tirozin fosforilasyonuna daha nadir rastlanılmaktadır (Çizim 1.9).



Çizim 1.9. Serin, treonin ve tirozin amino asitlerinin fosforilasyonları.

Tirozin fosfoproteinleri antikorlarla daha kolay saflaştırıldığı için kısmen daha iyi bilinmektedirler (Lopez ve diğ. 2012). Protein fosforilasyonu, fosfat donörleri olarak guanozin trifosfat (GTP) veya ATP kullanarak protein kinazlar tarafından katalize edilmektedir. ATP veya GTP'nin γ ucunun fosforil grubu, Tirozin veya Serin/Treonin Kinazlar tarafından sırasıyla Tirozin, Serin veya Treonin alkol gruplarına aktarılır. Sadece ATP'nin bol bulunduğu hücre içi çevredeki proteinler 'dönüşümlü-reversible' fosforilasyon tarafından düzenlenirken; hücre dışı matriste bulunan proteinler düzenlenememektedir (Lenaz ve diğ. 2012). Protein fosfatazlar ise fosfat zincirinin hidrolizini katalize ederek fosforil gruplarının koparılmasını sağlarlar. Bireysel PTM türleri protein regülasyonlarına karakteristik bir şekilde katkıda bulunabilmektedir (Korkuc ve diğ. 2016). Proetom çalışmalarında birbirine neden olan en yaygın PTM'ler fosforilasyon ve ubiquitinlenmedir. Fosforilasyon ve ubiquitinlenme arasında birçok "cross regulation" yani "çapraz regülasyon" olduğu bilinmektedir. Ubikitinlenme ise protein degradasyonunda önemli rol oynamasının yanı sıra (Hunter 2007) homeostaz, DNA tamiri, protein sinyalizasyonu ve trafiğini de etkilediği bilinmektedir (Mukhopadhyay ve

diğ. 2007; Chen ve diğ. 2009). Proteinlerin ubiquitinlenmesinin bilinen en iyi fonksiyonu; ilgili proteinlerin 26S proteazomlar tarafından parçalanmak üzere bir sinyal görevi görmesidir (Krueger ve diğ. 2006). 26S proteozom sitoplazmada ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteazdır (Yerlikaya 2004). Bu şekilde bir proteinin proteazomda parçalanması için genellikle birden fazla ubiquitin yani poliubikuitinin uç uca kovalent olarak bağlanması gerekmektedir. Poliubikitinlenme; ubiquitin proteinleri üzerindeki spesifik bir Lizin amino asiti (çoğunlukla Lizin48) aracılığı ile olmaktadır (Kutuk ve diğ. 2008; Shaheen ve diğ. 2010). Bu işlem ardarda üç farklı enzim aracılığı ile gerçekleşmektedir. Ubikuitin, yıkılacak olan proteinlere bağlanmadan önce ilk olarak Ubikuitin Aktive Edici enzime (E1) transfer edilmektedir. Aktive edilen ubiquitin daha sonra benzer şekilde E1 enziminden, Ubikuitin Konjugasyon enzimindeki (E2) bir Sistin amino asidine aktarılmaktadır. E2 enzimleri yıkılacak olan proteinlere ubiquitin molekülünü Ubikuitin Ligaz (E3) enzimi yardımı ile direkt olarak aktarır ya da ubiquitin E3 enzime aktarıldıktan sonra substrat proteinlere aktarılmaktadır (Jentsch 1992; Herskho ve diğ. 1980). Son olarak da ubiquitin hedef proteindeki Lizin48 amino asidine aktarıldıktan sonra diğer bir ubiquitin molekülü buna eklenir ve benzer reaksiyonlar tekrarlanarak hedef proteinin üzerinde bir poliubikuitin zinciri sentezlenmektedir (Chau ve diğ. 1989). Ubikuitin-proteozom sistemi hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa ömürlü proteinlerin yıkımında önemli roller oynamaktadır. Ubikuitin yolağının çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir. Bunların arasında genetik kökenli PH'ı gibi nörodejeneratif hastalıklar arasında ataksi ve Alzheimer hastalığı örnek olarak verilebilmektedir (Huang ve diğ. 2010).

1.7. Parkin Proteinini ile PINK1 Arasındaki ilişki

Parkin proteinini kodlayan PARK2 (Parkin RBR E3 Ubikuitin Protein Ligaz, Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase) genindeki mutasyonlar, DJ1 (Protein Deglikaz (Protein Deglycase), Parkinson Hastalığı Protein 7 (Parkinson disease protein 7, PARK7)) (Valente ve diğ. 2004) ve PINK1'de de (PTEN ile indüklenen putatif kinaz 1, PTEN-induced putative kinase 1) (Bonifati ve diğ. 2003) mutasyonlar görülebilmektedir. Bu genlerde meydana gelen birkaç mutasyon açıklanarak, hepsinin Dopamin replasman tedavisine yanıt veren 'Erken Başlangıç Parkinsonizm' ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Resesif iletilen

‘Erken Başlangıçlı Familial PH’deki vakaların yaklaşık % 50’si PARK2’deki homozigot mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Kitada ve diğ. 1998; Hattori ve diğ. 2004). Erken Başlangıçlı resesif PH’nın ikinci en büyük nedeni; PTEN ile indüklenen putatif kinaz 1 (PINK1)’deki homozigot mutasyonlardır (Valente ve diğ. 2004; Tan ve diğ. 2007). Ayrıca PARK2 veya PINK1’deki heterozigot mutasyonlar “Geç Başlangıçlı” PH’nın gelişiminde rol oynayan önemli risk faktörleri olarak belirtilmiştir (Hattori ve diğ. 2004; Tan ve diğ. 2007). PARK2 ve PINK1’deki mutasyonların PH’ı ile ilişkili olduğuna dair genetik kanıtlar olmasına rağmen, nörodejenerasyonu tetikleyen patojenik mutasyonların moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Sha ve diğ. 2010). PARK2 geni birçok dokuda ve hücre tipinde ifade edilerek yani eksprese olarak 465 amino asitlik sitozolik E3 ubiquitin-protein ligazı kodlamaktadır (Kitada ve diğ. 1998; Hattori ve diğ. 2004). PINK1 dopaminerjik nöronları içeren, birçok dokuda ve hücre tipinde ifade edilen 581 amino asitlik mitokondriyal Serin/Treonin Kinaz’ı kodlamasıyla bilinmektedir. PINK1’in kinaz özelliği ile oto-fosforile olabildiği de gösterilmiştir (Hoepken ve diğ. 2007). Birçok çalışmada rekombinant PINK1 proteininin kinaz aktivitesi *in vitro* olarak gösterilmiştir ve PINK1’in kinaz aktivitesi için sitoprotektif fonksiyonunun gerekli olduğu bilinmektedir (Petit ve diğ. 2005). Şu anki verilere dayanarak; PINK1’in mitokondriyal ve sitozolik substrat proteinlerinin fosforilasyonu yoluyla sitoprotektif etki gösterebildiği saptanmıştır. PINK1 ve Parkin birlikte mitokondri membran potansiyeli, kalsiyum dengesi, krista yapısı, solunum aktivitesi ve mitokondriyal DNA (mtDNA) bütünlüğünü koruyarak aksonlarda mitokondrinin taşınımı gibi noktalarda düzenleyici görev üstlenmektedir (Bueler 2010). PINK1’in kinaz aktivitesi gösterdiği için mitokondride oksidatif strese karşı koruyucu bir rolünün olduğu bulunmuştur. PINK1’in mitokondri hedef dizisi içermesinden dolayı sitoplazmada da varlığı gösterilmiştir. PINK1 mitokondrinin dış zarında bulunmasına rağmen PINK1’e ait kinaz domainin bir kısmı sitozolde de lokalize olmaktadır (Zhou ve diğ. 2008). Aslında Parkin veya PINK1’deki homozigot mutasyonların PH’nın otozomal resesif şekilde meydana gelmesine neden olması; bu proteinlerin normal fonksiyonunun, hücrenin ve özellikle de dopaminerjik nöronların hayatta kalabilmesi açısından gerekli olduğu göstermiştir. *Drosophila*’da yapılan genetik çalışmalarda Parkin veya PINK1’in fonksiyonunun kaybedilmesinin kısıtlı yaşam süresi, motor eksiklikleri, mitokondriyal anomaliler, kanat kaslarının ve dopaminerjik nöronların

dejenerasyonunu içeren benzer bir fenotipe yol açtığı söylenmiştir (Wang ve diğ. 2006; Yang ve diğ. 2006). Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalarda Parkin ve PINK1 arasında fonksiyonel bir bağ olduğu ve PINK1'in Parkin'i fosforile ettiği belirtilmektedir (Um ve diğ. 2009; Xiong ve diğ. 2009). Fakat, PINK1-Parkin etkileşiminin hücrel rolünün belirsizliği ve PINK1 aracılığıyla Parkin fosforilasyonunun, Parkin E3 ligaz fonksiyonunu düzenleyip, düzenlemediği konusu halen daha tam olarak bilinmemektedir (Sha ve diğ. 2010). Yapılan çalışmalarda bu genler arasındaki bağlantılar *Drosophila*'daki fonksiyon kaybının modellenmesi ile belirlenmiştir. PINK1'in hasar görmesi çok farklı fenotiplere yol açmaktadır. Daha da önemlisi; hasar görmüş PINK1'in Parkin tarafından kurtarılması bu iki genin aynı yolda olduğunu göstermiştir (Clark ve diğ. 2006; Park ve diğ. 2006). Yapılan çalışmalarda mitokondri morfolojisinin kontrolünde PINK1/Parkin'in birlikte işlev gördüğü ve herhangi birinde bir işlev kaybı olduğunda mitokondri morfolojisinin bozulduğu görülmektedir (Dodson ve diğ. 2007; Chu 2010). Parkin/PINK1 yolağının amacının anlaşılabilmesi için Parkin'in mitokondriyal rolünün incelenmesi gerekmektedir. Parkin genelde sitozolik olmasına rağmen eğer organel membran potansiyelini kaybederse, Parkin'in mitokondriyal yüzeyde toplandığı ve mitofajiyi teşvik ettiği bilinmektedir (Narendra ve diğ. 2008). Parkin'in depolarize mitokondriyi mitofajiye teşvik etmesinin nedeninin; hücreyi apoptozdan kurtarmak için olduğu düşünülmektedir. Bu konuda ileri sürülen moleküler etkileşim mekanizmasında Parkin'in mitokondriye çekilerek, PINK1'in rolüne işaret edilmektedir. Genelde tüm dizi sentezlenen PINK1 mitokondri iç zarına yerleşmektedir. PINK1'in putatif transmembran domainini, mitokondrinin iç zarında lokalize olan PARL (Mitokondriyal intramembran proteaz PARL; Mitochondrial intramembrane cleaving protease PARL) keserek 52 kDa formundaki PINK1'i oluşturmaktadır (Deas ve diğ. 2011). Birçok negatif sonuçların rapor edilmesine rağmen; PINK1'in direk olarak Parkin'i fosforile edebileceği düşünülmektedir. *in vitro* Kinaz Analizi'nde Yabani tip (WT) PINK1'in, Yabani tip (WT) Parkin'i fosforile ettiği gösterilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde aşırı ifade edilmiş Parkin fosforilasyonunun WT PINK1'in aşırı ifadesi ile arttığı; PINK1 geni susturulması ile de azaldığı gösterilmiştir (Sha, D ve diğ. 2010). Yapılan diğer bir çalışmada ise; BE(2)C insan nöroblastoma hücrelerinde Parkin'in yüksek oranda korunmuş olan Thr175 rezidüsünün spesifik olarak PINK1 tarafından fosforile edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu fosforilasyonun

Drosophila'da Parkin'in mitokondriyal translokasyonu için kilit rol oynadığı da gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2008).



2. AMAÇ

Bu tez çalışmasında amacımız; WT ve mutant tip Parkin proteini ifade eden SH-SY5Y nöroblastoma hücre hatlarında, Parkin indüksiyonu yapılmış ve yapılmamış durumlarında proteinlerin total proteomda fosforilasyon seviyesinde meydana gelen değişimleri 2D tabanlı proteomik yaklaşımlar kullanarak saptayabilmektir. Dolayısıyla bu çalışma; Parkin proteininin ubiquitinlenme kapasitesinde meydana gelebilecek değişimin, proteinlerin fosforilasyon düzeyleri üzerine etkisinin anlaşılmasıyla, ayrıca ubiquitinlenme ile fosforilasyon arasındaki var olabilecek ilişkiyi ortaya koyarak ileride yapılacak olan proteom çalışmalarına da bir ön zemin kazandırmayı amaçlamaktadır.

Bu amaçla; SH-SY5Y hücre hattında Parkin eksprese eden Yabanıl (WT) ve Mutant tip hücrelerde, fosforile olmuş proteinler floresan fosfospesifik PROQ Diamond boyası kullanılarak boyandı, fosfoproteom analizi yapıldı. Bunun ardından SYPRO Ruby boyası kullanılarak da total proteom mukayesesi yapıldı. Fosforilasyon seviyeleri farklılaşan proteinler MALDI TOF/TOF analizine tabi tutularak tanımlandı.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3. 1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon çözeltiler Çizelge 3.1’de verildiği şekilde hazırlandı.

Çizelge 3.1. Deneylerde Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları.

Tampon Çözelti Adı	Konsantrasyonu ve Miktarı	Hazırlanışı
Tris.HCl pH 8.8	1,5 M 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 8.8’e ayarlandı ve 100ml’ye tamamlandı.
Tris.HCl pH 6.8	0,5 M 100 ml	6 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 6.8’e ayarlandı ve 100 ml’ye tamamlandı.
Sodyum Asetat	3 M 10 ml	2,46 g Sodyum Asetat 1 ml distile suda çözüldü.
SDS	% 10 10 ml	1 g SDS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum Persülfat (APS)	% 10 10 ml	1 g APS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C’de saklandı.
6X Yükleme boyası (6 X Loading Dye)	0,5 M Tris-HCl pH 6.8, Glycerol (% 99,7), % 10 SDS, β-Mercaptoethanol, % 0,5 (w/v) Bromphenol blue	1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 2 ml Glycerol (% 99,7), 1,6 ml % 10 SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml % 0,5 (w/v) Bromphenol blue 2,6 ml distile su ilave edildi.
Akrilamid/Bisakrilamid	% 30 100 ml	29,2 g Akrilamid, 0,8 g Bisakrilamid tartılıp 100 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C’de saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5X, 300 ml	4,5 g Tris, 21,6 g Glisin ve 1,5 g SDS distile suda çözülerek 5X tampon 1X 'e seyreltildi.
SDS-PAGE Sabitleştirici Solüsyon (Fiksatif)	% 40 Metanol, % 10 Asetik asit, 100 ml	40 ml Metanol ve 10 ml Asetik Asit karıştırılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
Western Blot Transfer Tamponu	100 ml	0,58 gr Tris, 0,29 gr Glisin, 0,025 gr SDS (0,375 ml % 10 SDS'den) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
TBS-T pH 7.6	25 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 % 0,1 Tween20 1L	2,42 gr Tris, 8 gr NaCl, 1 ml Tween20 900 ml distile suda çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlandı. 1ml Tween20 eklendi.
Ponceau S Boyama Solüsyonu	% 0.1 (w/v)	0.1gr Ponceau S ve 0.5 ml Asetik Asit karıştırılarak 100 ml distile suda çözüldü.
Bloklama Tamponu (Western Blot)	% 5 10 ml	5 g süt tozu (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, ABD)), 10 mL TBST içinde çözüldü ve filtre kâğıdından geçirilerek kullanıldı.
HyperFilm Developer Solüsyonu	Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika)	Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml distile su, 50 ml solüsyon A, 2 ml solüsyon B ve 2 ml solüsyon C ile karıştırılarak kullanıldı.
HyperFilm Fiksleme Solüsyonu	Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika)	Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml distile su, 50 ml solüsyon A ve 10 ml solüsyon B ile karıştırılarak kullanıldı.

2DE-Rehidrasyon Örnek Tamponu	8 M Üre, 50 mM DTT, % 2 (w/v) CHAPS, % 0.2 (w/v) Amfolit pH 3-10, % 0,001 Bromofenol mavisi 50 ml	24 gr Üre, 1 gr CHAPS, 0.385 gr DTT, 250 µl Amfolit (% 40) ve 0,5 mg Bromofenol mavisi karıştırılıp distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
ProQ Diamond Boya Uzaklaştırma Solüsyonu	50 mM Sodyum Asetat pH 4, %20 Asetonitril	50 ml 1 M Sodyum Asetat pH4'den, 200 ml Asetonitril ile karıştırılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
MOPS tampon	500 ml	104,6 gr Mops, 60.7 gr Tris, 9,989 SDS, 0,5M ETDA karıştırıp distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
2D IPG Stripleri Yıkama Tamponu-I	6 M Üre, 0,375 M Tris.HCl pH 8,8, % 2 SDS, % 20 Gliserol, % 2 (w/v) DTT	90.15 gr Üre, 62.5 ml 1.5 M Tris.HCl pH 8,8 5 gr SDS, 50 ml Gliserol, 5 g DTT karıştırılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.
2D IPG Stripleri Yıkama Tamponu-II	6 M Üre, 0,375 M Tris.HCl pH 8,8 % 2 SDS, % 20 Gliserol,% 2,5 (w/v) İyoda Asetamid	90,15 gr Üre, 62,5 ml 1,5 M Tris.HCl pH 8,8, 5 gr SDS, 50 ml Gliserol, 6,25 gr İyoda Asetamid karıştırılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.
Asetonitril	% 20 10 ml	20 ml Asetonitril 80 ml distile suya eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum Bikarbonat	50 mM 10 ml	40 mg AmBic tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada; laboratuvarımızda daha önce 104S217 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında oluşturulan Yabanıl tip ve Mutant tip Parkin (Q311R ve A371T mutasyonları) genlerini stabil olarak ifade edebilen SH-SY5Y hücre hattı klonları kullanıldı.

3.2.1. Hücrelerin Büyütülmesi

SH-SY5Y Yabanıl tip (WT) ve SH-SY5Y Mutant (AE) hücreler standart büyüme şartlarında kültüre edildi. Hücreler MEM Earle's (Multicell, Katalog No 320026CL, Kanada), % 10 tetrasiklin içeren FBS (Capricorn, Katalog No FBS-TET-12A, South America), 0.1 µg/µl Penisilin/Streptomisin (Gibco, Katalog No14140122, ABD), 2.8 mM L-Glutamin (Multicell, Katalog No 609065EL, Kanada) karışımı içeren besiyerinde 37°C'de % 5 CO₂ atmosfer nemde büyütüldü. Hücre besiyerleri her 3 günde bir yenilendi ve hücrelerin yoğunluğu % 75'e ulaştığında hücreler pasajlandı.

3.2.2. Hücrelerden Saklama Alınması

Hücreler azot tankında saklamaya alınmadan önce yavaş şekilde ısı düşürme yöntemi kullanılarak donduruldu. Bu amaçla hazırlanan besiyeri, % 70 MEM, % 20 FBS ve % 10 DMSO içerecek şekilde hazırlandı. Dondurma işlemi öncesi tüm taban yüzeyini kaplamış (% 80-90 confluent) hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve iki kez kalsiyum magnezyum içermeyen PBS (Biochrome, İngiltere) solüsyonu ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabı içerisine 1 ml % 0.25 Trypsin / EDTA (Biochrome, İngiltere) solüsyonu eklendi ve solüsyonun iyice yüzeye yayılması sağlanarak yaklaşık 7-10 dakika 37°C'de inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası kültür kabı içerisindeki hücreler 10 ml PBS ile toplandı ve 10 dakika 400xg'de + 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan PBS uzaklaştırıldı ve hücrelerin bulunduğu çökelti dondurma besiyeri (% 70 MEM, % 20 FBS ve % 10 DMSO) ile çok yavaş bir şekilde karıştırıldı. Hücreler sayıldı ve daha önceden hazırlanarak hücre adı ve tarih yazılmış olan dondurma tüpleri (cryovial) içerisine her tüpe 5×10^3 hücre gelecek şekilde bölündü. Tüpler - 80°C'de kyro-

freezer saklama kabında (Nalgene, ABD) bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına yerleştirildi.

3.2.3. Hücrelerin Çözülmesi

Hücreler çözülme üzere azot tankından çıkarıldıktan sonra cryotüpün doğrudan 37°C'deki su banyosu içerisine daldırılmasıyla çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra çözme besiyerine alınarak içindeki DMSO uzaklaştırıldı. Çözme besiyeri 8 ml MEM içerisine yavaş ve damla halinde eklenmiş 2 ml FBS'den oluşmaktadır. Karıştırılmadan hazırlanan besiyere eriyen hücreler yavaş ve damla halinde eklendikten sonra 10 dakika 400 xg'de + 4°C'de santrifüj edildi. Çöken hücreler antibiyotik içermeyen kültür besiyerinde bir gece büyütüldü. Ertesi gün hücrelerin besiyeri uygun antibiyotik içeren ile değiştirildi ve hücreler yeterli yoğunluğa ulaşana kadar besiyerleri her üç günde bir yenilendi.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Deneylerde kullanılacak hücrelerin yoğunluğu ~ % 75'e ulaştığında bulundukları kültür kabından kaldırılarak daha büyük ya da daha fazla sayıda kültür kaplarına ekildi. Kısaca, steril PBS ile yıkanan hücreler yapıştıkları yüzeyden % 0.25 Trypsin/EDTA muamelesi ile kaldırıldı ve PBS varlığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan hücre çökeltisi büyüyecekleri besiyerinde çözülerek uygun kültür kaplarına aktarıldı.

3.2.5. Hücrelerin Sayılması

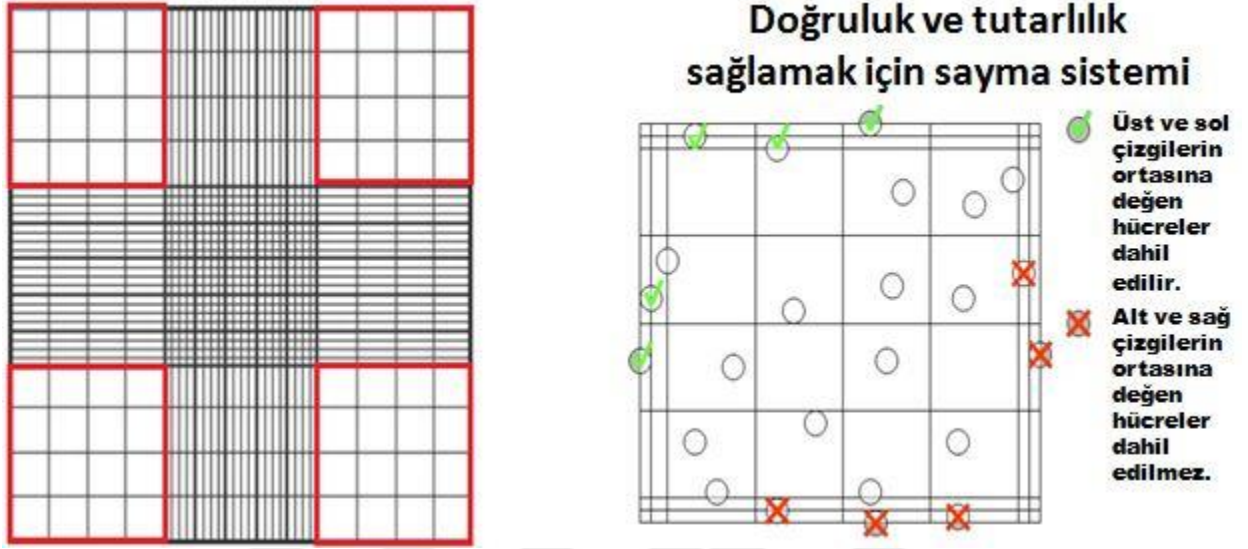
Hücreler % 75 yoğunluğa ulaştıktan sonra sayım işlemi yapıldı. Steril PBS ile yıkanan hücreler yapıştıkları yüzeyden %0.25 Trypsin/ EDTA muamelesi ile kaldırılarak PBS varlığında 2000xg'de 10 dakika + 4°C'de santrifüj edildi. Hücrelerin canlılık sayısını belirlemek için % 0.4 Tripan mavisini (Sigma, ABD) kullanıldı. Tripan mavisini kullanma amacımız canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırabilmektir. Canlı hücreler bozulmamış hücre zarlarına sahiptirler ve tripan mavisini canlı hücreleri boyayamaz, ölü hücreler ise hücre zarına sahip olmadıkları için boyaları emerler. Dolayısıyla ölü hücrelerin sitoplazması mavi renkte boyanmaktadır, canlı hücrelerin sitoplazması ise

boyanmamaktadır. Hücrelerin yaşayabilirliğinin doğru bir şekilde gösterilmesini sağlamak için hücre örneği de dahil tüm reaktifler sayım için hücre süspansiyonunun seyreltilmiş bir numunesini hazırlamadan önce oda sıcaklığına ısıtılmalıdır. PBS veya serumsuz besiyeri kullanılarak iyi karıştırılmış tek hücre süspansiyonunun uygun bir seyreltisi hazırlanmalıdır. Ardından konsantrasyonu doğru bir şekilde görüntülemekve seyreltmeyi yapmak için en az 20 µL hücre süspansiyonu kullanılmalıdır. Örnek olarak; 10 kat seyreltme hazırlamak için ilk önce mikro santrifüj tüpüne veya 96 plakalı bir plate'e 80 µL PBS veya serum içermeyen besiyeri eklenmektedir. Ardından, 20 µL'lik iyi karıştırılmış hücre süspansiyonu tüp veya plate'e aktarılmaktadır. 20 µL % 0.4 Tripan Mavisi üzerine iyi karıştırılmış ve seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 20 µL eklendi (Uygun seyreltme thoma lam kare başına 50-100 hücre veren bir hücre konsantrasyonuna neden olmaktadır. 10 kat seyreltme ile başlanması önerilmektedir ancak uygun seyreltme faktörü, başlangıç örneğinde bulunan yaklaşık hücre sayısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Hücre canlılığının doğru bir şekilde görüntülenebilmesi için, hücrelerin canlılığı zamanla azalacağından, hücreler boyamaya 15 dakika içinde dahil edilmektedir). Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) alkol ile temizlenerek düz bir yüzeye konuldu ve lamel ise sayım alanı çerçevesinin üzerini örtecek şekilde yerleştirildi. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktanın tam orta noktasından hücre solüsyonu (yaklaşık 10 µL) yavaşça sayım alanına pipetle verildi. Binoküler ışık mikroskobuna Thoma lamı yerleştirildikten sonra mikroskobun 10x objektifinde renksiz (canlı) ve renkli (ölü) hücreler ayrı ayrı sayıldı. Sırasıyla, Thoma lamının dört dış karesinde olan hücreler sayıldı, üst ve sağ perimetrelerdeki olanlarsa sayılmadı, alt ve sol perimetrelerdeki hücreler de sayıldı (Çizim3.1). En az 100 hücre sayılmalıdır (Thoma lamındaki karede yaklaşık 100'den fazla veya daha az hücre varsa, daha büyük veya daha düşük seyreltme faktörü kullanılarak yeni bir seyreltilmiş numune hazırlanmalıdır). Seyreltilmiş numunedeki toplam canlı hücre/mL sayısını elde etmek için aşağıdaki denklem kullanıldı:

Toplam canlı hücre sayısı/mL = (kare başına ortalama canlı hücre sayısı) x seyreltme faktörü x 10⁴. Seyreltilmiş numunedeki toplam hücre/mL sayısını elde etmek için, yukarıdaki ile aynı denklem kullanılmalıdır, ancak toplam hücre sayımı hem canlı hem de canlı olmayan hücreleri içermektedir. Seyreltilmemiş alikotta toplam hücre/mL sayısını

elde etmek için yukarıdaki gibi seyreltme faktörü düzeltilmelidir. Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenebilmektedir:

$$\text{Canlı hücreler (\%)} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı} \times 100}{\text{Canlı hücre sayısı} + \text{canlı olmayan hücre sayısı}}$$



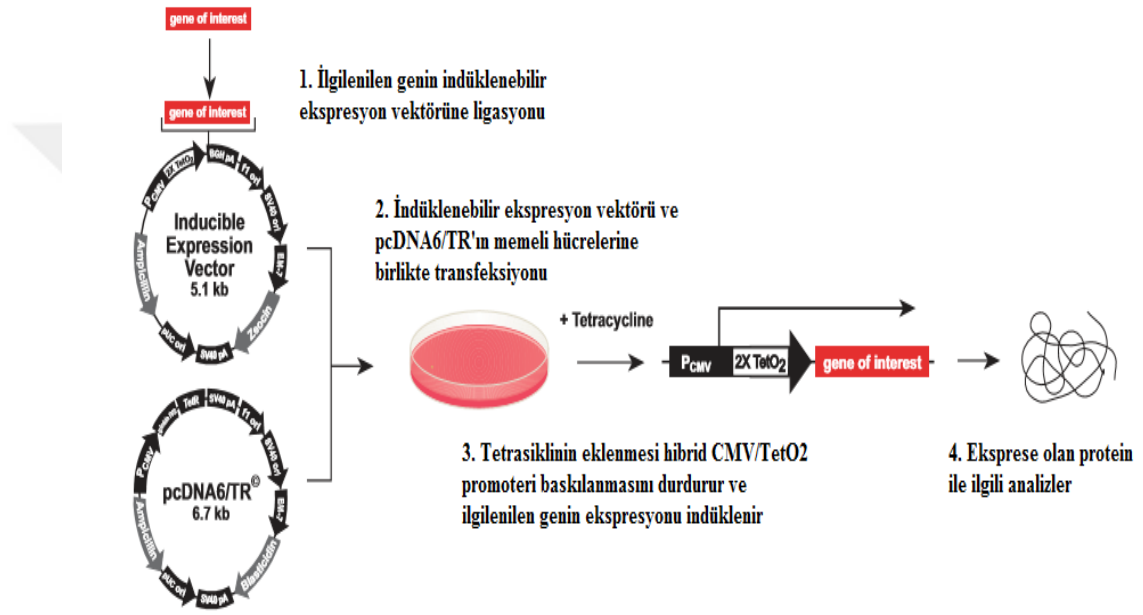
Çizim 3.1. Thoma lamının karelerinin içerisindeki boyanmış hücrelerin sayımı.

3.3. Klonlamalar

3.3.1. SH-SY5Y Hücre Hattının *in Vitro* Ortamda Büyütülmesi ve T-Rex Sistemi

SH-SY5Y hücreleri *in vitro* ortamda gen transfeksiyonu kolay yapılabilen hücrelerdir. Nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* ortamda moleküler mekanizmalarını çalışmak için bu hücre hattı sık olarak kullanılmaktadır. Ancak bu hücrelere yapılan gen transfeksiyonlarından (gerek transient gerek stabil olsun) kaynaklanan protein ekspresyonları kontrolsüz olmaktadır. Başka bir ifade ile transfekte edilen gen hücrede sanki bir “house-keeping” gen gibi sürekli olarak proteine çevrilir. Böyle bir yaklaşımla yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar hiçbir zaman hücre içerisindeki fizyolojik durumun temsilcisi olamamaktadır ve bu yöntemle elde edilen deneysel veriler yorumlanırken dikkatli olmak gerekmektedir. Örneğin stabil olarak transfekte edilmiş ve kontrolsüz olarak eksprese edilen bir proteinin hücrede endoplazmik retikulumda

toplanması proteinin hücrede lokalize olduğu bölgeyi gösterebileceği gibi proteinin aşırı miktarda sentezlenip protein çökeltileri oluşturmamasından da kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle protein ekspresyon çalışmalarında bahsedilen sorunlarla karşılaşmamak için daha önceden kontrollü gen ekspresyonu elde etmek için kullanılan TRex-plazmit sisteminden yararlanılmıştır (Invitrogen, ABD). Bu sistem iki temel plazmid vektörü içermektedir (pCDNA6/TR ve pCDNA4/TO). Bu plazmidlerden ilki (pCDNA6/TR) TetR adı verilen bir represör proteini kodlarken diğer vektör (pCDNA4/TO) ilgi duyulan genin klonlandığı vektör olmaktadır (Çizim 3.2).



Çizim 3.2. TRex-gen ekspresyon sistemi (Invitrogen, USA) ve çalışma prensibi.

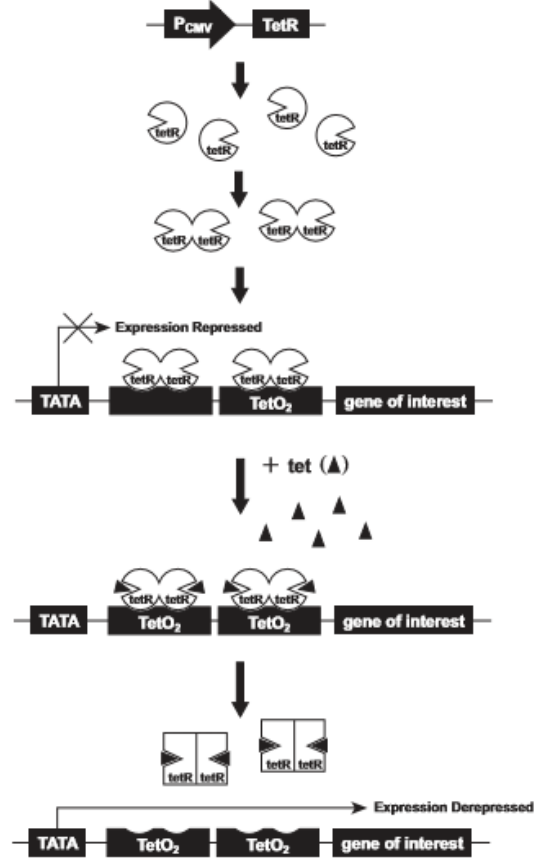
pCDNA6/TR üzerinden eksprese edilen Tet-R proteinini ikinci vektör üzerinde bulunan TetR operatörünü bağlayarak gen ekspresyonunu durdurmaktadır. Ancak ortama tetrasiklin antibiyotiği eklendiği zaman, bu antibiyotik TetR proteinini bağlamakta ve TetR proteininin diğer vektör üzerindeki baskılayıcı özelliğini ortadan kaldırmaktadır. Başka bir ifadeyle; ikinci vektör üzerine klonlanan genin ekspresyonu tetiklenmekte ve gen hücre tarafından eksprese edilmektedir. (Çizim 3.3).

1. Tet represör (tetR) proteinini kültür hücrelerinde pcDNA6/TR tarafından eksprese edilir.

2. TetR homodimerleri inducible ekspresyon vektörü üzerindeki Tet operatör 2'ye bağlanır ve ilgilenilen geni transkripsiyonunu baskılar.

3. İlave edildikten sonra Tetrasiklin (tet) TetR homodimerlerin bağlanır.

4. Tet'in TetR homodimerlerine bağlanması sonucu TetR'da konformasyonel değişiklik olur ve Tet operatör dizisinden ayrılır. Böylece ilgilenilen genin transkripsiyonu indüklenir.



Çizim 3.3. Gen ekspresyonunun durdurulması.

Bu tezde kullanılan SH-SY5Y hücreleri TetR proteinini kodlayamadıklarından dolayı bu hücreler önceden TetR-içeren hücreler haline getirilmiştir. Bu nedenle SH-SY5Y hücrelerine pCDNA6/TR vektörü transfekte edilmiştir. Transfekte edilen hücrelerden pCDNA6/TR vektörünü alan ve genomuna entegre eden hücreler blastasidin varlığında seleksiyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, yaklaşık bir aylık bir seleksiyon döneminden sonra kültür tabakları üzerinde oluşan koloniler tek tek koloni-yakalayıcı silindirler aracılığı ile seçilip yeni kültür tabaklarında büyümeye alınmıştır. Kültür tabaklarında % 70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerden pasajlar yapılmış, yapılan pasajlardan protein izole edilmiştir. Ardından, izole edilen proteinler anti-TetR antikoru kullanılarak Western blot analizine tabi tutulmuştur. Böylece Western blotlama sonucunda TetR-proteinini en yüksek seviyede eksprese eden SH-SY5Y hücre hattı önceden belirlenmiştir.

3.3.2. Yabanıl Tip ve Mutant Tip Parkin Proteinini Tetrasiklin Kontrolü Altında Eksprese Edilen Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması

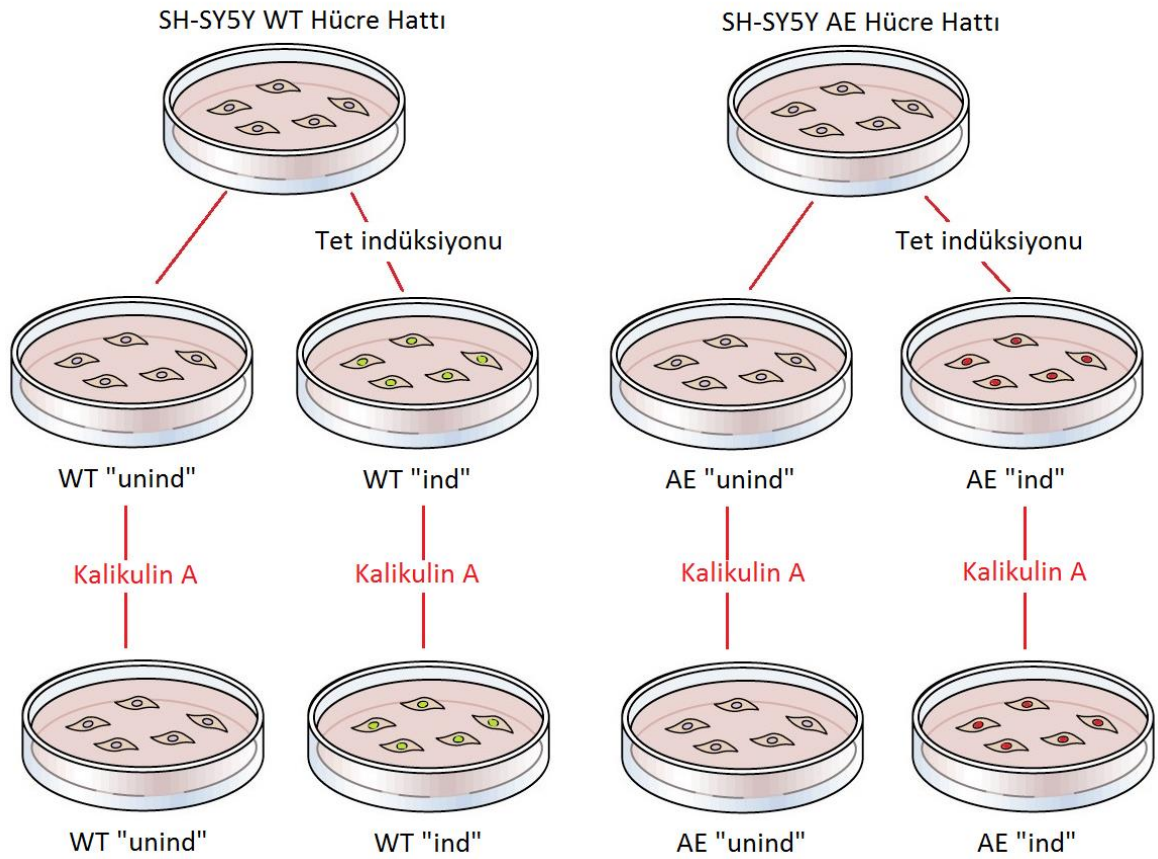
TetR⁺ hale getirilmiş olan SH-SY5Y hücreleri yabanıl ve mutant tip Parkin proteinlerini eksprese edebilen hücre hatları haline çevirilerek, yabanıl tip Parkin proteini pCDNA4/TO vektörüne klonlanmıştır. Bunun için kan örneklerinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. PARK2 geni, sentezlenen cDNA'lar (uzun-PCR metodu ile) ve EcoRI-BamHI uçları taşıyan primerler kullanılarak çoğaltılmış ve dizilenmiştir. Dizi analizi sonrasında mutasyon olmadığından (yabani tip) emin olunan PCR ürününü EcoRI-BamHI endonukleazları ile kesime tabi tutup aynı şekilde EcoRI-BamHI endonukleaz enzimleri ile kesilmiş olan pCDNA4/TO vektörüne ligasyon yapılarak yerleştirilmiştir. Sonrasında, *E. coli* DH10B hücrelerine transformasyon yapılarak klonlar elde edilmiştir. Bu klonlardan biri seçilerek, klondan transfeksiyon kalitesinde plazmid elde edebilmek için endotoksin içermeyen plazmid izolasyonu yapılmıştır. Bu plazmitin 20 µg'ı SH-SY5Y hücrelerine transfekte edilerek hücreler seleksiyona tabi tutulmuştur.

Seleksiyon süreci sonunda koloni oluşturan hücreler Western blot metodu kullanılarak yabani tip Parkin ekspresyonu için taranmıştır. İndüksiyon sonrası en fazla miktarda Parkin sentezleyen hücre ise 'SH-SY5Y WT Parkin' klonu olarak isimlendirilmiştir. Aynı işlemler tetrasiklin kontrolü altında mutant Parkin genini eksprese eden SH-SY5Y hücrelerini oluşturabilmek için de tekrarlanmıştır (Kasap ve diğ. 2009; Özgül ve diğ. 2015).

3.4. Fosfoproteomiks Çalışması için Kalikulin A Muamelesi

Hücre kültüründe hücrelerin yoğunluğu ~ % 75'e ulaştığında WT ve AE'nin ekspresyonlarının yapılabilmesi için hücre kültürüne tetrasiklin (Tet 1µl/1ml) eklenerek indüksiyon yapıldı. Daha sonra WT ve AE hücre hatları indüksiyon yapılmışlar “ind” (Tet-induced) ve indüksiyon yapılmamışlar “unind” (Tet-uninduced) olarak kendi içerisinde iki ayrı gruba ayrıldı (Çizim 3.4). 24 saat süren indüksiyon ve kültürden sonra hücreler besiyerini uzaklaştırmak amacıyla soğuk PBS ile 3 kez yıkandı. Ardından iki hücre hattında ind ve unind gruplarına, serum içermeyen besiyeri içerisine 50 nM

serin/treonin fosfotaz inhibitörü olan Kalikulin A eklenip hücreler bu besiyeri ile 35 dakika normal kültür şartlarında inkübe edildi. Kalikulin A güçlü bir fosfataz inhibitörüdür. Serin/treonin protein fosfataz 1 (PP1) ve apoptozisin kontrolünde görev alan protein fosfataz 2A (PP2A) aktivitelerini inhibe etmektedir. Bizim de Kalikulin A'yı kullanma amacımız indüksiyon yapılmış ve yapılmamış olan her iki hücre hattındaki fosforile olan amino asitler arasındaki farklılıkları gözlemlemektir.



Çizim 3.4. WT ve AE SH-SY5Y hücre hatlarına indüksiyon yapıldıktan sonra Kalikulin A eklenmesi.

3.5. Protein Özütlerinin Hazırlanması

3.5.1. SH-SY5Y Hücrelerinden Protein Özütlerinin Hazırlanması

Ökaryotik hücrelerden protein özütleri kimyasal ve fiziksel olmak üzere gerçekleştirilecek deneysel yaklaşım doğrultusunda farklı metodlar ve tamponlar kullanılarak hazırlandı. Kimyasal parçalanma için 2D-Rehidrasyon örnek tamponu (8 M üre, % 2 (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, % 0.2 3-10 ampholyte, % 0.001 bromfenol mavisi) kullanırken, fiziksel parçalanma için Blut Blander (Next Advance, ABD) cihazı ve 0.1 mm cam boncuklar (Glass Beads Next Advance, ABD) kullanıldı.

İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, PBS varlığında hücre kazıyıcı (Scraper, ABD) ile kültür kaplarından kaldırılan hücreler 1500 xg'de 10 dakika + 4°C'de santrifüj edilerek yıkandı. Çöken hücelere 1:3 oranında (v/w) 2DE-Rehidrasyon tamponu, % 1 fosfataz inhibitör 2/3 kokteyl (Sigma Aldrich, ABD) ve hücre yoğunluğunun yarısı kadar 0.1 mm cam boncuk ilave edildi. Karışım vortex ile homojen hale getirilerek "safe-lock" tüpe (Eppendorf, ABD) alındı. Ardından hücreler Blut Blander ile sırasıyla hız kademesi 8'de 5 dakika ve hız kademesi 5'de 3 dakika + 4°C'de fiziksel parçalamaya tabi tutuldu. Ardından 15000 xg'de 15 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Sıvı fazda kalan protein özütü LoBind tüplerde (Eppendorf, ABD) düşük hacimlerde bölünerek (alıklar) sıvı azotda dondurularak - 80°C'de saklandı.

3.5.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein miktarlarını ölçmek için Bradford Assay (Bradford, 1976) yöntemi kullanıldı. Ölçülecek protein özütünden 1 µl alınarak 19 µl standart tamponu ile karıştırıldı. Karışım üzerine 1ml 1X Bradford Reagent (Bio-Rad, ABD) eklenerek vortexlendi ve karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnekler Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile 595 nm'de ölçüldü. Örneklerin ölçülen protein konsantrasyonları daha önce 595 nm'ye göre hazırlanmış BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler 3 defa tekrarlandı ve bu tekrarların ortalamalarından elde edilen sonuçlar protein örneklerinin konsantrasyonları olarak kabul edildi.

3.5.3. Proteinlerin Çöktürülmesi

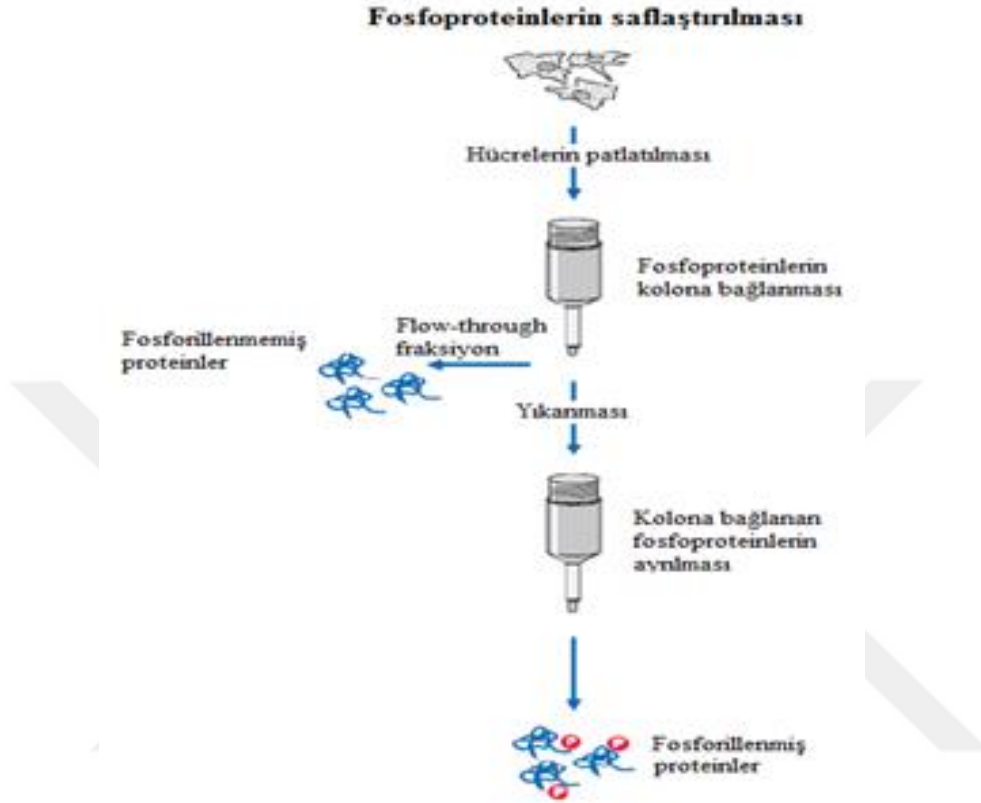
Protein örneklerinin IPG striplerde iyi fokuslanabilmesi ve 2D jellerde daha iyi ayırma tabi tutulabilmesi için tuzlardan, lipidlerden, deterjanlardan, nukleik asitlerden ve fenolik birleşikler gibi kirleticilerden temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaç için “BioRad ReadyPrep 2-D Clean-up Kit” i (Bio-Rad, ABD) kullanılarak proteinler çöktürüldü. Çöktürme işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi, protokol şu şekilde özetlenebilir. Konsantrasyonu 1-500 µg arasında, final hacmi 100 µl olan protein örneğinin her biri 1.5 ml lik mikro santrifüj tüpe aktarıldı. Protein örneğine 300 µl çöktürme solüsyonu 1 eklendi, iyice vorteks yaparak 15 dk buzda bekletildi. Karışımın üzerine 300 µl çöktürme solüsyonu 2 eklendi, iyice vorteks yaparak 15 dk buzda bekletildi. Sıkı bir pellet oluşturma amacıyla yüksek hızda ($> 12000 \times g$) 5 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda pelletler dağılmadan hemen buz üzerine aktarıldı. Çöken proteinlerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrıldı. Ardından pelletin üstüne 40 µl yıkama reaksiyon solüsyonu 1 ekleyip yüksek hızda ($> 12000 \times g$) 5 dk $+4^{\circ}\text{C}$ da santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yıkama reaksiyon solüsyonu pipetle uzaklaştırıldı.

Pellet üstüne 25 µl ReadyPrep proteomik ultura saf su ekleyip, 10–20 saniye vorteks edildi. Ardından 1 ml yıkama reaksiyon solüsyonu 2 (önceden -20°C 'de bir saat bekletiliyor) ve 5 µl katkı solüsyonu eklenip, 1 dakika vorteks edildi. Tüpler -20°C 'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 10 dakikadan bir 30 saniye vorteks yapıldı. İnkübasyon bitikten sonra, tüpler yüksek hızda 5dakika santrifüj edildi. Sıvı kısmı dikkatli şekilde uzaklaştırıldı. Tüplerin kapağını 5 dk oda sıcaklığında açık bekleterek kurutuldu. Pellete 2-D rehidrasyon tamponu içerisinde çözülerek yüksek hızda oda sıcaklığında 5dk santrifüj edildi. Son olarak protein örnekleri temizlendikten sonra yeni tüpe aktarılıp kullanma amacıyla -80°C da dondurup kaldırılırdı.

3.5.4. Fosfoproteinlerin Saflaştırılması

Kompleks hücre lizatlarından fosforillenmiş proteinlerin özel olarak saflaştırılması için “PhosphoProtein Prufication Kit” i (QIAGEN, Almanya) kullanıldı. Çizim 3.5'de kısaca gösterildiği gibi fosforillenmiş olan proteinler, kolonda bulunan fosfoprotein

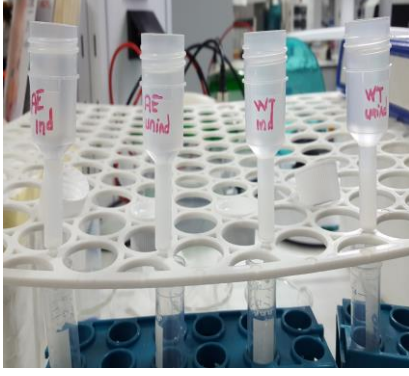
saflaştırma reçinesine karşı yüksek şekilde bağlanırken, fosforile olmayan proteinler reçineye bağlanmaz ve bu nedenle kolonda tutulamayarak geçerler (flow-through). Kolona bağlı kalan fosfoproteinler ise uygun yıkamalar ile fraksiyonlar halinde toplanırlar.



Çizim 3.5. Fosfoprotein saflaştırma prosedürü (PhosphoProtein Purification Handbook QiaGen 2002).

Fosfoproteom çalışması için aynı şartlarda çoğaltılan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve kazıcı vasıtası ile hücreler toplandı. 20 mM HEPES pH 7.4'le iki kez yıkandı. Yüksek hızda ($> 15000 \times g$) 5 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pelletler dağılmadan hemen buz üzerine aktarıldı. Çöken hücrelerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrıldı. Hafif pipetleme ile 10^7 hücreye karşılık olan hücre pelletinin üzerine 5 ml Proteaz inhibitörleri ve Benzonaz Nükleaz içeren liziz tamponu eklendi. (CHAPS içeren Fosfoprotein liziz tamponundan 5 ml alıp bir adet fosfataz inhibitor tableti ve 10 μl Benzonaz stok solüsyonuna ilave edilip karıştırıldı.) Ardından $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk inkübe edildi ve her 10 dk'da bir vorteks yapıldı. İnkübasyon sonrası hücre lizatı $10000 \times g$ 'de

+4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sırasında fosfoprotein saflaştırma kolonu hazırlandı (Çizim3.6). Kolonun içerisindeki tampon dışarıya aktarıldı. Her bir kolon 4 ml % 0.25 CHAPS içeren fosfoprotein liziz tamponu eklenerek yıkandı. (35 ml FosfoProtein Liziz Tamponu ve 75 µl CHAPS Stok Çözeltisine (% 10 [w/v]) 875 µl CHAPS Stok Çözeltisi (% 10 [w/v]) 3 ml FosfoProtein Elüsyon Tamponu ilave edilerek nihai bir konsantrasyon elde edildi. Her iki tamponda % 0.25 (w/v) CHAPS nihai bir konsantrasyon sağlandı.). Süpernatant toplandı ve protein konsantrasyonu ölçüldü. Bundan sonraki fosfoprotein saflaştırma çalışmaları oda sıcaklığında gerçekleştirildi (15-25°C). Protein lizatından 2.5 mg protein alınarak protein konsantrasyonu 0.1 mg / ml olacak şekilde % 0.25 CHAPS içeren fosfoprotein liziz tamponu ile dilüe edildi (son hacim 25 ml). Protein konsantrasyonu kit için uygun hale getirilirken, fosfoprotein saflaştırma kolonu hazırlandı (Çizim3.6). Kolonun içerisinde bulunan tampon akıtıldı ve her bir kolona 4 ml % 0.25 CHAPS içeren fosfoprotein liziz tamponu eklenerek kolonlar yıkandı. İlk önce lizatın yarısı (12.5 ml) fosfoprotein saflaştırma kolonunun üst haznesine boşaltıldı. Hemen hemen tüm lizat kolona girdiğinde, lizatın ikinci yarısını ekleyerek herhangi bir güç uygulanmaksızın kolondan geçirildi. Bu adım yaklaşık 50 dakika sürmesi fosforile olmuş proteinlerin tam olarak bağlanması için yeterli süre sağlamaktadır. Kolondan akıp geçen ilk fraksiyon fosforile olmamış proteinleri içermektedir (flow-through fraction). Tüm flow-through uzaklaştırmak için % 0.25 CHAPS içeren fosfoprotein liziz tamponundan 6 ml ekleyip kolon yıkandı. Kolona bağlanan fosfoproteinleri indirip toplamak için ise % 0.25 CHAPS içeren fosfoprotein elüsyon tamponundan 500 µl kolona eklendi. Elüsyon aşaması 4 kez tekrarlanarak kolona bağlanan tüm fosforillenmiş proteinler toplandı. Elüsyonlar sonunda konsantrasyonu 5 ayrı fraksiyonda iyice dilüye olan fosfoproteinler birleştirildi ve cut-off limiti 5 kDa'luk 3 ml'lik Stirred Cell (Amicon, Millipore, ABD) kullanılarak konsantre edildi ve örnekler toplanarak -80°C'ye kaldırıldı (Çizim 3.7).



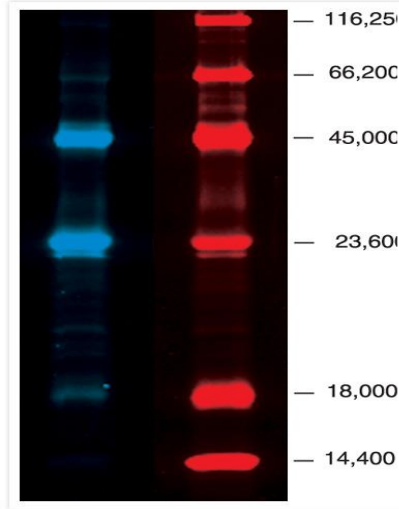
Çizim 3.6. Fosfoprotein saflaştırma kolonu her bir örnek için hazırlandı.



Çizim 3.7. Örneklerin filtre edilmesi.

3.5.5. PeppermintStick Fosfoprotein Markörü

Bu tezde yapmış olduğumuz Fosfoproteom çalışmalarının tamamında fosforile olmuş proteinlerin moleküler ağırlık standartlarını göstermek için PeppermintStick Fosfoprotein (Molecular Probs, ABD) markörü kullanıldı. PeppermintStick fosfoprotein markörü Çizim 3.8’de gösterildiği gibi moleküler ağırlığı 14.400 ila 116.250 dalton arasında değişen, fosforile olan ve fosforile olmayan proteinlerin bir karışımıdır. Poliakrilamid jel elektroforezi ile ayırım yapıldığı zaman markörümüzde iki adet fosforile olan, dört adet ise fosforile olmayan protein bantı gözükmemektedir. Bu markörün moleküler ağırlık olarak kullanılmasının yanı sıra fosforile olmuş proteinlerin tayin edilmesinde pozitif ve negatif kontrol olarak da kullanılmaktadır.



Çizim 3.8. PeppermintStic Fosfoprotein Markörü; ProQ Diamond boyası ile boyandığında fosforile olmuş protein bandı gözükmetedir (Mavi bant). PeppermintStic Fosfoprotein Markörü SYPRO Ruby boyasıyla boyandığında ise jeldeki tüm proteinlerin bandı gözükmetedir (Kırmızı bant).

3.5.6. SDS-PAGE Protein Jel Elektroforezi

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kesintili SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Çizelge 3.2’de verilen kimyasallar kullanılarak hazırlandı. Çizelge 3.2.’de verilenden farklı jel yüzdesi kullanılacak ise konsantrasyon hesaplanması için <http://www.changbioscience.com/calculator/sdspc.htm> web adresinden faydalanıldı.

Çizelge 3.2. SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları.

Kullanılan Kimyasallar	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 4)
dd H ₂ O	3.3 ml	3 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris pH 6.8	-	1.25 ml
% 10 SDS	100 µl	50 µl
% 30 Akrilamid/BisAk	4 ml	670 µl
%10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Toplam	10 ml	5 ml

Ayırma jeli 50 ml'lik Falcon tüp içerisinde hazırlandıktan sonra kendinden 1mm aralıklı (spacer) kalın ve ince camlar arasına döküldü ve üzerine nazıkçe izopropanol (300 µl) konularak jelinyüzeyinin düzleşmesi sağlandı ayrıca hava ile olan teması da engellendi. Bu şekilde polimerizasyon hızlandırıldı ve aynı zamanda pürüzsüz bir yüzey elde edildi. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra izopropanol döküldü ve jelin yüzeyi saf su ile yıkandı. Jel üzerinde cam plakalar arasında kalan su kurutma kağıdı yardımıyla tamamen uzaklaştırıldı. Yükleme jeli hazırlanarak polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine döküldü ve cam plakalara uygun 1 mm genişliğindeki teflon tarak yerleştirildi. Yükleme jeli de polimerize olduktan jeller ya hemen kullanıldı ya da daha ileride kullanılmak üzere nemli kurutma kağıdı ile sarılarak +4°C'de saklandı. SDS jeller yürütüleceği zaman cam plakalar elektrotların bulunduğu Tetracell elektroforez (BioRad, USA) tanklarına yerleştirildi. Elektroforez tankları uygun seviyeye kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu konularak yürümeye hazır hale getirildi. Yüklenmek istenen protein özütlerinin üzerlerine 6X yükleme tamponundan (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, Glycerol % 99.7), % 10 SDS, β-Mercaptoethanol, % 0.5 (w/v) Bromphenol blue, dH₂O) 1X olacak şekilde eklenerek 95°C'deki su banyosunda 4 dakika kaynatılarak proteinlerin ileri denatürasyonları sağlandı. Kaynatma süresi sonunda örnekler buza alındı ve kısa bir santrifüj sonrası mikropipet yardımıyla jel içerisindeki kuyucuklara yüklendi. Jel, 180V akım verilerek 60 dakika boyunca yürütüldü. Yürümesi tamamlanan jel camlar arasından çıkarılarak yapılacak çalışmaya göre ya % 40 metanol % 10 asetik asit fiksasyonu ardından boyandı ya da western blot için kullanıldı.

3.5.7. Western Blotlama

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı ve nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef protene özgü antikorlarla analiz edildi. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponun içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi. Bekleme esnasında nitroselüloz membran ve Whatman kağıtları da transfer tamponunda ıslatıldı. Süre sonunda transfer cihazının demir levhaları arasına alttan üste doğru sırasıyla 2 kat Whatman kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 2 kat Whatman kağıdı olmak üzere (–) ve (+) kutuplara dikkat edilerek katmanlar halinde

yerleştirildi. Katlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek 25 V sabit akımda 30 dakika boyunca transfer gerçekleştirildi. Transferin ardından membran proteinleri boyayan Ponceau S boyası ile boyanarak western transferinin kalitesi kontrol edildi. Protein bantları gözlemlendikten sonra boya saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve membrane % 5 NFDM/TBS-T bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılarak sırasıyla 15, 5, 5 dakika olmak üzere 3 kez TBS-T ile yıkandı. Üreticinin tavsiye ettiği dilüsyonda birincil (Çizelge 3.3) antikör TBS-T içerisinde hazırlandı ve membran bu tampon içerisinde +4°C’de gece boyu nazıkçe çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün önceki yapılan TBS-T ile yıkama işlemi tekrarlandı ve üreticinin tavsiye ettiği ikincil antikör TBS-T içerisinde seyreltildi ve membran bu tampon içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmayan antikörler uzaklaştırıldı. Görüntülemeye yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans (Biorad, ABD) kullanıldı. Kemilüminesans görüntüleme için Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak membran yüzeyine konuldu ve yüzeyin tamamının çözelti karışımı ile temas etmesi sağlandı. Membran streç film arasına alınarak fazla sıvı peçete yardımı ile uzaklaştırıldı. Görüntüleme için hazırlanan membran Hypercasette (Amersham, Biosciences) içerisine sabitlendi. Karanlık odada membran üzerinde oluşan ışımayı algılayabilecek yüksek duyarlılık bir X-Ray filmi yerleştirildi. Sinyalin filmi yakması için 1-3 dakika beklendi. Bekleme süresi sonunda film membran üzerinden alınarak HyperFilm developer solüsyonunda 1 dakika yıkanarak oluşan bantlar izlendi. Ardından saf su ile yıkandı ve HyperFilm fiksasyon solüsyonunda 1 dakika bekletilerek görüntü sabitlendi. Fiksasyon sonrası film saf su ile yıkanarak gözlenen bantlar analiz edildi.

Çizelge 3.3. Western Blot analizinde kullanılan primer (1°) ve sekonder (2°) antikorların listesi.

1° Antikor	2° Antikor
β-Actin Mouse (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Biorad, ABD) (1:20000)
Parkin (H-300): sc-30130 (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Biorad, ABD) (1:20000)

3.6. Kullanılan Proteomiks Yöntemler

3.6.1. 2DE- Jel Elektroforezi

Ökaryotik hücreler toplanıp protein özütleri hazırlandıktan sonra konsantrasyonu ölçülerek 2DE jel elektroforezi ile ayırma tabi tutuldu. Örneklerin birinci boyuttaki ayırımları 11 cm'lik pH 3-10 linear IPG stripler (pH 3-10 ReadyStrip, BioRad) kullanılarak yapıldı. Öncelikle her bir örnekten 250 µg protein alınarak toplam hacmi 200 µl olacak şekilde üzerlerine 2DE rehidrasyon örnek tamponu eklendi. Ayrıca bu karışıma son konsantrasyonları % 1 TBP ve % 1 ampholyte striplerin pH aralığına uygun olarak (BioRad, ABD) eklenerek vortexlendi ve örneklerimiz birinci boyutta fokuslanmaya hazır hale getirildi. Örnekler fokuslama öncesi rehidrasyon için rehidrasyon traylerine konularak üzerlerine uygun stripler dikkatlice yerleştirildi. Rehidrasyon trayleri PROTEAN IEF (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilerek 20°C ısıda 30 dakika protein örneğinin strip tarafından emilmesi beklendi, ardından striplerin kurummasını ve örneğin buharlaşmasını engellemek amacıyla 2-3 ml kadar mineral yağı striplerin üzerine eklendi ve gece boyu pasif rehidrasyona devam edildi. Rehidrasyonun ardından IPG stripler üzerlerinde kalan mineral yağ mümkün olduğunca uzaklaştırılarak fokuslama trayine alındı. Striplerin üstü yeniden mineral yağ ile kapatılarak izoelektrik fokuslamaya geçildi. PROTEAN IEF (BioRad, ABD) fokuslama cihazında IPG striplere adım adım artan voltaj programı uygulanarak 20°C'de odaklamaya tabi tutuldu. Odaklama için, üç adımlı; 250 V'de 20 dakika, 8000 V'de 2 saat 30 dakika ve ardından 32000 Vhr programı kullanıldı. Fokuslama sonrasında stripler 2DE stripleri yıkama tamponu I (6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, %

2 SDS, % 20 Gliserol, % 2 (w/v) DTT) ve 2DE stripleri yıkama tamponu II (6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, % 2 SDS, % 20 Gliserol, % 2.5 (w/v) iyodaasetamid) çözeltileri içerisinde 20'şer dakika süreyle çalkalanarak yıkandı. İzoelektrik noktasına göre birinci boyutta ayrımları tamamlanan örneklerin ikinci boyuttaki ayrımları % 12 Bis-Tris precast jel (Biorad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Fokuslanmış IPG stripler jellere yerleştirildiler, Peppermintstick marker bir elektrowick'e emdirilerek uygun şekilde IPG striplerin yanına jeller içerisine yerleştirildi ve ardından MOPS buffer bulunan tanklarda elektroforeze tabi tutuldu.

3.6.2. Fosfoproteinlerin ProQ Diamond ile Boyanması

İkinci boyutta ayırmadan sonra jeller özel boyama kaplarına alındı. Yalnızca fosforile olmuş proteinleri görüntüleyebilmek için jeller boyama detayları Çizelge 3.4'te verildiği şekilde ProQ Dimond prosedürüne göre boyandı. Jellerin görüntülenmesi UV kaynağı kullanılarak VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi. Ardından aynı jeller tüm proteinlerin görüntülenmesi amacı ile de detayları Çizelge 3.5'te verilen Sypro Ruby ile boyandı. Fosfoproteinlerin ve total proteinlerin karşılaştırmalı analizleri PDQuest Advanced programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter otomatize robotik sistemi (BioRad, ABD) ile gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4. Fosfoproteinlerin ProQ Diamond boyası ile boyanma prosedürü.

ProQ Diamond	Kullanılan Kimyasal Çözeltiler	Tris-Glisin Jelleri İçin
Adım 1: Fiksasyon	% 50 Metanol % 10 Asetik Asit	100 ml, 30 dakika 100 ml, gece boyu
Adım 2: Yıkama	Ultra Saf Su	100 ml, 10 dakika 3 kez
Adım 3: Boyama (karanlık)	ProQ Diamond Boyası	60 ml, 60-90 dakika
Adım4: Boyanın çıkarılması (karanlık)	% 20 Asetonitril 50 mM Sodyum Asetat pH 4	80-100 ml, 30 dakika 3 kez
Adım 5: Yıkama (karanlık)	Ultra Saf Su	100 ml, 5 dakika 2 kez

Çizelge 3.5. Sypro Ruby ile boyama prosedürü.

SyroRuby	Kullanılan Kimyasal Çözeltiler	Tris-Glisin Jelleri İçin
Adım:1 Fiksasyon	% 50 Metanol % 7 Asetik Asit	Distile su ile 100 ml`e tamamlama 30 dk
Adım:2 Yıkama	100 ml distile su	3 kez 10 dk
Adım:3 Boyama (karanlık)	Sypro Ruby boyası	30 ml gece boyunca
Adım:4 Boyanın çıkarılması (karanlık)	% 10 Metanol % 7 Asetik Asit	Distile su ile 100 ml`e tamamlama 30 dk
Adım:5 Yıkama (karanlık)	100 ml distile su	2 kez 5 dk

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

SyproRuby boyası ile boyanmış protein spotları, SDS jellerden Spot-cutter otomatize robotik sistem (BioRad, ABD) ile kesilerek 96 kuyucuklu kesim tabaklarına yerleştirildi. Protein spotları yani jel parçaları teker teker 96 kuyucuklu kesim tabaklarından alınarak 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak, üreticinin tavsiye ettiği şekilde, In-gel Tryptic Digestion Kit (Thermo Scientific, ABD) ile muamele edildi. Protein spotları 150 µl % 40 asetonitril ve % 60 amonyum bikarbonat (50 mM pH 8.0) çözeltisi (yıkama tamponu) ile 15 dakikalık periyotlarla yıkandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra spotlar üzerine 50 mM'lik TCEP çözeltisi eklendi ve 60°C'de 10 dakika inkübe edilerek disülfid bağlarının kırılması sağlandı. Ardından çözelti pipet yardımıyla çekilerek atıldı ve bağların tekrar kurulmaması için oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat alkilleme reaksiyonu gerçekleştirildi. Alkilleme reaksiyonu için 10 mM'lik İyodo Asit Amit (IAA) kullanıldı. Bu işlemin ardından spotlar tekrar yıkama tamponu ile 15 dakika yıkandı. Ardından yıkama tamponu uzaklaştırıldı ve spotların üzerine asetonitril eklenerek 15 dakika boyunca dehidrasyon sağlandı. Dehidrasyonun sonunda asetonitril pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve spotların üzerine 10 ng/µl olacak şekilde 25 µl tripsin solüsyonu eklenerek 37°C'de geceboyu kesim yapıldı. Ertesi sabah, kesim işleminin ardından, üst sıvılar temiz tüplere aktarıldı. Tüplerde kalan spotların üzerine % 10'luk TFA çözeltisi eklenerek tüpteki sıvının tamamı kesim reaksiyonunun alındığı tüplerle birleştirildi. Peptit parçalarının bulunduğu kesim reaksiyonu speed-vakum (Eppendorf, Almanya) cihazı ile yaklaşık 45 dakika 60°C'de 2500xg hızda çevrilerek kurutuldu.

3.6.4. Peptit Örneklerinin MALDI TOF/TOF Analizi için Hazırlanması

Speed vakum cihazından alınan peptit örneği % 0,1'lik 10 µl TFA solüsyonu ile çözüldü. Peptit parçaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde ZipTip kolonuna bağlandı. Protokol kısaca şu şekilde uygulanmıştır: İlk önce ZipTip kolonu 10 µl asetonitril ile 3 kez yıkanarak ıslatıldı. Ardından da 10 µl % 0.1 TFA solüsyonundan 3 kez geçirilerek peptit bağlanması öncesi kolon dengelendi. Dengeleme sonrası peptitlerin kolona bağlanması için örnekler ZipTip kolonundan yavaşca 20 kez geçirildi. Bağlanma sonrası kolona bağlanmayan peptitleri uzaklaştırmak amacı ile 10 µl % 0.1 TFA ile kolon 3 kez aspire

edildi. Bağlanan peptitler 1.4 µl Matriks (α -Cyano-4hydroxycinnamic) solüsyonu kullanılarak indirilmiş edildi ve MALDI Plate'e yerleştirildi.

3.6.5. MALDI TOF/TOF Analizi

Ziptip sonrası MALDI plate'e yerleştirilen örneklerin AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analizleri yapıldı. MALDI TOF/TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içerisinde ayrıştırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olmaktadır. Cihazdan elde edilen verilerin online MASCOT data bankasından PROTEIN PILOT programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlendi. Elde edilen proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve ilişkili yolları belirlemek için ise STRING ve PANTHER programları kullanıldı.

MALDI kalibrasyonu olarak eksternal veya internal kalibrant kullanıldı ve her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanıldı. Elde edilen tüm spektralar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksede modifikasyon olarak carbamidomethyl (cysteine), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlenerek MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

3.6.6. Analizlerde Kullanılan Yazılımlar ve Veri Bankaları

- PD Quest Advanced Programı (Bio-Rad, ABD)

Bu yazılım sayesinde jeller üzerinde hem fosfoprotein boyası ile boyanan fosfoproteinler hem de total proteom boyası sonrası boyanan proteinler analiz edildi. Yine bu yazılım sayesinde yerleri belirlenen protein spotları otomatik spot kesici (BioRad) sayesinde otomatize olarak kesildi.

- SwissProt (<http://web.expasy.org/>)

Bu data bankaları tanımlanan proteinlere ait fonksiyonel bilgilerin elde edilmesi, amacıyla kullanıldı.

- Mascot Programı (www.matrixscience.com)

MALDI TOF/TOF analizi sonucu elde edilen peptidlere ait rakamsal m/z oranlarını kullanarak protein tanımlamada kullanıldı.

- STRING Analizi (<http://string-db.org>)

Tanımlanan proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimlerini ve hangi hücrel yolaklar içerisinde yer aldıklarını ortaya koymak için kullanıldı.

- Panther (<http://pantherdb.org/>)

Tanımlanan proteinlere ait metabolik işlev, moleküler fonksiyon, KEGG analizi gibi biyolojik işlevlerine yönelik analizlerin yapılmasında kullanıldı.

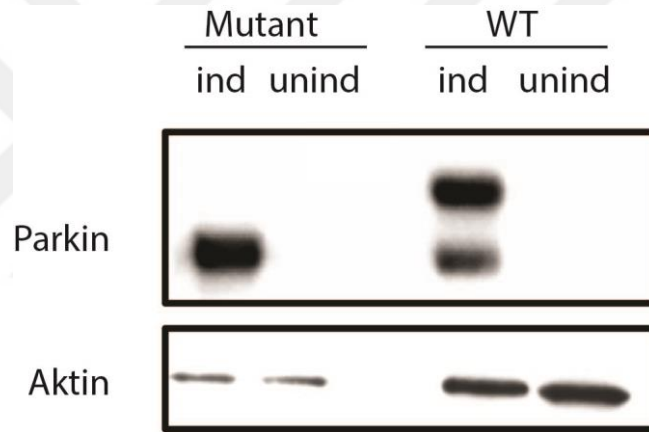


4. BULGULAR

4.1. SH-SY5Y Hücre Hatlarından WT ve Mutant Parkin Ekspresyon Görüntülenmesi

Bu tez çalışmasında amacımız WT ve mutant tip Parkin proteini ifade eden nöroblastoma hücrelerinde protein fosforilasyon seviyesinde meydana gelen değişimleri 2D tabanlı proteomik yaklaşımlar kullanarak saptayabilmektir.

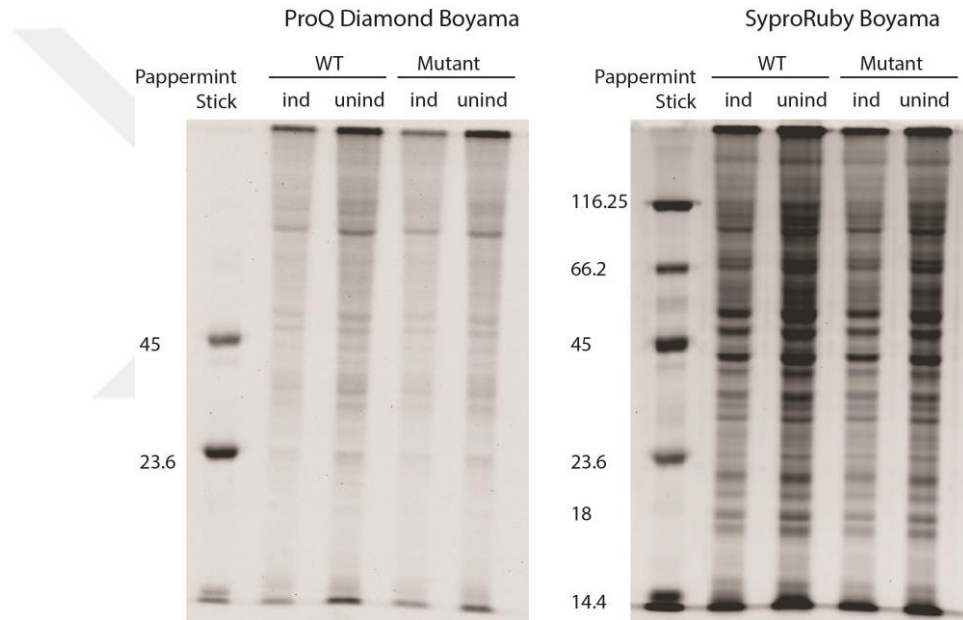
Bu amaçla yaptığımız ilk deneyde laboratuvarımızda daha önce oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hatlarının WT ve mutant Parkin ekspresyon kapasitelerini anti-Parkin antikoru ve WB yaklaşımı kullanarak test edildi. Hücreler kültürde % 70 yoğunluğa geldikten sonra Tet ile 16 saat boyunca indüklendi. İndüksiyon sonrasında toplanılan hücrelerden Parkin ekspresyonunu gösterildi (Çizim 4.1).



Çizim 4.1. WT ve mutant Parkin ekspresyon eden SH-SY5Y hücre hatlarının anti-Parkin antikoru ile WB analizleri. Anti-Aktin antikoru eşit yüklemenin kontrolü olarak kullanılmıştır (kontrol).

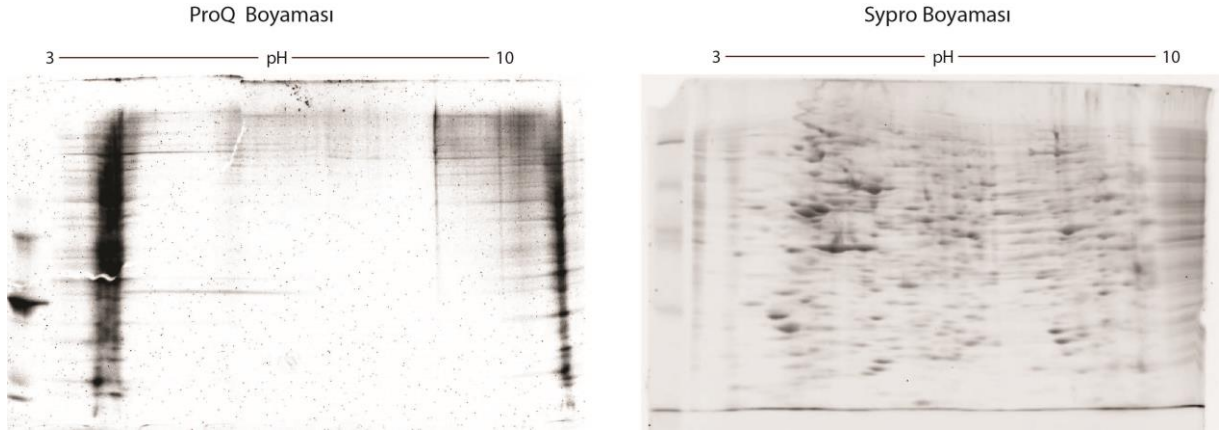
Hücrelerin 16 saat Parkin ekspresyonu sonrasında hem WT ve hem de mutant Parkin proteinlerini beklenen seviyede eksprese ettikleri ve ekspresyonun hücrelerce sıkı kontrol altında tutulduğu görüldü. Bu sıkı kontrol bize fosfoproteom seviyesindeki değişikliklerin Parkin ekspresyonu sonrasında takip edilebileceğini gösterdi.

Bu sonuçlardan sonra kültüre edilen hücrelerden hazırlanan protein özütleri ile SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı. Elde edilen jeller protein fosforilasyon seviyesini görebilmek için ProQ Diamond fosfoprotein boyası ile boyandı. Karşılaştırma amaçlı aynı jeller total protein boyası olan Sypro Ruby ile boyandı (Çizim 4.2). ProQ Diamond ile boyanan jellerde normalizasyonu sağlayabilmek ve boyamanın doğru yapıldığından emin olabilmek için içeriğinde iki adet fosforillenmiş protein bulunan Peppermint Stick marker kullanıldı. ProQ Diamond ile boyanan jellerde Sypro Ruby ile boyanan jellere nispeten çok daha az sayıda protein bandı görüldü. Bu sonuç bize ProQ Diamond'ın fosfoproteinleri seçici olarak boyadığını gösterdi. Bu bulgu deneyleri bir sonraki adıma taşıma konusunda yeterli bir bulgudur.



Çizim 4.2. Hücre kültüründen elde edilen proteinlerin fosforilasyon seviyesini görebilmek için SDS jeller ProQ Diamond fosfoprotein boyası ve bir de total protein boyası olan Sypro Ruby ile boyandı.

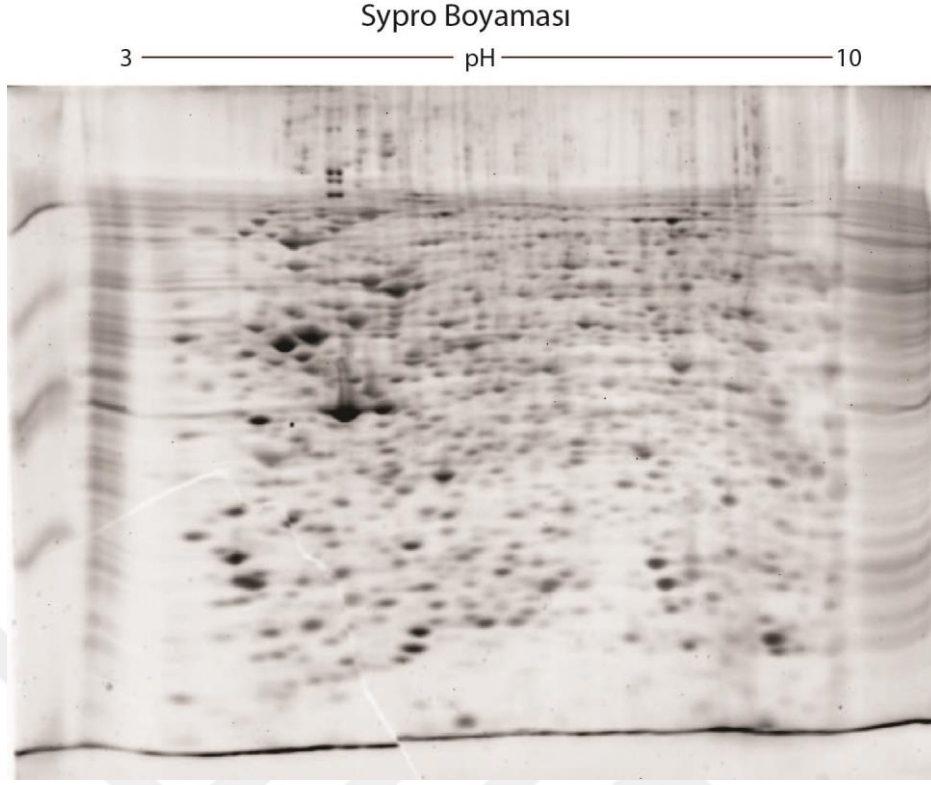
Bir sonraki adımda karşılaştırmalı proteom analizine imkan veren 2D jel elektroforezi çalışmalarına başlandı. İlk yapılan deneylerde 11 cm'lik pH3-10 pre-cast jeller (BioRad) kullanıldı. Yürütülen 2D jellerin ProQ Diamond ile boyamalarında istenilen çözünürlükte protein ayırımı gözlemlenemedi. Aynı jeller Sypro Ruby ile boyadığında ise çözünürlüğün çok daha iyi olduğu tespit edildi (Çizim 4.3).



Çizim 4.3. Yapılan ve iyi sonuç vermeyen ilk 2D jellere ait ProQ ve Sypro boyamaları.

Bu çözünürlük problemini aşabilmek için hazır jeller yerine çözünürlüğü daha yüksek olduğu düşünülen laboratuvarımızda hazırladığımız 7 cm'lik % 12'lik SDS-PAGE jeller kullanıldı. Ancak bu denemeden elde edilen sonuçlar da çözünürlük açısından yeterli değildi.

2D jellerde çözünürlüğü arttırmak için protein özütlerinin temizlenmesi yolu denendi. Bu amaçla proteinler TCA-aseton çöktürmesine tabi tutuldular ve çöken proteinler doğrudan 2D jel rehidrasyon tamponunda çözülerek birinci ve ikinci boyutta ayrıştırıldılar (Çizim 4.4).

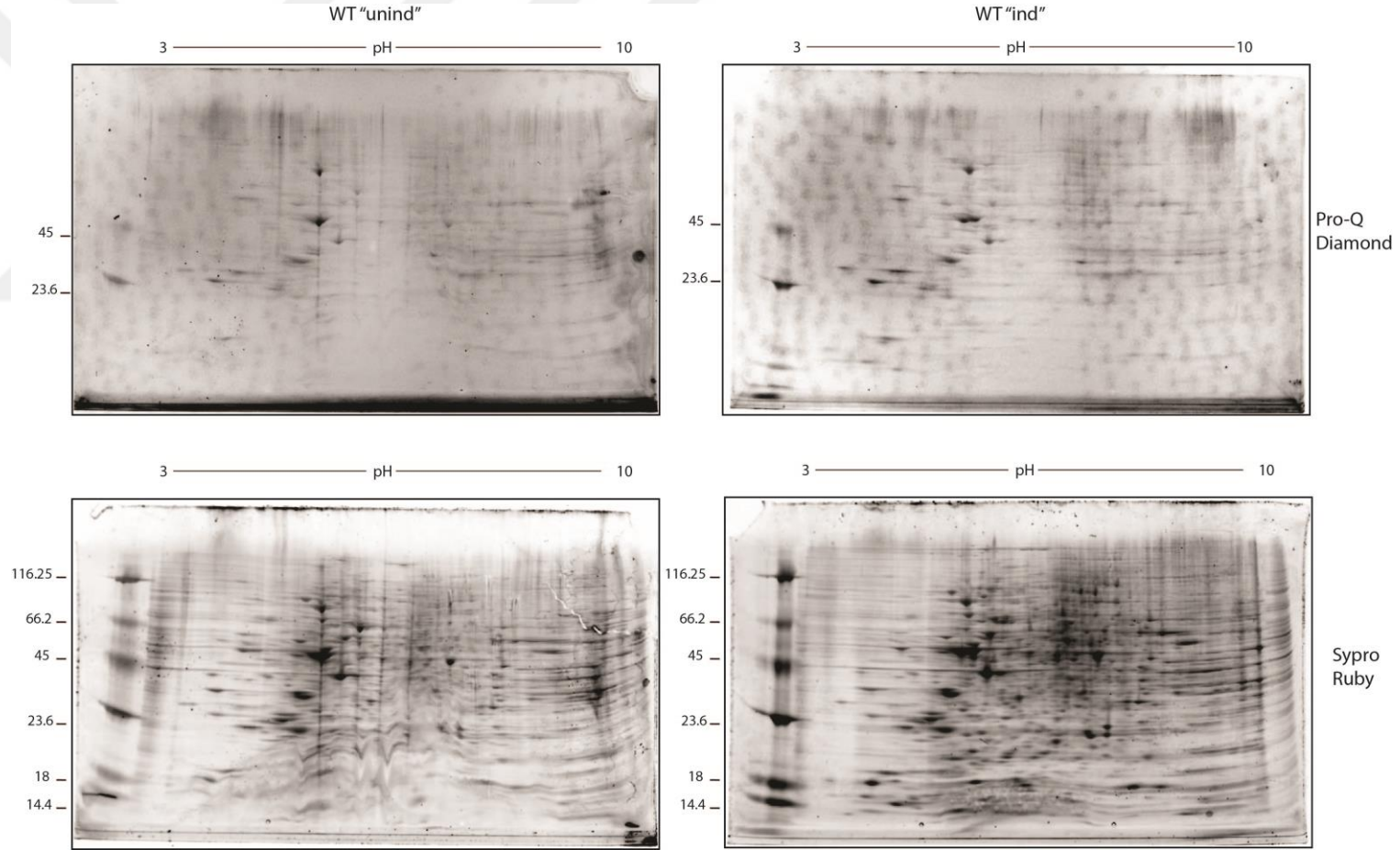


Çizim 4.4. TCA-aseton çöktürmesine ile elde edilen proteinlerin 2D jel elektroforezi.

2D jellerin çözünürlüğünde artış görülmesi nedeni ile bundan sonraki karşılaştırılmalı fosfoproteom analizlerinde proteinlerin önceden çöktürülerek hazırlanmasına ve 2D jellerde yürütülmesine karar verildi.

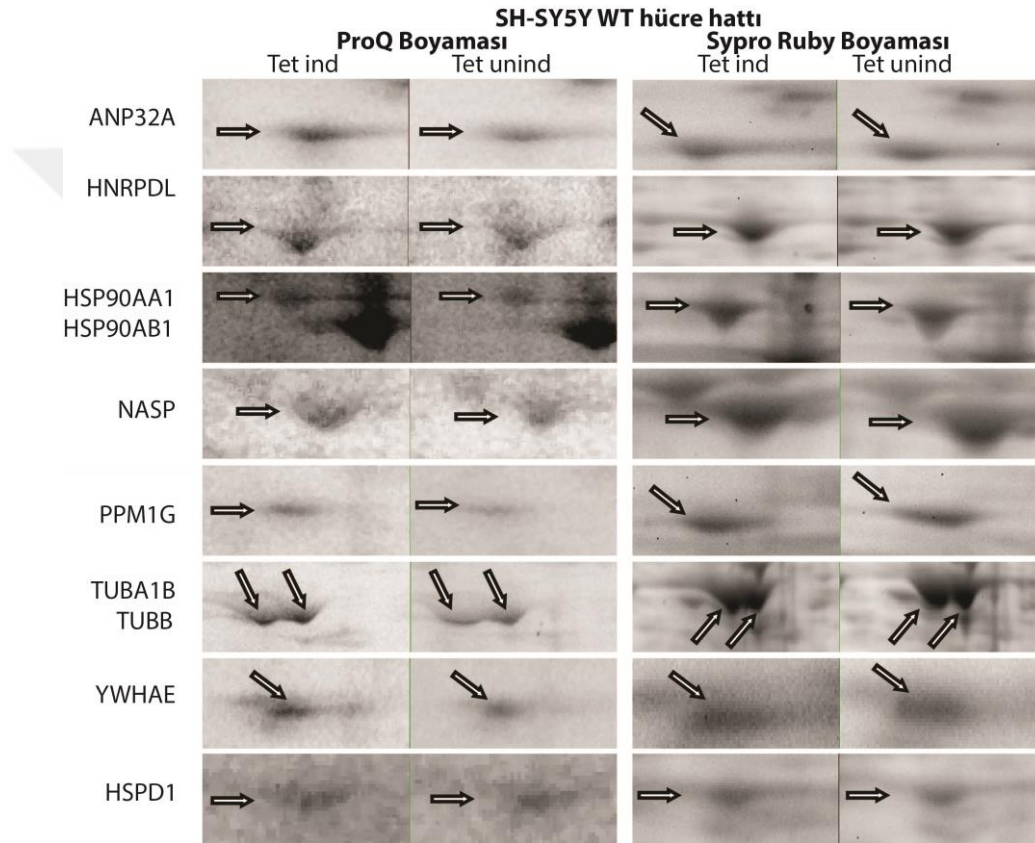
4.2. WT Parkin ifadesi sonrası fosfoprotein profilindeki değişiklikler

Bu amaçla WT Parkin eksprese eden ve etmeyen hücrelerden elde edilen protein özütleri hazırlandı, proteinler çöktürülerek 2D jellerde yürütüldü. Jeller önce ProQ Diamond fosfoprotein boyası ile boyandı, jel görüntüleri kaydedildi ve sonrasında total protein boyası olan Sypro Ruby ile boyandı (Çizim 4.5).



Çizim 4.5. WT Tet indüksiyonu yapılmış (ind) ve yapılmamış (unind) hücrelerden elde edilen proteinlerin, ProQ ve Sypro boyaması yapılmış 2D jelleri.

PDQuest Advance yazılımı kullanarak yapılan spot karşılaştırması sonrasında 9 adet proteinin fosforilasyon seviyelerinde indüksiyon sonrası artış olduğu görüldü. Bu regülasyon seviyeleri arasındaki farkın net bir şekilde gösterilebilmesi için bu spotlara ait ProQ Diamond boyamaları ile Sypro Ruby boyamaları karşılaştırıldı. Regülasyonun olduğu ProQ boyamalarının total protein boyası olan Sypro Ruby’de olmaması beklendi. Regülasyon gözlenen spotlar tek tek incelendiğinde değişimlerin sadece ProQ boyamalarında olduğu doğrulandı (Çizim 4.6).



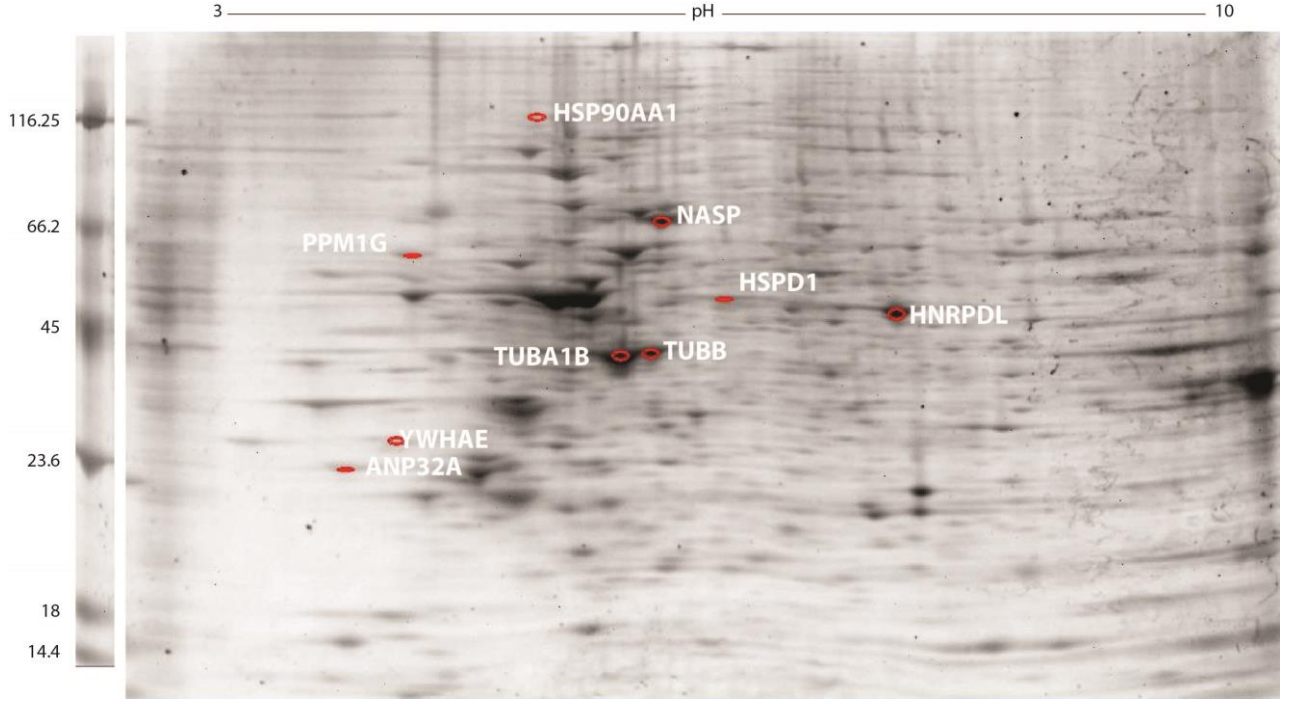
Çizim 4.6. WT ind hücrelerinde ekspresyon seviyesinde artış gözlenen protein spotlarının ProQ ve Sypro boyamalarının yakın plan karşılaştırılmaları.

WT Parkin indüksiyon sonrası artış gözlenen spotlar jellerden kesildikten sonra MALDI TOF/TOF analizi ile tanımlandı (Çizelge 4.1. Çizim 4.7).

Çizelge 4.1. WT Parkin indüksiyonu sonrası elde edilen fosfoproteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları.

SSP No	AC No	Protein Adı	Moleküler Ağırlığı (Da)	MALDI Skoru	Beklenme Skoru (Expectation)	Eşleşen Peptidler	pI	Dizi Eşleşmesi (%)	Tanımı
4606	P07900	HSP90AA1	84607	525	6.4e-049	42	4,94	43	Heat shock protein HSP 90-alpha
5603	P08238	HSP90AB1	83212	337	4,00E-30	27	4,97	28	Heat shock protein HSP 90-beta
5410	P68363	TUBA1B	50120	451	1.6e-041	23	4,94	39	Tubulin alpha-1B chain
4407	P07437	TUBB	49639	623	1e-058	40	4,78	64	Tubulin beta chain
2504	P49321	NASP	85186	224	8.1e-019	23	4,26	22	Nuclear autoantigenic sperm protein
2606	O15355	PPM1G	59235	125	6.4e-009	17	4,28	31	Protein phosphatase 1G
6203	O14979	HNRPDL	46409	144	8,10E-11	14	9,59	19	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
2111	P62258	YWHAE	29155	313	1,00E-27	26	4,63	61	14-3-3 protein epsilon
1109	P39687	ANP32A	28568	267	4,00E-23	17	3,99	38	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A
5510	P10809	HSPD1	61016	395	6.4e-036	20	5,7	33	60 kDa heat shock protein, mitochondrial

MALDI TOF/TOF tablosunda alınan sonuçlar (i) en iyi protein skoruna (ii) beklenti değerine (iii) eşlenen peptid sayısına ve (iv) belirlenen protein dizi miktarına göre değerlendirildi. Bu değerlendirmeler ışığında tanımlanan tüm proteinlerin istatistiksel olarak anlamlı oldukları görüldü. Ayrıca tanımlanan proteinlere ait protein moleküler ağırlıkları jel üzerinde gözlemlenen protein ağırlıkları ile eşleşebildiği gözlemlendi.



Çizim 4.7. WT ind hücrelerde tanımlanan spotların 2D jellerdeki konumları.

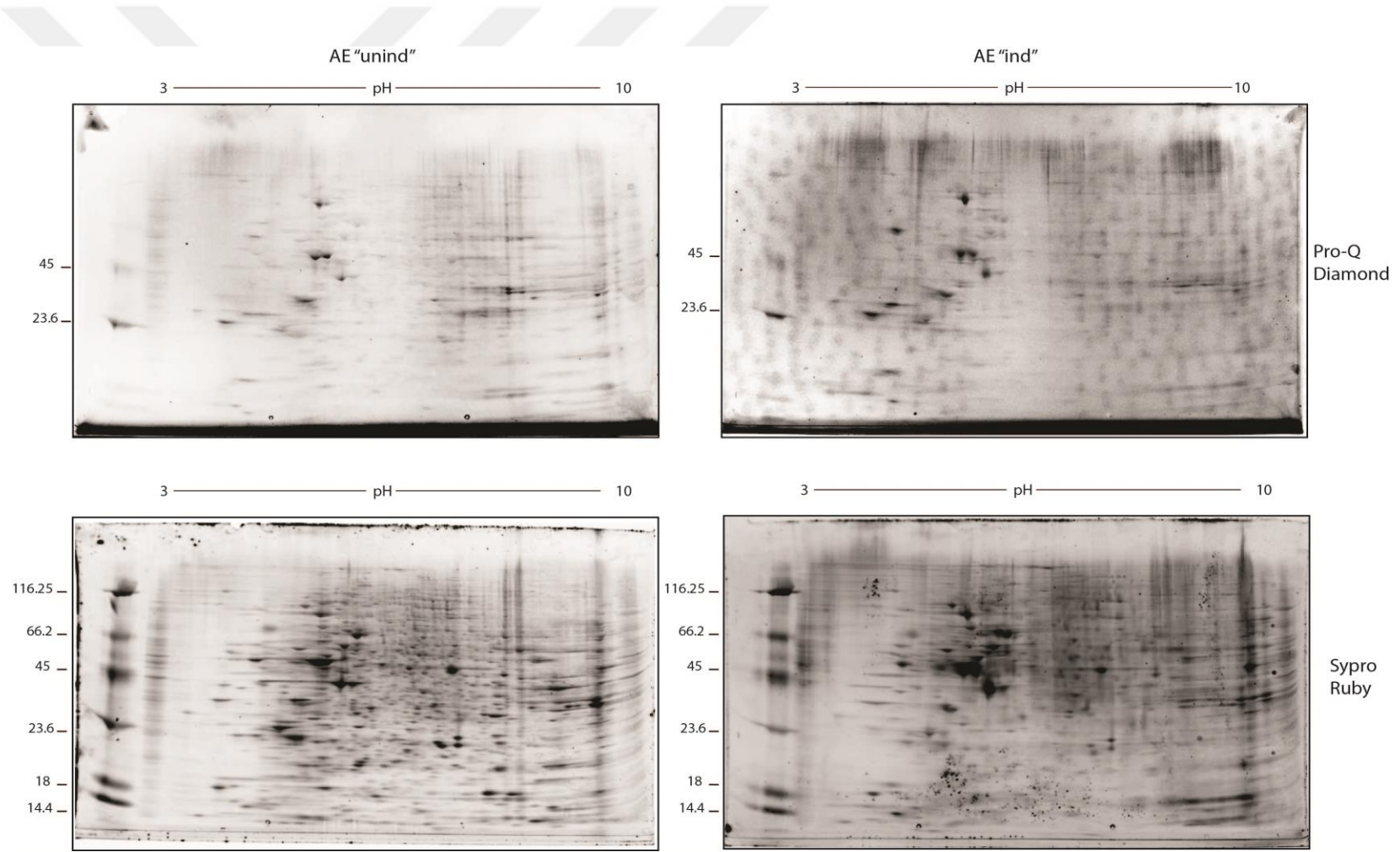
Tanımlanan proteinler için yapılan Swissprot/Uniprot veri bankası araştırmasında bu proteinlerden 10 tanesinin fosforilasyona uğradığının daha önce bilindiği belirlendi (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2. WT Parkin indüksiyonu sonrası tanımlanan fosfoproteinlerin Uniprot veri bankasına göre fosforilasyon yerleri.

Tanımlanan proteinler	UniProt No.	PTM	Fosforillenmiş residüler ve yerleri
HS90A	P07900	Fosforilasyon	Fosfotreonin 5,7. Fosfoserin 231, 252, 263, 476, 641. Fosfotirozin 313,492
HS90B	P08238	Fosforilasyon	Fosfoserin 226, 255, 261, 307, 445, 452, 532, 669,718. Fosfotreonin 297. Fosfotirozin 301, 305, 484
TBA1B	P68363	Fosforilasyon	Fosfoserin 48, 232, 439
TBB5	P07437	Fosforilasyon	Fosfoserin 40,172. Fosfotreonin 55,285,290
NASP	P49321	Fosforilasyon	Fosfotreonin 123, 170, 390, 464, 477, 490, 683. Fosfoserin 127, 176, 189, 191, 244, 299, 321, 397, 408, 421, 451, 497, 503, 662, 705, 706, 726, 745, 751, 756
PPM1G	O15355	Fosforilasyon	Fosfotreonin 122. Fosfoserin 183, 527
HNRDL	O14979	Fosforilasyon	Fosfoserin 241
YWHAE	P62258	Fosforilasyon	Fosfoserin 65, 131, 210. Fosfotreonin 137, 232
ANP32	P39687	Fosforilasyon	Fosfotreonin 15. Fosfoserin 17, 158
HSPD1	P10809	Fosforilasyon	Fosfoserin 67, 70, 410, 488. Fosfotirozin 90

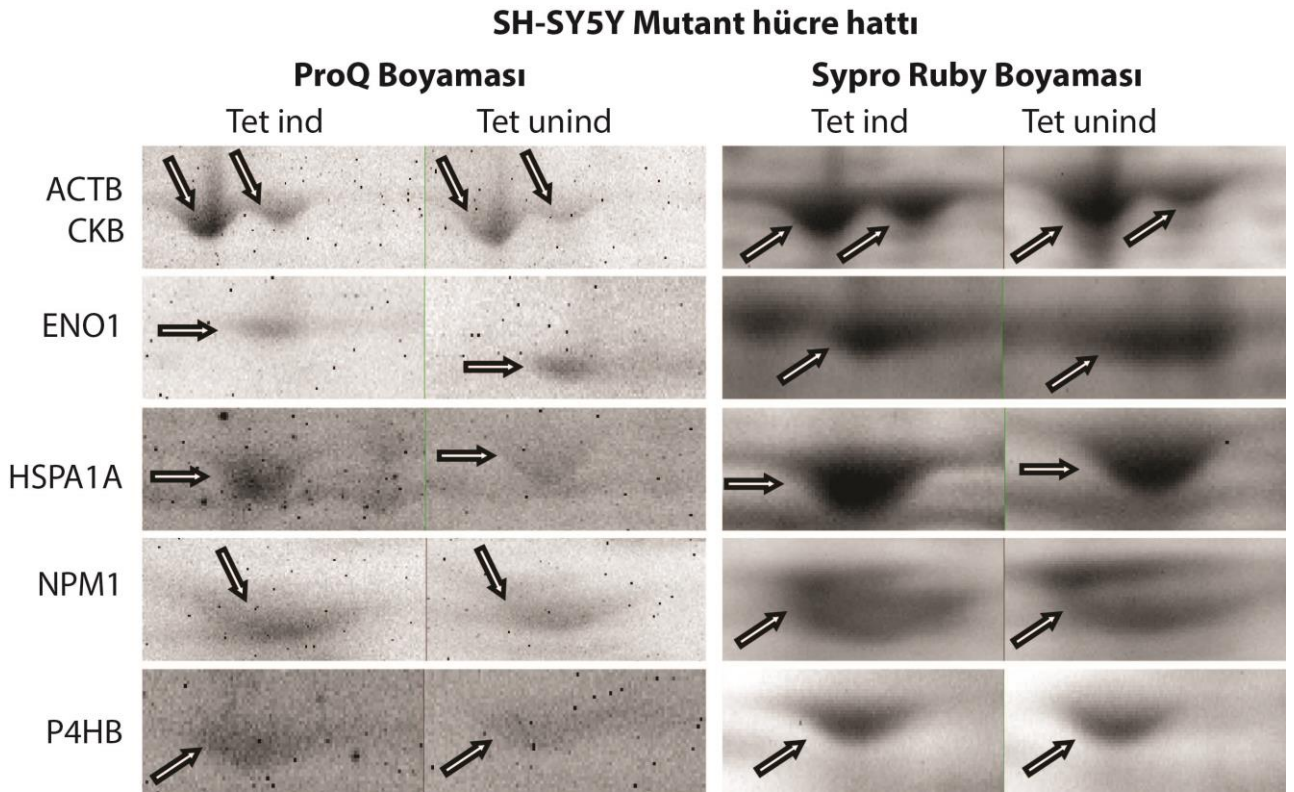
4.3. Mutant Parkin İfadesi Sonrası Fosfoprotein Profilindeki Değişiklikler

Bu amaçla mutant Parkin eksprese eden ve etmeyen hücrelerden elde edilen protein özütleri hazırlandı, proteinler çöktürülerek 2D jellerde yürütüldü. Jeller önce ProQ Diamond fosfoprotein boyası ile boyandı, jel görüntüleri kaydedildi ve sonrasında total protein boyası olan Sypro Ruby ile boyandı (Çizim 4.8).



Çizim 4.8. Mutant (AE) Tet indüksiyonu yapılmış (ind) ve yapılmamış (unind) hücrelerden elde edilen proteinlerin, ProQ ve Sypro boyaması yapılmış 2D jelleri.

PDQuest Advance yazılımı kullanarak yapılan spot karşılaştırması sonrasında 6 adet proteinin fosforilasyon seviyelerinde indüksiyon sonrası artış olduğu görüldü. Bu regülasyon seviyeleri arasındaki farkın net bir şekilde gösterilebilmesi için bu spotlara ait ProQ Diamond boyamaları ile Sypro Ruby boyamaları karşılaştırıldı, regülasyonun olduğu ProQ boyamalarının total protein boyası olan Sypro Ruby’de olmaması beklendi. Regülasyon gözlenen spotlar tek tek incelendiğinde değişimlerin sadece ProQ boyamalarında olduğu doğrulandı (Çizim 4.9).

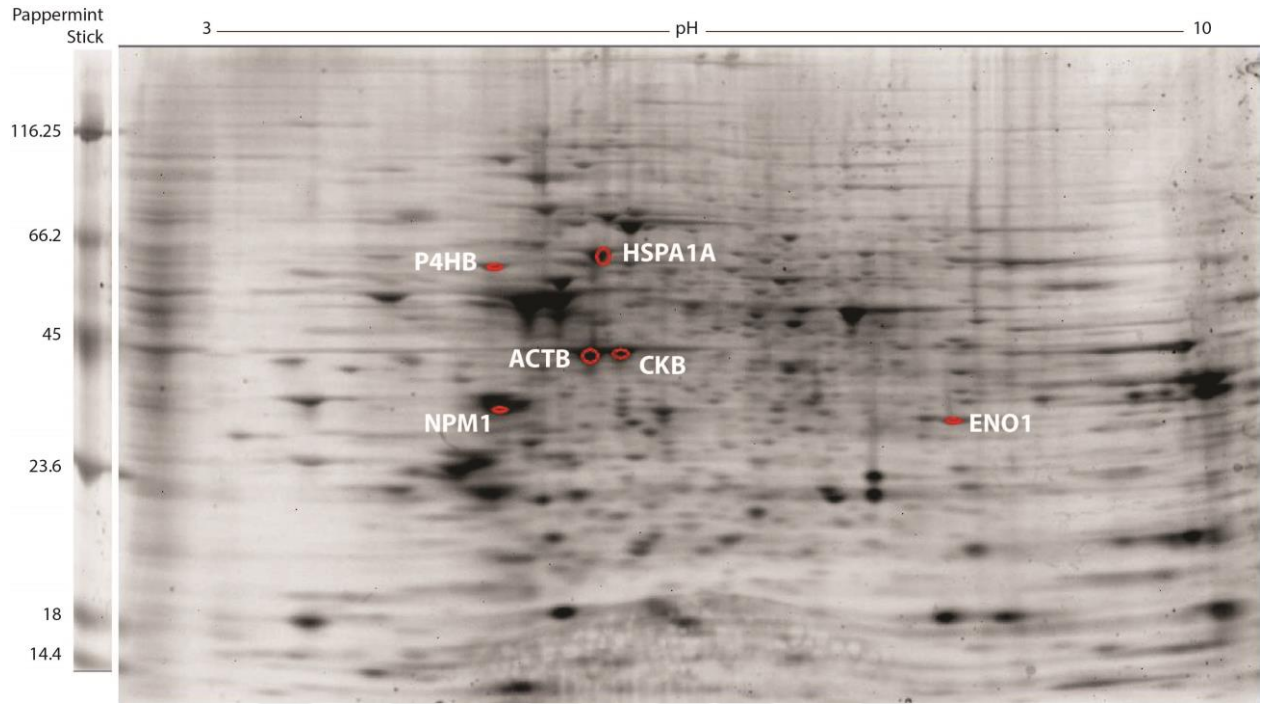


Çizim 4.9. Mutant ind hücrelerinde ekspresyon seviyesinde artış gözlenen protein spotlarının ProQ ve Sypro boyamalarının yakın plan karşılaştırmaları.

İndüksiyon sonrası artış gözlenen spotlar jellerden kesildikten sonra MALDI TOF/TOF analizi ile tanımlandı (Çizim 4.10, Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Mutant Parkin indüksiyonu sonrası elde edilen fosfoproteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları.

SSP No	AC No	Protein Adı	Moleküler Ağırlığı (Da)	MALDI Skoru	Beklenme Skoru (Expectation)	Eşleşen Peptidler	pI	Dizi Eşleşmesi (%)	Tanımı
5509	P08107	HSPA1A	70009	641	1,60E-60	23	5,48	22	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
3410	P07237	P4HB	57081	735	6.4e-070	42	4,76	55	Protein disulfide-isomerase
5308	P60709	ACTB	41710	396	5.1e-036	22	5,29	46	Actin, cytoplasmic 1
5309	P12277	CKB	42617	568	3.2e-053	34	5,34	59	Creatine kinase B-type
4309	P06748	NPM1	32555	235	6.4e-020	13	4,64	40	Nucleophosmin
6406	P06733	ENO1	47139	369	2.6e-033	25	7,01	43	Alpha-enolase



Çizim 4.10. Mutant ind hücrelerde tanımlanan spotların 2D jellerdeki konumları.

Tanımlanan proteinler için yapılan Swissprot veri bankası araştırmasında bu proteinlerden 5 tanesinin fosforilasyona uğradığının daha önce bilindiği belirlenirken bir adet proteinin bu data bankasında fosforilasyonuna ilişkin bilgi bulunmadığı belirlendi (ACTB) (Çizelge 4.4).

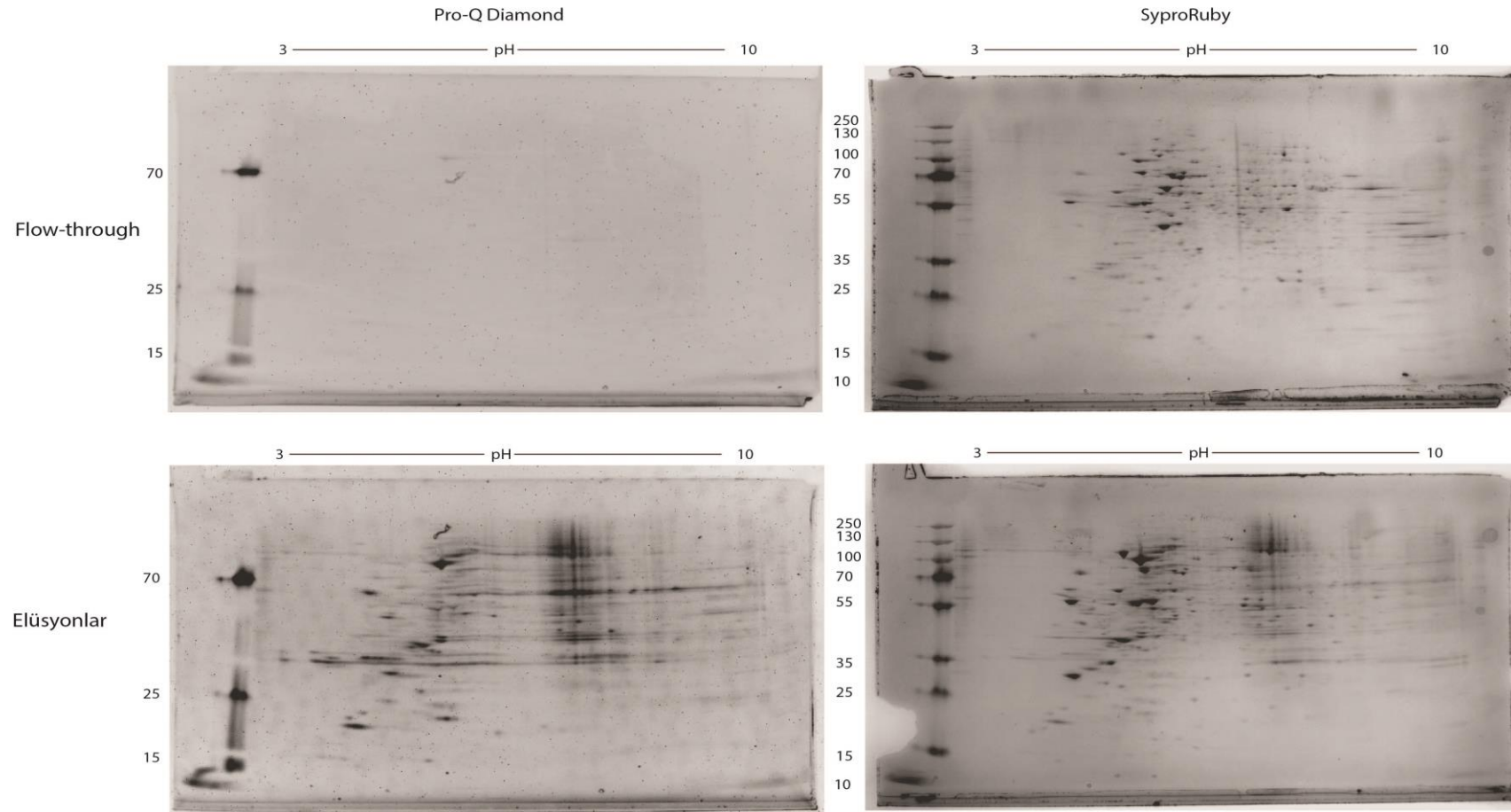
Çizelge 4.4. Tanımlanan fosfoproteinlerin Uniprot veri bankasına göre fosforilasyon yerleri.

Tanımlanan proteinler	UniProt No.	PTM	Fosforillenmiş residüler ve yerleri
HSP71	P08107	Fosforilasyon	Fosfoserin 631, 633. Fosfotreonin 636
PDIA1	P07237	Fosforilasyon	Fosfoserin 357
ACTB	P60709	-	-
CKB	P12277	Fosforilasyon	Fosfoserin 4, 199, 309. Fosfotreonin 35, 322. Fosfotirozin 125
NPM1	P06748	Fosforilasyon	Fosfoserin 4, 10, 43, 70, 125, 137, 139, 227, 242, 243, 254, 260. Fosfotreonin 75, 95, 199, 237, 279
ENO1	P06733	Fosforilasyon	Fosfoserin 27, 254, 272, 291. Fosfotirozin 44, 287

4.4. Fosfoproteinlerin Zenginleştirilmesi ve 2D Analizi

ProQ Diamond fosfoprotein boyası ile yapılan analizlerin yanlış payının olması nedeni ile yukarıdaki deneylerin bulgularının doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla iki farklı yaklaşım kullanılabilir. Bu yaklaşımlardan birincisi immün-çöktürme metodu kullanılarak fosfoproteinlerin anti-serin, anti-treonin ve anti-tirozin antikorları ile çöktürülmesi ve çöken proteinlerin tanımlanmasıdır. Ancak bu yaklaşımda çöktürme koşullarına bağlı olarak (kullanılan tween20 konsantrasyonu gibi) özgün olmayan proteinlerin tanımlanması yüksek olasılıktadır. İkinci yaklaşım ise fosfoproteinlerin titanium dioxide (TiO₂) kolon kullanılarak zenginleştirilmesi ve kolondan indirilen (indirilmiş) fosfoproteinlerin tanımlanmasıdır. Bu tez kapsamında kolon zenginleştirme metodu kullanılmış, zenginleştirilen fosfoproteinler iki boyutlu jel üzerinde ayırma tabi tutulmuş, jeller ProQ Diamond boyası ile boyanarak fosfoproteinler görünür hale getirilmiştir (Çizim 4.11).

Fosfoproteom Kiti Elüsyonlar



Çizim 4.11. Fosfoprotein zenginleştirilmesi sonrası elde edilen fraksiyonlara ait 2D jellerin ProQ ve Sypro boyamaları.

Çizim 4.11’de de görüleceği üzere, kolona bağlanmayan (flow-through) ile yapılan 2D jeller ProQ ile boyandığında herhangi bir fosfoprotein spotu gözükmemekte, bunun aksine kolona bağlanıp da kolondan indirilen (elüsyon) fosfoproteinler ise ProQ boyası ile görünür hale gelmektedir. Aynı jellerin kontrol amaçlı Sypro boyası ile boyanması sonrasında her iki jelde de total protein spotları görünür hale gelmiştir.

Beklentimiz kolondan indirilen proteinler arasında daha önce karşılaştırmalı proteom analizinde tanımladığımız ve fosfoprotein olarak düşündüğümüz proteinlerin bulunması yönündedir. Bu amaçla kolondan indirilen fosfoproteinler ile yapılan jelden 34 protein spotu kesildi ve bunlar MALDI TOF/TOF ile tanımlandı (Çizelge 4.5, Çizim 4.12).

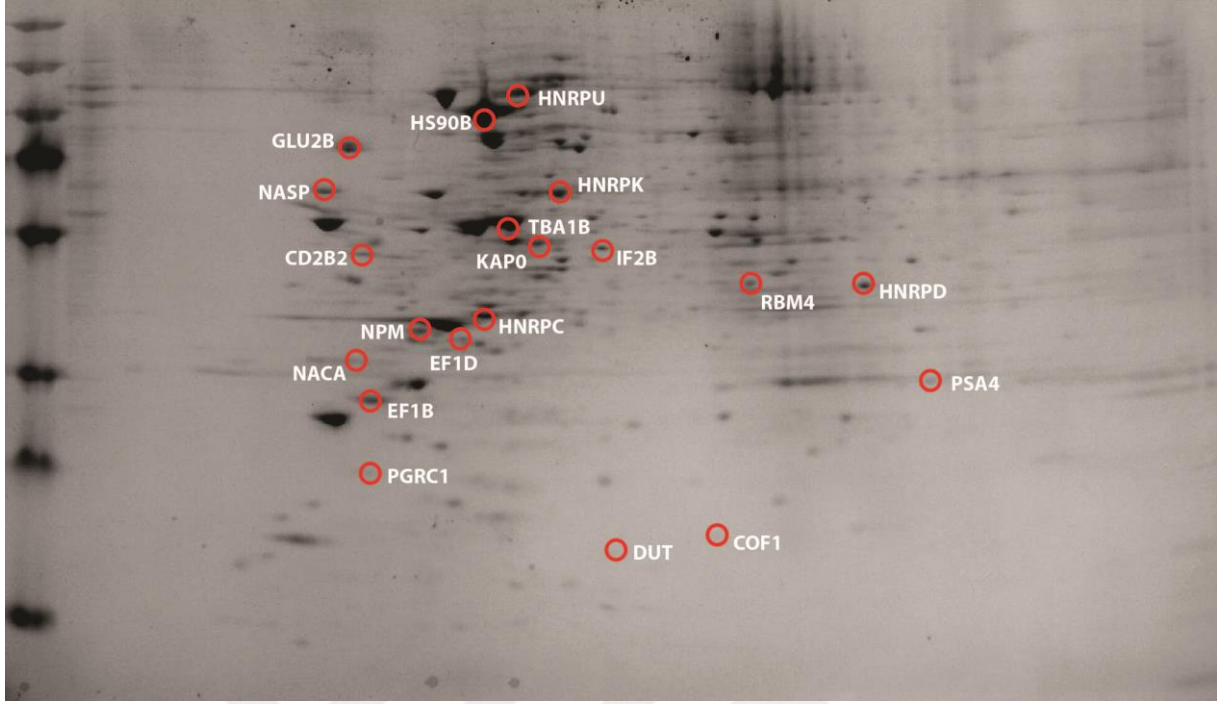


Çizelge 4.5. Fosfoprotein zenginleştirme kolonu kullanılarak elde edilen fosfoproteinlerin MALDI TOF/TOF analizi sonuçları.

AC No	Protein Adı	Moleküler Ağırlığı (Da)	MALDI Skoru	Beklenme Skoru (Expectation)	Eşleşen Peptidler	pI	Dizi Eşleşmesi (%)	Tanımı
Q92688	ANP22B	28770	21	1.70E+02	5	3.94	8%	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B
P04264	KRT1	65999	109	2.60E-07	19	8.15	30%	Keratin, type II cytoskeletal 1
P39687	ANP32B	28568	45	0.58	10	3.99	28%	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A
Q9H1K1	ISCU	17926	29	27	7	9.54	53%	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial
Q9P291	ARMCX1	49150	30	23	10	9.32	21%	Armadillo repeat-containing X-linked protein 1
P04264	KRT1	65999	91	1.60E-05	18	8.15	36%	Keratin, type II cytoskeletal 1
P13645	KRT10	58792	60	0.018	17	5.13	20%	Keratin, type I cytoskeletal 10
Q9Y6G9	DYNC1LI1	56544	19	2.40E+02	6	6.01	12%	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
O00264	PGRMC1	21658	74	0.00088	10	4.56	29%	Membrane-associated progesterone receptor component 1

P24534	EEF1B2	24748	231	1.6e-019	16	4.5	29%	Elongation factor 1-beta
Q13765	NACA	23370	149	2.60E-11	10	4.52	28%	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
P06748	NPM1	32555	267	4.00E-23	24	4.64	44%	Nucleophosmin
O95400	CD2BP2	37623	55	0.06	7	4.49	15%	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2
P49321	NASP	85186	116	5.10E-13	22	4.26	22%	Nuclear autoantigenic sperm protein
Q13610	PWP1	55793	102	1.30E-06	22	4.6	24%	Periodic tryptophan protein 1 homolog
P14314	PRKCSH	59388	278	3.20E-24	30	4.33	32%	Glucosidase 2 subunit beta
P29692	EEF1D	31103	349	2.60E-31	25	4.9	39%	Elongation factor 1-delta
Q9H1K1	ISCU	17926	20	2.20E+02	4	9.54	13%	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial
P07910	HNRNPC	33650	275	6.40E-24	22	4.95	42%	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
P07910	HNRNPC	33650	292	1.30E-25	28	4.95	37%	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
P68363	TUBA1B	50120	406	5.10E-37	35	4.94	50%	Tubulin alpha-1B chain
P08238	HSP90AB1	83212	537	4.00E-50	41	4.97	45%	Heat shock protein HSP 90-beta

Q00839	HNRNPU	90528	237	4.00E-20	25	5.76	17%	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
P33316	DUT	26690	52	0.14	12	9.65	34%	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial
P23528	CFL1	18491	63	0.0093	12	8.22	43%	Cofilin-1
P10644	PRAR1A	42955	112	1.30E-07	16	5.27	27%	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
P20042	EIF2S2	38364	257	4e-022	30	5.6	43%	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2
P61978	HNRNPK	50944	364	8.10E-33	34	5.39	46%	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
P61978	HNRNPK	50944	282	1.3e-024	24	5.39	38%	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Q9BWF3	RBM4	40289	344	8.10E-31	30	6.61	51%	RNA-binding protein 4
Q9UQ80	PA2G4	43759	121	1.6e-008	18	6.13	19%	Proliferation-associated protein 2G4
Q14103	HNRNPD	38410	140	2.00E-10	21	7.62	28%	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
P25789	PSMA4	29465	297	4.00E-26	19	7.57	53%	Proteasome subunit alpha type-4
Q14103	HNRNPD	38410	106	5.1e-007	18	7.62	29%	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0



Çizim 4.12. Fosfoprotein zenginleştirme kolonu kullanılarak elde edilen fosfoproteinlerin tanımlama sonrası 2D jel üzerindeki konumları.

Tanımlanan proteinler için yapılan Swissprot veri bankası araştırmasında, bu proteinlerden 27 tanesinin fosforilasyona uğradığı görüldü. Bunların arasından dört tanesi (NASP, HSP90, HNRPD, NPM) karşılaştırmalı fosfoprotein analizinde tanımladığımız proteinler arasında bulunmaktadır. Dolayısıyla bu deney sonucu bize karşılaştırmalı fosfoprotein analizlerinin güvenilir olduğuna işaret etmektedir (Çizelge 4.6). İki adet proteinin ise bu data bankasında fosforilasyonuna ilişkin bir bilgi yoktur.

Çizelge 4.6. Zenginleştirme sonrası elde edilen fosfoproteinlerin Uniprot veri bankasına göre fosforilasyonların yerleri.

Tanımlanan proteinler	UniProt No.	PTM	Fosforillenmiş residüler ve yerleri
ANP22B	Q92688	Fosforilasyon	Fosfoserin 158. Fosfotreonin 244
KRT1	P04264	Fosforilasyon	Fosfoserin 18, 21, 66, 344

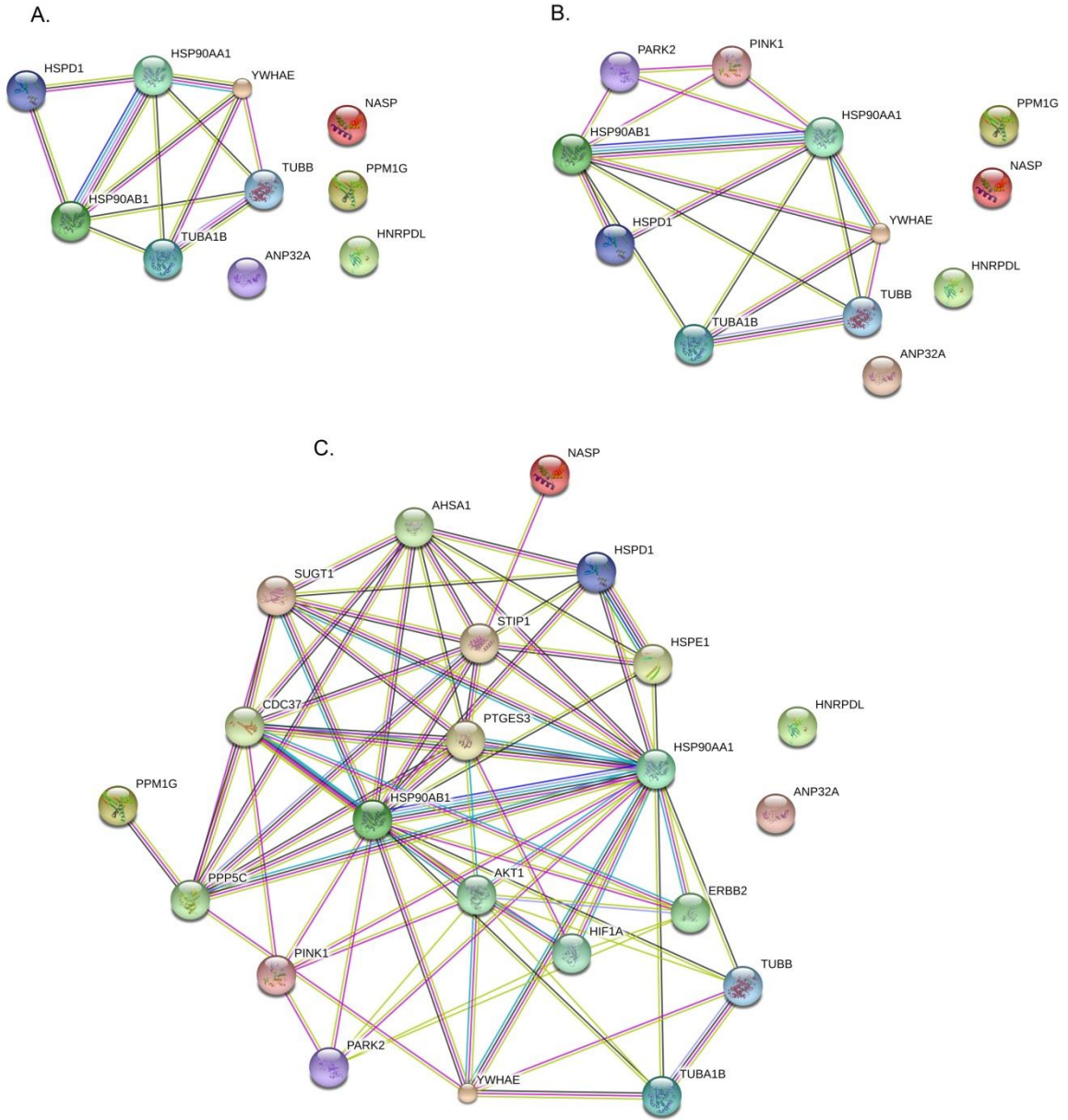
ANP32B	P39687	Fosforilasyon	Fosfotreonin 15. Fosfoferin 17, 158
ISCU	Q9H1K1	-	-
ARMCX1	Q9P291	-	-
KRT1	P04264	Fosforilasyon	Fosfoferin 18, 21, 66, 344
KRT10	P13645	Fosforilasyon	Fosfoferin 14, 16, 42, 53,56,170
DYNC1LI1	Q9Y6G9	Fosforilasyon	Fosfoferin 07, 398, 405, 412, 419, 421, 427, 487, 510, 516. Fosfotreonin 213, 408, 512, 513, 515
PGRMC1	O00264	Fosforilasyon	Fosfoferin 54, 57, 181. Fosfortreonin 74
EEF1B2	P24534	Fosforilasyon	Fosfoferin 8,42,95, 106, 174. Fosfotreonin 88, 93
NACA	Q13765	Fosforilasyon	Fosfoferin 43, 132, 166, 186, 191,203. Fosfotreonin 159, 161
NPM1	P06748	Fosforilasyon	Fosfoferin 4, 10, 43, 70, 125, 137,139, 227, 242, 243, 260. Fosfotreonin 75, 95, 199, 219, 234, 237, 279
CD2BP2	O95400	Fosforilasyon	Fosfoferin 46, 49, 188, 194, 195
NASP	P49321	Fosforilasyon	Fosfotreonin 123, 170, 390, 464, 477, 490, 683. Fosfoferin 127, 176, 189, 191, 244, 299, 321, 397, 408, 421, 451, 497, 503, 662, 705, 706, 726, 745, 751, 756
PWP1	Q13610	Fosforilasyon	Fosfoferin 50, 57, 59, 485, 494. Fosfotreonin 21, 55, 86
PRKCSH	P14314	Fosforilasyon	Fosfoferin 24, 89, 168,383, 390, 434
EEF1D	P29692	Fosforilasyon	Fosfoferin 37, 44, 60, 86, 106, 119, 133, 162. Fosfotreonin 73, 129, 147
ISCU	Q9H1K1	-	-
HNRNPC	P07910	Fosforilasyon	Fosfoferin 113, 115, 121, 162, 166, 233, 238, 239, 241, 253, 260, 299, 306. Fosfotreonin 109
HNRNPC	P07910	Fosforilasyon	Fosfoferin 113, 115, 121, 162, 166, 233, 238, 239, 241, 253, 260, 299, 306. Fosfotreonin 109
TUBA1B	P68363	Fosforilasyon	Fosfoferin 48, 232, 439
HSP90AB1	P08238	Fosforilasyon	Fosfoferin 246, 255, 261, 307, 445, 452, 669, 718 Fosfotreonin 297, 479. Fosfotirozin 301, 305, 484
HNRNPU	Q00839	Fosforilasyon	Fosfoferin 59, 66, 267, 271. Fosfotreonin 286, 532, 582

DUT	P33316	Fosforilasyon	Fosfoserin 88, 99
CFL1	P23528	Fosforilasyon	Fosfoserin 3, 8, 156. Fosfotreoinin 25. Fosfotirozin 68, 140
PRAR1A	P10644	Fosforilasyon	Fosfoserin 3, 77, 83, 101, 258. Fosfotreoinin 75
EIF2S2	P20042	Fosforilasyon	Fosfoserin 2, 13, 67, 105, 158, 218. Fosfotreoinin 31, 36, 111
HNRNPK	P61978	Fosforilasyon	Fosfoserin 36, 75, 116, 214, 216, 284, 379, 420. Fosfotreoin 39. Fosfotirozin380
HNRNPK	P61978	Fosforilasyon	Fosfoserin 36, 75, 116, 214, 216, 284, 379, 420, Fosfotreoin 39. Fosfotirozin380
RBM4	Q9BWF3	Fosforilasyon	Fosfoserin 86, 309
PA2G4	Q9UQ80	Fosforilasyon	Fosfoserin 2, 335, 361. Fosfotreoinin 366, 386
HNRNPD	Q14103	Fosforilasyon	Fosfoserin 71, 80, 82, 83, 190, 271. Fosfotreoinin 91, 127, 193
PSMA4	P25789	Fosforilasyon	Fosfoserin 13, 75, 173
HNRNPD	Q14103	Fosforilasyon	Fosfoserin 71, 80, 82, 83, 190, 271. Fosfotreoinin 91, 127, 193

Not: Tanımlanan proteinlerden iki tanesinin (-) fosforilasyonuna ilişkin bir bilgi data bankasında yoktur.

4.5. WT ve Mutant Parkin İndüksiyonu Sonrası Artış Gözlenen Fosfoproteinlerin Yolak Analizleri için STRING Programının Kullanılması.

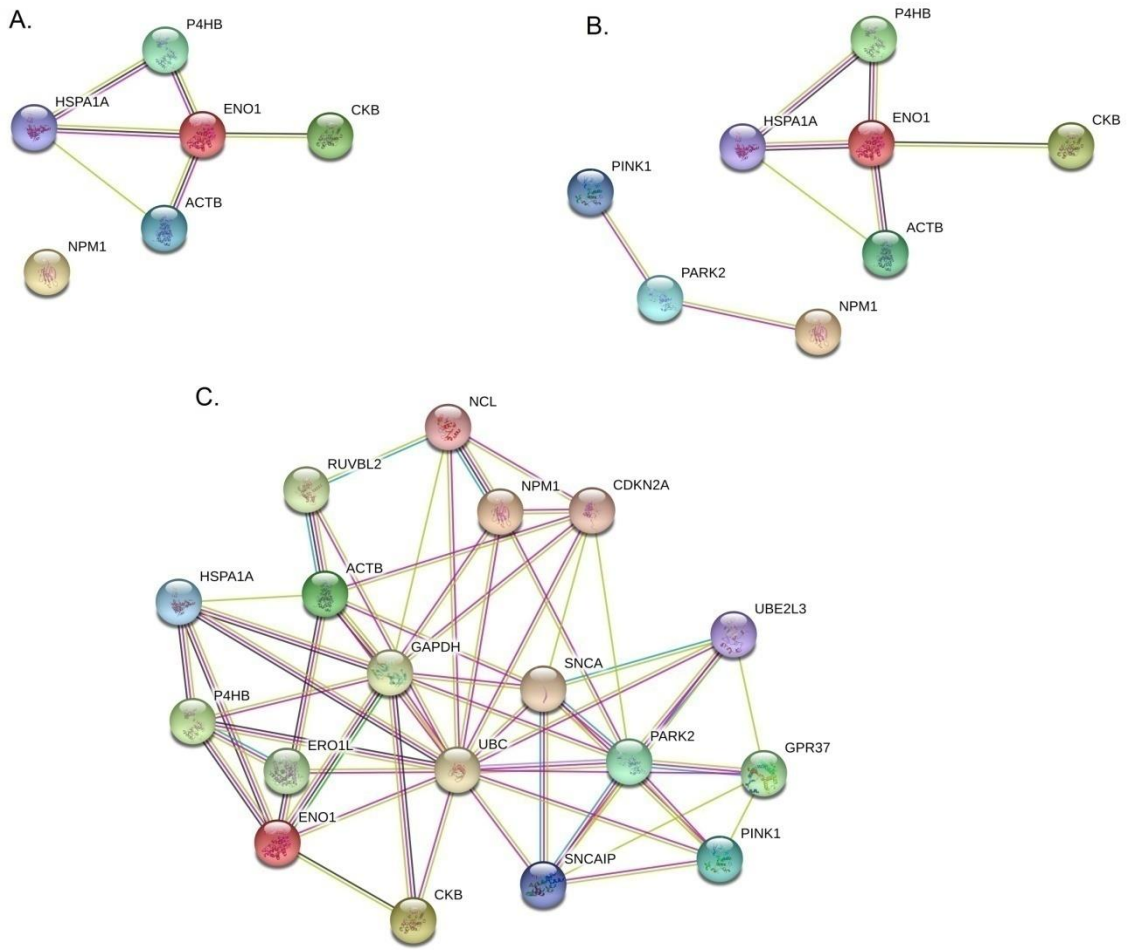
WT Parkin indüksiyonu sonrasında ekspresyonunda artış bulunan 9 fosfoprotein kendi içlerinde STRING analizine tabi tutulduklarında HSP90AA1, HSP90AB1, TUBA1B, TUBB ve HSPD1 proteinleri arasında bir etkileşim olduğu ortaya çıkmıştır (Çizim 4.13.A). Parkin ve PINK1 ile olan ilişkinin de ortaya konulması amacı ile analize dışarıdan bu iki protein de dahil edilmiş ve analiz tekrarlanmıştır. Parkin ve PINK1’inde bir önceki STRING analizinde ilişki içerisinde olan proteinler ile aynı gruba dahil olduğu ortaya çıkmıştır (Çizim 4.13.B). Yapılan bir diğer analiz ise, bizim tanımladığımız proteinler arasında olmayan, fakat aynı hücrel yolaklarda bulunabilecek diğer proteinleri de STRING analizine eklemek olmuştur, bunun için etkileşim sayısı arttırılmış ve analiz tekrarlanmıştır. Etkileşim sayısı arttırıldığında tanımlanan proteinlerden NASP ve PPM1G’nin de oluşan yeni etkileşim ağının içerisinde yer aldığı görülmüş ve daha geniş bir hücrel yolak ortaya çıkmıştır (Çizim 4.13.C).



Çizim 4.13. WT Parkin indüksiyonu sonrasında artmış bulunan 9 fosfoprotein STRING analizi.

Mutant Parkin indüksiyonu sonrasında artmış bulunan 6 fosfoprotein kendi içlerinde STRING analizine tabi tutulduklarında ise HSPA1A, P4HB, ACTB, ENO1 ve CKB proteinleri arasında bir etkileşim olduğu ve NPM1'in bu grupta yer almadığı gözlenmiştir (Çizim 4.14.A). Parkin ve PINK1 ile olan ilişkinin de ortaya konulması amacı ile analize

dışarıdan bu iki protein de dahil edilmiş ve analiz tekrarlanmıştır. Parkin ve PINK1’ında daha önce ilişki içerisinde olan proteinler ile aynı gruba dahil olmadığı bunun yerine NPM1 ile ilişkiye geçtiği analiz sonucu ortaya çıkmıştır (Çizim 4.14.B). Yapılan bir sonraki analiz yine, bizim tanımladığımız proteinler arasında olmayan fakat aynı hücresel yollarda bulunabilecek diğer proteinleri de STRING analizine eklemek olmuştur. Bunun için etkileşim sayısı arttırılmış ve analiz tekrarlanmıştır. Etkileşim sayısı arttırıldığında tanımlanan proteinlerden hepsinin de oluşan ağın içerisinde yer aldığı görülmüş ve daha geniş bir hücresel yolak ortaya çıkmıştır (Çizim 4.14.C).



Çizim 4.14 Mutant Parkin indüksiyonu sonrasında artmış bulunan 6 fosfoproteininin STRING analizi.

4.6. WT Parkin ve Mutant Parkin İfadesi Sonrası Tanımlanan Proteinlerin Arttırılmış Etkileşim Ağı Sonrası Yapılan PANTHER Analizi.

WT Parkin ifadesi sonrası tanımlanan proteinlerin etkileşim ağı sonrası yapılan PANTHER analizinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. WT Parkin indüksiyonu yapılan hücrelere ait PANTHER analizi tablosu.

BİYOLOJİK İŞLEV			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
GO.0009408	Isı stresine cevap	6	4,00E-05
GO.1901215	Nöron ölümünün negatif regülasyonu	6	4,00E-05
GO.1902176	Oksidatif stres indüklenmiş apoptosisin regülasyonu	4	4,00E-05
GO.1903377	Oksidatif stres indüklenmiş nöronal apoptosisin regülasyonu	3	4,00E-05
GO.0006457	Protein katlanması	6	7.66e-05
MOLEKÜLER FONKSİYON			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
GO.0051087	Şaperon bağlama	5	1.6e-05
GO.0019899	Enzim bağlama	11	2.95e-05
GO.0030235	Nitrik oksit sentaz regülatör aktivite	3	2.95e-05
GO.0031625	Ubikuitin protein ligaz bağlama	6	5.83e-05
GO.0023026	MHC sınıf II protein kompleks bağlama	3	0.000104
HÜCRESEL BİLEŞEN			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
GO.0043209	Myelin kılıf	5	0.000938
GO.0005829	Sitozol	13	0.00154
GO.0097413	Lewy cisimciği	2	0.00361
GO.0042995	Hücre projeksiyonu	9	0.00614
GO.0016234	İnklüzyon cisimciği	3	0.0102
KEGG YOLAĞI			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
5215	Prostat kanser	4	0.00055
4151	PI3K-Akt sinyal yolağı	5	0.00207
4621	NOD-like reseptör sinyal yolağı	3	0.00207
5200	Kanser sinyal yolağı	5	0.00207
4914	Progesteron yardımıyla oosit olgunlaşması	3	0.00465

Mutant parkin ifadesi sonrası tanımlanan proteinlerin artırılmış etkileşim ağı sonrası yapılan PANTHER analizinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Mutant Parkin indüksiyonu yapılan hücrelere ait PANTHER analizi tablosu.

BİYOLOJİK İŞLEV			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
GO.0042417	Dopamin metabolik işleyişi	4	7.23e-05
GO.1900407	Oksidatif stresse hücre yanıtının düzenlenmesi	4	0.00047
GO.0031647	Protein stabilitesinin düzenlenmesi	5	0.000667
GO.0042053	Dopamin metabolik işleyişinin düzenlenmesi	3	0.000667
GO.1903322	Küçük moleküller tarafından protein modifikasyonunun düzenlenmesi	5	0.000667
MOLEKÜLER FONKSİYON			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
GO.0019899	Enzim bağlama	11	3.9e-06
GO.0031625	Ubikuitin ligaz bağlama	6	2.5e-05
GO.0005515	Protein bağlama	15	2.74e-05
GO.0042802	Benzer protein bağlama	8	0.000342
GO.0055106	Ubikuitin-protein transfer düzenleyici aktivite	2	0.00933
HÜCRESEL BİLEŞEN			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
GO.0097413	Lewy cisimciği	2	0.00453
GO.1902494	Katalitik kompleks	7	0.00453
GO.0030529	Ribonükleoprotein kompleks	6	0.00521
GO.0000785	Kromatin	5	0.00527
GO.0016234	İnklüzyon cisimciği	3	0.00527
KEGG YOLAĞI			
Yolak ID	Yolak Tanımı	Gözlenen gen sayısı	FD oranı
5012	Parkinson Hastalığı	6	4.4e-07
4141	ER'da protein işlenmesi	4	0.00153

5. TARTIŞMA

Ubikitinlenme proteinlerin proteozomlarda parçalanması için kullanılan bir işaretleyici olarak görev yapmaktadır. Detayları bilinen bu görevinin yanında ubikitinlenme sinyal iletimi, enzimatik aktivasyon, endositoz, protein trafiği ve DNA tamiri gibi protein parçalanması ile ilişkisi olmayan metabolik proseslerde rol aldığı da bilinmektedir (Fujiwara ve diğ. 2008; Kao 2009). Parkin proteininin ubikitinlenme olayındaki rolü iyi bilinmektedir. Geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde ubikitinlenme ile fosforilasyon arasındaki çapraz iletişim araştırılmaya başlanmış ve bu iki metabolik olayın ökaryotlarda sinyal metabolizmasındaki ana olayları yönlendirdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında yapılan deneyler, Parkin tarafından indüklenmiş ubikitinlenme sonrası total fosfoproteomda meydana gelebilecek değişiklikleri anlamak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada Parkin proteinleri ekspresyonları sonrası fosforilasyon durumlarında değişiklik olan çözünür proteinler tanımlanmıştır. Aslında tanımlanan bu proteinlerin statülerindeki bu değişikliklerin WB gibi bir metod ile doğrulanmaları gerekmektedir. Ancak bu proteinlere karşı geliştirilmiş anti-fosfo antikori olmadığı için bu deneyler bu tez kapsamında yapılamamıştır. Bu nedenle alternatif bir strateji olarak fosfoprotein zenginleştirme yaklaşımı kullanılmış ve bazı proteinlerin fosforilasyon seviyesindeki değişiklikleri burada da gösterilmiştir.

PANTHER analizine göre WT Parkin indüksiyonu sonrası fosforile olan proteinler biyolojik işlev ve moleküler fonksiyon olarak strese karşı oluşturulan mekanizmaları işaret etmektedir. Hücresel bileşen olarak ise sinir hücrelerinde bulunan myelin kılıf ile alakalı proteinler ağırlık kazanmaktadır. Yapılan KEGG analizi ise prostat kanseri ve PI3K-AKT sinyal yolağını göstermekte olup kanser oluşum mekanizmasına ait yolların ağırlıkta olduğunu bizlere göstermektedir (Çizelge 4.7).

İlginç olarak mutant Parkin indüksiyonu sonrasında tanımlanan fosforile proteinlerin genişletilmiş PANTHER analizi sonrasında biyolojik işlev olarak dopamin metabolik işlevi, moleküler fonksiyon olarak enzim bağlama ve ubikitinlenme, hücresel işlev olarak Lewy cisimciği ve KEGG analizinde ise Parkinson hastalığı ve endoplazmik retikulumda protein işlenmesi çıkmıştır (Çizelge 4.8).

WT Parkin indüklenmiş hücrelerden elde edilen sonuçlarda ifade artışı gördüğümüz HSP90AA1 ve HSP90AB1 proteinleri, hücre döngüsünü ve sinyal iletimini kontrol eden proteinlerin olgunlaşmalarında, yapısal bütünlüklerinin korunmasında ve aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Çalışmamızda fosforile olduğunu bulduğumuz HSP90AA1'nin (HSP90 α), özellikle DNA hasarı sonrasında fosforile olduğu ve DNA çift iplik kırıklarının bulunduğu bölgede oluşan tamir kompleksi içerisinde fosforillenmiş halde bulunduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Quanz ve diğ. 2012). Ayrıca HSP90 α fosforilasyonun DNA hasarı sonrası DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK) tarafından fosforile edildiği ve hasar bölgesine ko-lokalize oldukları bir diğer çalışmada ortaya konulmuştur (Solier ve diğ. 2012).

TUBA1B ve TUBB mikrotübüllerin temel yapıtaşlarındandır. İki molekül GTP'yi bağlarlar. Yapılan çalışmalar pek çok fosforilasyonunu ortaya koymuştur. Ren ve ark., yapmış olduğu bir çalışmada ise Parkin'in α/β Tubülin'i bağladığı ve bu proteinin ubiquitinlenmenin ve degradasyonunu artırdığını ortaya koymuştur (Ren ve diğ. 2003). Bizim bulgularımızda da bu iki proteinin fosforilasyonlarının WT Parkin indüklenmiş hücrelerde arttığı ortaya konulmuştur.

Nüklear otoantijenik sperm protein (NASP) DNA replikasyonu, normal hücre döngüsü ve çoğalması için gerekli bir proteindir. NASP, HSP90 ve H1 histon kompleks oluşturarak HSP90 ATPase aktivitesini stimüle eder. NASP'ın WT Parkin indüksiyonu sonrası artması HSP90 ile olan kompleksi için gerekli olabilir.

WT Parkin indüksiyonu sonucu fosforilasyon seviyesinde artış gözlenen bir diğer protein ise Protein Phosphatase 1 (PP1)'in bir isoformu olan PPM1G dir. PP1 üyeleri PP1-interacting proteinler (PIPs) ile kompleks oluşturarak ilgili proteinin fonksiyonunu kontrol ederler (Verbinnen ve diğ. 2017). PPM1G, proteinlere serin/treoninden bağlanmış olan fosfat gruplarını kopararak defosforilasyon reaksiyonunu katalizler. Özellikle nörotransmisyon, kas kasılması, glikojen sentezi, T-hücre aktivasyonu, nöronal plastisite ve hücre çoğalması gibi yollarda hücre içi sinyal iletiminde önemli görevleri vardır (Aggen ve diğ. 2000). Bizim sonuçlarımızda gözlemlediğimiz artmış fosforilasyonu bu yolların negatif etkilenmesinde rol oynayabilir.

HNRNPDL proteini, hücrenin hemen hemen her yerinde bulunan heterojen nüklear ribonükleoproteinlerinin (hnRNPs) bir alt ailesidir. hnRNP'ler RNA'ya bağlanan proteinlerdir ve heterojen nüklear RNA (hnRNA) ile kompleks oluştururlar. Bu ailenin üyeleri sadece mRNA olgunlaşmasına katkıda bulunmazlar aynı zamanda hücrede trans-faktör olarak görev yaparak gen ifadesinin düzenlenmesinde de rol alırlar (Chaudhury ve diğ. 2010). Bizim sonuçlarımızda fosforilasyon seviyesinde artış gözlemlediğimiz HNRNPDL, fosforile olarak hücresel lokalizasyonunu değiştirebilir veya hedef moleküllerine bağlanma potansiyeli değişebilir.

14-3-3 protein ailesi memelilerde fosfo-serin/fosfo-treonin bağlama aktivitesi sayesinde 700 den fazla farklı protein ile interaksiyon halindedir. 14-3-3 ailesi üyeleri bağlandıkları proteinlerin stabilitelerini, hücre içi lokalizasyonlarını ve katalitik aktivitelerini etkileyen önemli bir protein ailesidir (Uhart ve diğ. 2013). 14-3-3-proteinlerinin bazı üyelerinin PH'nın patofizyolojisinde α -sinükleine bağlandığı ifade edilmiş olup LC yapısına katılmaktadır (Ostrerova ve diğ. 1999). Bizim bulgularımız arasında bulunan YWHAE (14-3-3 ϵ) proteini de bu ailenin bir üyesidir, fonksiyonları arasında ubikuitin protein ligaz bağlama da vardır, artmış fosforilasyonu bu fonksiyonunu negatif yönde etkileyebilir.

ANP32A nöron gelişimi, transkripsiyonun regülasyonu ve apoptosis gibi önemli hücresel faaliyetlerde görev alır. Halen memeli beyin gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, özellikle serebellar korteks ve serebellumdaki nöronların fonksiyon ve farklılaşmasında önemli etkisi olduğu düşünülmektedir (Wang ve diğ. 2015). Sonuçlarımıza göre artmış ANP32A fosforilasyonu dopaminerjik hücreler olan SH-SY5Y'lerin fonksiyonları ile ilişkili olabilir.

HSPD1 mitokondrial proteinlerin importunda görev alan şaperonin proteinlerinden biridir. Hsp10 ile birlikte mitokondriye taşınan proteinlerin doğru katlanmasında rol almaktadır. Satoh ve ark., yapmış oldukları bir çalışmada 14-3-3 proteinleri ile HSPD1'in belirli fizyolojik koşullarda merkezi sinir sisteminde kompleks oluşturduklarını göstermiştir (Satoh ve diğ. 2005). Bizim sonuçlarımızda indüklenmiş WT Parkin'e bağlı olarak fosforilasyonunda artış gözlenen HSPD1'in 14-3-3 ile bu kompleksi oluşturabilmek için ilgili fosforilasyona ihtiyaç duyduğu öngörülebilir.

HSPA1A (HSP70A) moleküler şaperondur ve birçok hücrel faaliyetlerde görev almaktadır, bunların içerisinde en önemli protein kalite kontrol sistemidir. Protein katlanmasının kontrolü, yanlış katlanmış proteinlerin tekrar katlanmaları ve katlanmanın doğru olup olmadığı, doğru katlanma olmaması durumunda proteinleri degradasyona yönlendirmek görevleri arasındadır. Ayrıca yapılan çalışmalar Hsp70A'nın BAG-1 ile birlikte Tau proteini ile etkileşime geçip Tau'nun doğru katlanmasında rol aldığını ayrıca doğru katlanmama durumunda proteozom sistemine yönlendirdiğini ortaya koymuştur (Elliot ve diğ. 2007). Mutant Parkin indüksiyonu ile fosforillenmesinin artması, mutant Parkin'in sebep olabileceği ubiquitinlenme hataları kaynaklı hatalı protein birikimine karşı artmış aktivitesi olabilir.

P4HB (PDIA1) disülfid bağlarının oluşmasını, kırılmasını ve yeniden düzenlenmesini katalizleyen endoplazmik retikulum kökenli bir enzimdir. Ayrıca hücre yüzeyinde de bulunarak redüktaz aktivitesi ile hücreye bağlanacak proteinlerin disülfid bağlarını keser. Ayrıca PDIA1, PH ve diğer nörolojik hastalıklarda yanlış katlanan proteinlerin birikimi için kritik role sahiptir (Nakamura ve diğ. 2009). Bu proteinin artmış fosforilasyonu mutant Parkin ifadesinin artması sonucu ubiquitinlenmenin bozulması ve daha aktif PDIA1'e ihtiyaç duyulması ile açıklanabilir.

CKB özellikle beyin ve düz kaslarda sentezlenen ve kreatinin fosforillenmesinden sorumlu olan bir kinazdır. Kurbağa kaslarında yapılan bir çalışmada fosforilasyonun kreatin kinaz aktivitesini arttırdığı, defosforilasyonun ise azalttığı ortaya konulmuştur (Dieni ve diğ. 2009). Mutant Parkin indüksiyonu sonunda CKB'nin fosforilasyonunda artış görülmüş, bu hücrelerde daha aktif CKB fonksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır.

NPM1 pek çok fosforile olabilecek bölgeye sahiptir, NPM1'in fosforilasyonu pek çok farklı kinaz tarafından gerçekleştirilmektedir (CKII, nükleer kinaz II, Plk, Cdk1/cyclinB, Cdk2/cyclin E ve Cdk2/cyclin A) (Ma ve diğ. 2006; Du ve diğ. 2010). Artan sayıdaki kanıt NPM1'in fosforilasyonunun hücre çoğalması üzerine etkili olduğunu göstermektedir, özellikle hepatoselüler karsinomada artmış fosforilasyonu dikkat çekicidir (Ching ve diğ. 2015). NPM1 ve Parkin arasında bir bağlantı literatürde bulunamamıştır, fakat son yıllarda kurulmaya çalışılan kanser-nörodejeneratif hastalıklar ilişkisi için NPM1'in mutant Parkin indüksiyonu ile fosforilasyonunun artışı bu ilişkinin kurulması açısından önemli olabilir.

Aktin (ACTB) proteinleri; hücresel iskeletin oluşturulması, hücre şeklinin korunması ve değiştirilmesi, sitoplazmik organel ve yapıların gruplandırılması ile lokalizasyonu, hücre hareketleri ve hücre bölünmesinde görevli protein grubudur. Daha önceden yapılan çalışmalarda ACTB'nin en az 35 farklı fosforilasyon bölgesi bulunduğu belirtilmiştir. ACTB'nin Thr 201-203'den fosforilasyonu, aktin filamentlerinde yapısal değişikliklere neden olarak filament boyunu uzattığı görülmüştür (Furuhashi ve diğ 1990; Hotulainen ve diğ 2009.). Bizim yaptığımız çalışmada da mutant Parkin indüksiyon sonucu ACTB'nin fosforilasyon seviyesinde artış görülmüştür.

Çalışmamızda ENO1'in fosforilasyon seviyesinin de mutant Parkin indüksiyonu sonrasında arttığını gözlemledik. ENO1 hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerin sitoplazmalarında bulunan önemli bir glikolitik enzimdir. Glikolitik fonksiyonun yanı sıra belirli genlerin (örn., MYC) transkripsiyonel olarak regülasyonunda rol almaktadır, ayrıca farklı hücre tiplerinde plasminogen reseptörü gibi görevler de oynamaktadır (Kim ve diğ. 2005). ENO1'in farklılaşmış ifade düzeyleri içerisinde kanser ve Alzheimer hastalığının da bulunduğu pek çok patoloji ile ilişkilendirilmiştir (Diaz-Ramos ve diğ. 2012). Yapılan çalışmalara rağmen ENO1'in fosforilasyonunun glikolitik veya glikolitik olmayan fonksiyonlarına olan etkisi tam olarak bilinmemektedir. Mayor ve ark., mayaları kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada, ENO1'in ubikuitinilize olduğunu da ortaya koymuşlardır (Mayor ve diğ. 2007). Bir diğer organizma, *Candida albicans*'da, ENO1'in ubikuitinilizasyonunun metabolik yeniden programlama üzerine olan etkisi gösterilmiştir (Leach ve diğ. 2011).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada fosforile olmuş bazı proteinlerin seviyelerindeki değişiklikler ile Parkin proteini arasındaki ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Parkin proteinin ubiquitinlenmedeki önemi düşünüldüğünde tanımlanan bu proteinlerin fosforilasyon bağlantılı sinyal yolları ve ubiquitinlenme bağlantılı hücresel yollar arasındaki çapraz ilişkiyi ortaya çıkarma adına önemli olabilir. Bir bütün olarak bu tez Parkin proteinin sinyal yollarındaki muhtemel etkisini gösterme adına önemli bir çerçeve çizmektedir.

Bu çalışmada belirlediğimiz fosfoproteinler anti-fosfoserin, anti-fosfotreonin ve anti-fosfotirozin antikorları kullanılarak 2D jellerde tespit edilebilir ve hangi tip fosforilasyona sahip oldukları ortaya konulabilir. Ayrıca tespit edilen bu fosforilasyonların ilgili proteinlerin fonksiyonları ve aktifleştirdikleri hücresel yollar ile olan ilişkileri araştırılmalıdır. Bunun yanında her ne kadar WT ve mutant Parkin ekspresyonu ile tanımladığımız proteinlerin fosforilasyon seviyelerinin arttığını göstermiş olsak da tanımlanan bu proteinlerin Parkin ile etkileşimlerinin tam olarak anlaşılması immün çöktürme çalışmaları ile ortaya çıkarılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abeliovich A, Gitler AD. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature*. 2016; 539, 207-216.
- Adler C, Ahlskog JE. Parkinson's disease and Movement Disorders. Spring Science + Business Media, New York, 2000.
- Aggen JB, Nairn AC, Chamberlin R. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol*. 2000;7(1):R13-23.
- Akpınar G, Kasap M, Cantürk Z ve diğ. What is proteomics? Proteomics in thyroid diseases research. *Endokrinolojide Diyalog*. 2011; 8(4): 166-17.
- Anderson NL, Anderson, NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998; 19 (11): 1853–1861.
- Aslam B, Basit M, Nisar MA ve diğ. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Chromatogr Sci*. 2017;55(2):182-196.
- Baak JP, Path FR, Hermesen MA ve diğ. Genomics and proteomics in cancer. *European Journal of Cancer*. 2003; 39 (2003) 1199–1215.
- Barallobre-Barreiro J, Chung YL, Mayr M. Proteomics and Metabolomics for Mechanistic Insights and Biomarker Discovery in Cardiovascular Disease. *Rev Esp Cardiol* 2013; 66:657-661.
- Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1998; 27:133–164.
- Belin AC, Westerlund M. Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J*. 2008; 275(7), 1377-1383.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. 1973; 33(11): 2643-2652.
- Biol Chem J. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. 1975; 250(10): 4007-402.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R ve diğ. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 2004; 4,1633-1649.
- Bonifati V, Rizzu P, Van Baren MJ ve diğ. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003; 299, 256–259.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM ve diğ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci*. 2015; 16 (2) 109-120.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U ve diğ. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol.Aging*. 2003; 24 (2) 197-211.
- Brock T. Protein Acetylation: Much More than Histone Acetylation. *Cayman Chemical*. 2010.
- Bronstein I.M, Tagliati M, Alterman RL ve diğ. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch Neuro*. 2011; 68(2):165.
- Bueler H. Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*. 2010; 15(11), 1336-1353.
- Burnett G, Kennedy EP. The enzymatic phosphorylation of proteins". *J BiolChem*. 1954; 211(2):969–980.

- Carlsson A, Waldeck B. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand.* 1958 ; 44(3-4), 293-298.
- Caviness JN, Smith BE, Stevens CJ ve diğ. Motor unit number estimates in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002; 8:161-164.
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C ve diğ. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature.* 2006; 441, 1162–1166.
- Cordato DJ, Chan DKY. Genetics and Parkinson's disease. *Clin Neurosci.* 2004; 11(2): 119-123.
- Cozzon, AJ. Protein phosphorylation in prokaryotes *Ann. Microbiol.* 1988; 42: 97-125.
- Cohen P T. Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci.* 2002; 115: 241-256.
- Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. Sunderland (MA) (2.baskı). Sinauer Associates, Boston University, 2000.
- Cozzone AJ. Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 1988; 42: 97–125.
- Cong Y, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbil Mol Biol.* 2002; 66: 407-25.
- Cookson M R. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74, 29-52.
- Chang C, Stewart RC. The Two-Component System. Regulation of Diverse Signaling Pathways in Prokaryotes and Eukaryotes. *Plant Physiol.* 1998; 117 (3): 723–731.
- Chaudhury A, Chander P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA.* 2010; 16(8): 1449–1462.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A ve diğ. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. 1989; 243, 1576-83.
- Cheng-Wu Z, Hang L, Yao TP ve diğ. Parkin Regulation and Neurodegenerative Disorders. *Front Aging Neurosci.* 2016; 7: 248.
- Chen KH, Wu RM, Lin HI ve diğ. Mutational analysis of SYNJ1 gene (PARK20) in Parkinson's disease in a Taiwanese population. *Neurobiol Aging.* 2015; 36(10):2905. 7-8.
- Chen H, Edward A, Burton G ve diğ. Research on the Premotor Symptoms of Parkinson's Disease: Clinical and Etiological Implications. *Environmental Health Perspectives.* 2013; 121: 1245-1252.
- Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell.* 2009; 33: 275–286.
- Ching RH, Lau EY, Ling PM ve diğ. Phosphorylation of nucleophosmin at threonine 234/237 is associated with HCC metastasis. *Oncotarget.* 2015; 22; 6(41): 43483-95.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F ve diğ. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* 2009; 325 (5942): 834–840.
- Chunga CH, Levy S, Chaurand P ve diğ. Genomics and proteomics: Emerging technologies in clinical cancer research. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2007; 61(1): 1-25.
- Chu CT. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Human Molecular Genetics.* 2010; 19: 28-37.
- Dachsel JC, Farrer MJ. LRRK2 and Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2010; 67(5): 542-547. *Marcel Dekker.* 2003; 109-126.

- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. 2003; 11;39(6): 889-909.
- Davidssona P, Sjögrena M. The use of proteomics in biomarker discovery in neurodegenerative diseases. *Disease Markers*. 2005; 81–92.
- Dawson TM, Dawson VL. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J.Clin. Invest*. 2003; 111, 145-151.
- Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S ve diğ. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Gene*. 2011; 20(5), 867-879.
- Delenclos M, Jones DR, McLean PJ ve diğ. Biomarkers in Parkinson's disease: advances and strategies. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016; 22 (Suppl 1): 106–110.
- Dewey RB. Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease, *Handbook of Parkinson's Disease*,
- Dewey RB. Clinical Features of Parkinson's Disease, *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, Humana Press. 2000; 71-84.
- Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A ve diğ. Alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 156795.
- Dieni CA, Storey KB. Creatine kinase regulation by reversible phosphorylation in frog muscle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2009; 152(4): 405-412.
- Dodson MW, Guo M. Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007; 17:331-337.
- Doty RL. The olfactory system and its disorders. *Semin Neurol*. 2009; 29(1):74–81.
- Du W, Zhou Y, Pike S ve diğ. NPM phosphorylation stimulates Cdk1, overrides G2/M checkpoint and increases leukemic blasts in mice. *Carcinogenesis*. 2010; 31:302–310.
- Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A ve diğ. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One*. 2012; 7: 0036458.
- Eisenhaber B, Chumak N, Eisenhaber F ve diğ. The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome Biol*. 2007; 8(3): 209.
- Elibol B. Parkinson's disease and cognitive functions. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special*. 2008; 1(4): 131-8.
- Elliott E, Tsvetkov P, Ginzburg I. BAG-1 associates with Hsc70.Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. *J Biol Chem*. 2007; 282(51): 37276-37284.
- Engelender S. Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy*. 2008; 4(3):372-374.
- Farrer M, Chan P, Chen R ve diğ. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol*. 2001; 50(3), 293-300.
- Finney N, Walther F, Mantel PY ve diğ. The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J Biol Chem*. 2003; 278(18), 16054-16058.
- Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55: 259-272.
- Ford J, Ahmed S, Allison S ve diğ. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein. *Cell Cycle Journal*. 2008; 7(19):3091-3097.

- Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW ve diğ. The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The Campaign study. *Brain*. 2004; 127: 550-560.
- Fritz KS, Galligan JJ, Hirschey MD ve diğ. Mitochondrial acetylome analysis in a mouse model of alcohol-induced liver injury utilizing SIRT3 knockout mice. *J. Proteome Res*. 2012; 11 (3): 1633–1643.
- Furuhashi K, Hatano S. Control of Actin Filament Length by Phosphorylation of Fragmin-Actin Complex. *Journal of Cell Biology*. 1990; 111(3): 1081–1087.
- Fedorow H, Tribl F, Halliday G ve diğ. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2005; 75(2): 109-24.
- Fuchs O, Neuwirtova R. Ubiquitins, proteasomes, sumoylation and application today and in future for cancer and other diseases therapy II. Sumoylation and neddylation as posttranslational modifications of proteins and their ubiquitylation and its significance. *Vnitr Lek*. 2006; 52, 619-627.
- Gardeströma P, Igamberdiev AU. The origin of cytosolic ATP in photosynthetic cells. *Physiologia Plantarum*. 2016; 157: 367–379.
- Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007; 17, 343-350.
- Giovannone B, Lee E, Laviola L ve diğ. Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. *J Biol Chem*. 2003; 278: 31564-31573.
- Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1:a008862.
- Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K ve diğ. 100 years of Lewy pathology. *Nature Rev. Neurol*. 2013; 9, 13–24.
- Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013; 54:141–164.
- Greggio E, Singleton A. Kinase signaling pathways as potential target in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Review of Proteomics*. 2007; 4(6):783-92.
- Gwinn-Hardy K, Mehta ND, Farrer M ve diğ. Distinctive neuropathology revealed by alpha-synuclein antibodies in hereditary parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p, *Acta Neuropathol*. 2000; 99: 663–672.
- Hattori N, Mizuno Y. Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 364, 722–724.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007; 33(6): 599–614.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann NY Acad Sci*. 2009; 1170: 615–622.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H ve diğ. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATPdependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77(4): 1783–1786.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 425-479.
- Hicks AA, Pétursson H, Jónsson T ve diğ. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2002; 52: 549-555.

- Hoepken HH, Gisbert S, Morales B ve diğ. Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobio. Dis.* 2007 ; 25, 401-411.
- Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1, 727–730.
- Ho MS, Ou C, Chan YR ve diğ. The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65: 1977-2000.
- Hotulainen P, Llano O, Smirnov S ve diğ. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of Cell Biology.* 2009; 185 (2): 323-339.
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J ve diğ. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science.* 2011; 332, 1317–1322.
- Huang Q, Figueiredo-Pereira ME. Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications. *Apoptosis.* 2010;15: 1292-1311.
- Hubbard MJ, Cohen P. On target with a new mechanism for the regulation of protein-phosphorylation trends. *Biochem. Sci.* 1993; 18,172–177.
- Humphrey SJ, James DE, Mann M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2015; 26: 676–687.
- Hunter T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Mol Cell.* 2007; 28(5): 730-738.
- Iliuk AB, Tao WA. Is phosphoproteomics ready for clinical research? *Clin Chim Acta.* 2013; 420, 23–27.
- International Human Genome Sequencing Consortium. "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature.* 2004; 431 (7011): 931–945.
- Jacob T, Van den Broeke C, Favoreel HW. Viral serine/threonine protein kinases. *J Virol.* 2011; 85, 1158-1173.
- Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet.* 1992; 26, 179-207.
- Joseph V, Campellone MD, Division of Neurology, Cooper University Hospital, Camden, NJ. Review provided by VeriMed Healthcare Network. Also reviewed by David Zieve, MD, MHA, Isla Ogilvie, PhD, and the A.D.A.M. Editorial team.
- Johnson LN, Barford D. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1993; 22, 199-232.
- Kane LA, Lazarou M, Fogel AI ve diğ. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J. Cell Biol.* 2014; 205, 143–153.
- Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet.* 2015; 386:896–912.
- Kasap M, Akpinar G, Kanli A. Proteomic studies associated with Parkinson's disease. *Expert Review of Proteomics.* 2017; 193-209.
- Kasap M, Akpinar G. Proteomics Approaches to Parkinson's Disease and Search for Potential Biomarkers. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2011; 31(3): 691-701.
- Kasap M, Akpinar G, Sazci ve diğ. Evidence for the presence of full-length PARK2 mRNA and Parkin protein in human blood. *Neurosci Lett.* 2009; 460(3): 196-200.

- Kim Y, Park J, Kim S ve diğ. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 377(3), 975-980.
- Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30 (3):142-150.
- Kidd PM. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev*. 2000; 5(6): 502-529.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N ve diğ. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998; 392, 605-608.
- Khalilpour A, Kilic T, Khalilpour S ve diğ. Proteomic-based biomarker discovery for development of next generation diagnostics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 101: 475-491.
- Klammer M, Kaminski M, Zedler A ve diğ. Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11, 651–668.
- Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N ve diğ. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine65. *Open Biol*. 2012; 2(5): 120080.
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H ve diğ. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* . 2014; 510, 162–166.
- Korkuc P, Walther D. Spatial proximity statistics suggest a regulatory role of protein phosphorylation on compound binding. *Proteins*. 2016; 84:565–579.
- Korkuć P, Walther D. Towards understanding the crosstalk between protein post-translational modifications: Homo- and heterotypic PTM pair distances on protein surfaces are not random. *Proteins*. 2017;85(1):78-92.
- Krueger KE, Srivastava S. Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5,1799-1810.
- Kutuk O, Letai A. Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications. *Curr Mol Med*. 2008; 8,102-118.
- Kumar KR, Djarmati-Westenberger A, Grunewald A. Genetics of Parkinson's disease. *Semin Neurol*. 2011; 31(5), 433-440.
- Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8, 547–566.
- Lautier C, Goldwurm S, Dürr A ve diğ. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 2008; 82: 822-833.
- Lenaz G, Genova ML. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: Anew challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Med. Biol*. 2012; 748, 107–144.
- Lesage S, Drouet V, Majounie E ve diğ. Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet*. 2016; 98: 500-513.
- Lill CM, Bertram L Towards unveiling the genetics of neurodegenerativediseases. *Semin. Neurol*. 2011; 31 (5) 531-541.
- Lim Y. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(9): 3163–3169.
- Lipmann FA, Levene PA. Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J Biol Chem*. 1932; 98(1): 109–114.

- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA ve diğ. Lansbury PT Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alphasynuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 2011; 111(2): 209-218.
- Liu Z, Wang Y, Xue Y. Phosphoproteomics-based network medicine. *The FEBS Journal*. 2013; 5696-5704
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL ve diğ. Molecular Cell Biology (4.baskı). W.H. Freeman Company, New York, USA, 2002.
- Lodish H, Harvey F. Molecular Cell Biology (6. baskı). W. H. Freeman Company, New York, USA, 2008.
- López E, Wang X, Madero L ve diğ. Functional phosphoproteomic mass spectrometry-based approaches. *Clinical and Translational Medicine*. 2012; 1:20.
- López E, William CSC. Phosphoproteomics and Lung Cancer Research. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13(10), 12287-12314.
- Lopez E, Wang X, Madero L. Functional phosphoproteomic mass spectrometry-based approaches. *Clin. Transl. Med*. 2012; 10.1186/2001-1326-1-20.
- Leach MD, Stead DA, Argo E ve diğ. Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation, morphogenetic regulation and virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2011;79 (6):1574-1593.
- Levene PA, Alsberg CL. The cleavage products of vitellin. *J Biol Chem*. 1906; 2(1):127–133.
- Lewis PA. Jamis Parkinson: The Man Behind The shaking Plasy. *Journal of Parkinson*. 2012; 2(3):181-7.
- Ma Z, Kanai M, Kawamura K ve diğ. Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26:9016–9034.
- Manning G, Whyte D, Martinez R ve diğ. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298(5600):1912-1934.
- Martin DB, Nelson PS. From genomics to proteomics: techniques and applications in cancer research. *Trends Cell Biology*. 2001; 11: 60-65.
- Martin DB. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*. 2001; 268:5001-5010.
- Marras C, Lang A. Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. *Neurology*. 2008; 70(21), 1996-2003.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K ve diğ. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *CellBiol*. 2010; 189 (2): 211-221.
- Mayor T, Graumann J, Bryan J ve diğ. Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6 (11):1885-1895.
- McCall B. Dr. James Parkinson 1755–1824, Parkinson's Diseases Society. 2009.
- Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*.1967; 213 (5072): 137–139.
- Morgan JC, Mehta SH, Set Hi. Biomarkers in Parkinson's diseases. *Curr Neurol Neurosci*. 2010; 10(6):423-430.

- Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 2007; 315:201–205.
- Naidu Y, Chaudhuri KR. Early Parkinson's disease and non motor issues. *J Neurol* 2008;255 (Suppl 5):33–38.
- Nakamura T, Lipton SA. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*. 2009;14(4):455-468.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF ve diğ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their Autophagy. *J. Cell Biol.* 2008; 183, 795–803.
- Nuytemans K, Bademci G, Inchausti V ve diğ. Whole exome sequencing of rare variants in EIF4G1 and VPS35 in Parkinson disease. *Neurology*. 2013; 80: 982-989.
- Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F. Drug insight: Continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Nat Clin Pract*. 2006; 2,382-392.
- Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 290(2), 503-510.
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A ve diğ. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol*. 2009; 65: 19-23.
- Panagariya A, Sharma B, Dev A. Pallido-pyramidal syndrome: a rare entity. *Indian J Med Sci*. 2007; 61: 156-157.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, ve diğ. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 2599-2608.
- Park J, Lee SB, Lee S ve diğ. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. 2006; 441, 1157–1161.
- Perteau M, Salzberg SL. Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biol*. 2010; 11(5): 206-213.
- Petit A, Kawai T, Paitel E ve diğ. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J. Biol. Chem*. 2005; 280, 34025-34032.
- Pihlström L, Rengmark A, Bjørnå KA ve diğ. Fine mapping and resequencing of the PARK16 locus in Parkinson's disease. *J Hum Genet*. 2015; 60: 357-362.
- Poorakaj P, Nutt JG, James D ve diğ. Parkin mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson [corrected] disease. *Am J Med Genet A*. 2004; 15;129A(1): 44-50.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E ve diğ. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276(5321), 2045-2047.
- Przedborski S, Jackson V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord*. 1998; 13(1):35-38pp.
- Qingsong H, Guanghui W. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*. 2016; 5: 14 (doi: 10.1186/s40035-016-0060-6).
- Quanz M, Herbette A, Sayarath M ve diğ. Heat shock protein 90α (Hsp90α) is phosphorylated in response to DNA damage and accumulates in repair foci. *J Biol Chem*. 2012; 287(12): 8803-88156.
- Rana AQ, Ahmed US, Chaudry ZM ve diğ. Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. *Expert Rev Neurother*. 2015; 15(5): 549-562.

- Rao SS, Hofmann LA, Shakil A. Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2006; 74(12):2046-2054.
- Rattan SI, Derventzi A, Clark BF. Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1992; 663, 48-62.
- Reichmann H. View point: Etiology in Parkinson's disease. Dual hit or spreading intoxication. *J Neurol Sci*. 2011; 310 (1-2): 9-11.
- Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci*. 2003; 23(8): 3316-3324.
- Rijk MC, Launer LJ, Berger K ve diğ. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*. 2000; 54: 21-23.
- Riley BE, Loughheed JC, Callaway K ve diğ. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nature Communication*. 2013; 4:1982-1991.
- Rinne UK. Lisuride, a dopamine agonist in the treatment of early Parkinson's disease, *Neurology*. 1989; 39: 336-339.
- Robinson PA. Protein stability and aggregation in Parkinson's disease. *Biochem J*. 2008; 413(1):1-13.
- Russ AP, Lampel S. The druggable genome: an update. *Drug Discov Today*. 2005; 10,1607-1610.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*. 1999; 19(14): 5782-5791.
- Özgül S. Mutant Parkin Proteininin Moleküler Karakterizasyonu ve Nöroblastoma Hücre Proteomu Üzerindeki Etkisi. Doktora tezi. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2012.
- Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E ve diğ. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep*. 2003;4(3): 301-306.
- Santoro L, Breedveld GJ, Fiore Manganelli F ve diğ. Novel *ATP13A2* (*PARK9*) homozygous mutation in a family with marked phenotype variability. *Neurogenetics*. 2011; 12(1): 33-39.
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD ve diğ. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95:4013- 4018.
- Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2008; 7, 97-109.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000; 103: 211-25.
- Sha D, Chin LS, Li L. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF- κ B signaling. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19, 352-363.
- Shaheen M, Shanmugam I, Hromas R. The Role of PCNA Posttranslational Modifications in Translesion Synthesis. *J Nucleic Acids*. 2010; 761217
- Sharma N, Richman E. Parkinson's disease and the family: A new Guide. *Harvard University Press*. 2005.
- Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S ve diğ. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific Reports*. 2012; 2:1002.

- Shimura H, Hattori N, Kubo S ve diğ. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics*. 2000; 25: 302–305.
- Satoh J, Onoue H, Arima K ve diğ. The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(10): 858-68.
- Singleton A, Hardy J. The evolution of genetics: Alzheimer and Parkinson's diseases. *Neuron*. 2016; 90, 1154–1163.
- Solier S, Kohn KW, Scroggins B ve diğ. Heat shock protein 90 α (HSP90 α), a substrate and chaperone of DNA-PK necessary for the apoptotic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(32): 12866-12872.
- Solit DB, Mellinghoff IK. Tracing cancer networks with phosphoproteomics. *Nat Biotechnol*. 2010; 28, 1028–1029.
- Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G ve diğ. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation, *Ann Neurol*. 2001; 49:313–319.
- Stock JB, Ninf A, Stock AM. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev*. 1989; 53(4):450–490.
- Takahashi T, Deng Y, Maruyama W ve diğ. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect*. 1994; 98(2), 107-118.
- Tan EK, Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum.Mutat*. 2007; 28, 641-653.
- Tang B, Xiong H, Sun P ve diğ. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-on set Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2006; 15 (11):1816-1825.
- Tikhonov AN, Vershubskii AV. Computer modeling of electron and proton transport in chloroplasts. *Biosystems*. 2014; 121: 1–21.
- Trempe JF, Sauvé V, Grenier K ve diğ. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science*. 2013; 340(6139):1451-1455.
- Thomas Sicheritz-Ponten B, Gupta R, Gammeltoft S ve diğ. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 2004; 4(6): 1633–1649.
- Um JW, Stichel-Gunkel C, Lubert H ve diğ. Molecular interaction between parkin and PINK1 in mammalian neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci*. 2009; 40, 421-432.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V ve diğ. Hereditary earlyonset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004; 304, 1158-1160.
- Van Etten RA. c-Abl regulation: a tail of two lipids. *Curr Biol*. 2003; 13: 608–610.
- Verbinnen I, Ferreira M, Bollen M. Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1. *Biochem Soc Trans*. 2017; 45(1): 89-99.
- Vidailhet M, Bonnet AM, Marconi R ve diğ. The phenomenology of L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1999; 1, 13-18.
- Vilariño-Güell C, Rajput A, Austen J ve diğ. DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(7): 1794–1801.
- Wan JY, Edwards KL, Hutter CM ve diğ. Association mapping of the PARK10 region for Parkinson's disease susceptibility genes. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20: 93-98.

- Wang W, Wang X, Fujioka H ve diğ. Parkinson's disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes. *Nat Med.* 2016; 22: 54-63.
- Wang D, Qian L, Xiong H ve diğ. Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103, 13520-13525.
- Wang S, Wang Y, Lu Q ve diğ. The expression and distributions of ANP32A in the developing brain. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:207347.
- Walsh C. Protein Methylation. Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventor (5.baskı). Roberts and Co. Publishers, ISBN, 2006.
- Walsh CT. Posttranslational Modification of Proteins. Roberts and Company, Englewood, Colorado 2006.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A. Progress with gene-product mapping of the Mollicules: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 1995; 7(7):1090–1094.
- Walden H ve Muqit MMK. Ubiquitin and Parkinson's disease through the looking glass of genetics. *Biochem J.* 2017; 474(9): 1439–1451.
- Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an auto inhibited state. *EMBO J.* 2013; 32(15):2099-112.
- Whitworth AJ, Lee JR, Ho VM ve diğ. Rhomboid-7 and HtrA2/Omi act in a common pathway with the Parkinson's disease factors Pink1 and Parkin. *Dis Model Mech.* 2008; 1:168-174.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P ve diğ. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology.* 2011; 1: 1-58.
- Wolosiuk RA, Ballicora MA, Hagelin K. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* 1993; 7: 622–637.
- Uhart M, Bustos DM. Human 14-3-3 Paralogs Differences Uncovered by Cross-Talk of Phosphorylation and Lysine Acetylation. *PLoS One.* 2013; 8(2): e55703.
- Xia Y, Saitoh T, Ueda K ve diğ. Characterization of the human alpha-synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms. *J. Alzheimers Dis.* 2002; 3(5): 485-494.
- Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal.* 2010; 123(8), 1086-1092.
- Xiong H, Wang D, Chen L ve diğ. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J. Clin. Invest.* 2009; 119, 650-660.
- Yalçın A. Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu. *Vet Med.* 2012; 1: 29-37.
- Yang Y, Gehrke S, Imai Y ve diğ. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103, 10793-10798.
- Yerlikaya A. Cellular functions of the 26S proteasome. *Turk J Biol.* 2007; 28, 31-38.
- Yun J, Cao JH, Dodson MW ve diğ. Loss-of-function analysis suggests that Omi/HtrA2 is not an essential component of the PINK1/PARKIN pathway *in vivo*. *J Neurosci.* 2008; 28:14500-14510.
- Zhao S, Xu W, Jiang W ve diğ. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation". *Science.* 2010; 327 (5968): 1000–1004.

Zhou C, Huang Y, Shao Y ve diğ. The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(33), 12022-12027.

8. ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Mehin Zülfigarova

2. Doğum Yeri ve Tarihi: LENKERAN/31.10.1988

3. Uyruğu: Azerbaycan

4. Madeni Durumu: BEKAR

5. Çalıştığı Kurum: Denaysel ve Kilinik Araştırmalar Birimi

6. İletişim Adresi: Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Yerleşkesi Lojman Tip 4-6/5 İzmit

7. Telefon: 05535763246

8. Mail: mehin@list.ru

9. Eğitimi:

Lisans/Lenkeran Devlet Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2007-2012)

Yüksek Lisans/Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2014-...)

10. Mesleki Deneyim:

2014-... Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans

2014-... Denaysel ve Kilinik Araştırmalar Birimi

2015 Yaz Dönemi Merkezi Laboratuvar. Kocaeli Üniversitesi (Stj)

11. Yabancı Dil: İngilizce, Rusça, Türkçe

12. Bilimsel Yayınlar:

Akpınar G, Kasap M, Canturk NZ, Zulfigarova M, Islek EE, Guler SA, Simsek T, Canturk Z. Proteomics Analysis of Tissue Samples Reveals Changes in Mitochondrial Protein Levels in Parathyroid Hyperplasia over Adenoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017; 14(3):197-211.

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen ünvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır.).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönün dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan ünvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü müdürünün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfa i, ii, iii şekilde Roma rakamları onuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıraya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

..... / / 2017

Danışman

İmza