



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Schizosaccharomyces pombe* *sdj1* GENİNİN HÜCRESEL KORUMA
MEKANİZMALARI İLE İLİŞKİSİ**

TUERXUN RESHALAITI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Bedia PALABIYIK**

Temmuz, 2019

İSTANBUL

Bu alışma, 31.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Bedia PALABIYIK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Emre YÖRÜK
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Orta Asyadan gelen bir öğrenci olarak Yüksek Lisans eğitimim süresinde bana yol gösteren hem ders hem de manevi açıdan yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Bedia PALABIYIK'a ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim. Bir yabancı öğrenci olarak zorlandığım konularda her zaman yardımlarını esirgemeyen tüm sınıf ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı'ndaki tüm çalışmalarımda her zaman yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Arş.Gör. Merve YILMAZER'e, Arş. Gör. Burcu KARTAL'a ve Beste BAYRAK'a, çalışmalarımda doğrudan ya da dolaylı yardımı dokunan tüm arkadaşlara teşekkür ederim.

Son olarak o kadar zorluklara rağmen beni okumak istediğim yerlere gönderen ve bana her türlü imkanları sunan, beni maddi ve manevi açıdan destekleyen ve şu an kendileri uzakta olsa da sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim anne ve babama çok teşekkür ederim. Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca kendileri farklı ülkelerde olmasına rağmen bana her türlü yardımcı olmak için can atan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Temmuz 2019

TUERXUN RESHALAITI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. PARKİNSON HASTALIĞI.....	4
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM VE ER STRESİ.....	6
2.3. KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITI	7
2.4. ER STRESİYLE İLGİLİ APAPTOZ YANITI	14
2.4.1. Kaspaz-12'yi Etkinleştirilmesi.....	14
2.5. ER STRESİ VE PARKİNSON HASTALIĞI.....	16
2.6. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> VE ÖZELLİKLERİ	18
2.7. <i>S. pombe sdj1</i> GENİ.....	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	21
3.1. ORGANİZMALAR	21
3.2. BESİ ORTAMLARI	21
3.3. <i>S. pombe sdj1</i> Δ HÜCRESİ'NİN ÜRETİLMESİ VE SAKLANMASI.....	22
3.3.1 <i>S. pombe</i> Hücrelerinin Üremesinin İzlenmesi	22
3.4. ER STRESİNİN İNDÜKLENMESİ	23
3.4.1. Spot Ekim Analizi	23
3.5. <i>S. pombe</i> HÜCRE MORFOLOJİLERİNİN FLORESAN MİKROSKOBUyla İNCELENMESİ	24
3.6. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON ANALİZİ.....	24
3.7. APOPTOZ ANALİZİ.....	26
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	26

4. BULGULAR.....	27
4.1 ÜREME GRAFİĞİNİN ÇIKARILMASI	27
4.2. TUNİKAMİSİNİN <i>S. pombe</i> IRKLARININ CANLILIĞINA ETKİSİ	28
4.3. TUNİKAMİSİNİN <i>S. pombe</i> IRKLARININ HÜCRE MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ	30
4.4. TUNİKAMİSİNİN <i>S. pombe</i> IRKLARINDA HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNE ETKİSİ	30
4.5. <i>S. pombe</i> IRKLARININDA TUNİKAMİSİNİN APOPTOZA ETKİSİ.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ	39



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: PD’de substantia nigranın dejenerasyonu (Stanley ve diğ., 2011).....	4
Şekil 2.2: UPR yolları (Bu süreçler ER stresi karşısında hücrenin hayatta kalma veya ölümünü kontrol eden sinyal iletim yolağını başlatırlar) (Zhang ve Wang, 2012)	8
Şekil 2.3: PERK aracılı sinyalizasyon (CHOP; C / EBP homolog proteini, ERO1; ER oksidoredüktaz 1, eIF2a: Ökaryotik başlangıç faktörü 2, GCN2; genel kontrol deprese edilemez, GADD34; Büyüme önleme ve DNA hasarı indüklenbilir protein, HRI; Heme-regüle edilmiş eIF2alfa kinaz, ATF4; Transkripsiyon faktörü 4’ün aktifleştirilmesi, PKR; Protein kinaz R) (Ron ve Walter, 2007; Zhang ve Wang, 2012).....	10
Şekil 2.4: ATF6 aracılı sinyalizasyon (S1P; serin proteaz bölgesi-1, S2P; metalloproteaz bölgesi-2 proteaz) (Ron ve Walter, 2007)	11
Şekil 2.5: IRE1 aracılı sinyalizasyon (Bcl-2; B-hücreli lenfoma 2, BI-1; Bax inhibitörü-1, CHOP; C / EBP homolog proteini, JNK; Jun N-terminal kinaz, p38 MAPK; p38 Mitojenle aktive olan protein kinaz, TRAF2; TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2, ASK1; Sinyal düzenleyici kinaz 1, DR5; Ölüm reseptörü 5) (Xu ve diğ., 2005; Ron ve Walter, 2007)	12
Şekil 2.6: <i>S. cerevisiae</i> ’de ER stresi ile aktive edilen Ire1(Wu ve diğ., 2014).	13
Şekil 2.7: <i>S. pombe</i> ’de ER stresi ile aktive edilen Ire1 (Wu ve diğ., 2014).....	14
Şekil 2.8: <i>S. pombe</i> ’nin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü (Jürgen Berger, Max Planc Institut).....	18
Şekil 4.1: parental ve <i>sdj1</i> Δ ’nın zamana bağlı üreme grafiği. Hücre sayısı / saat.....	27
Şekil 4.2: Parental ve <i>sdj1</i> Δ ırklarına tunikamisin uygulandıktan sonraki 1., 4. ve 24. saate ait spot ekim sonuçları(K: kontrol grubu, D: deney grubu)	29
Şekil 4.3: Tunikamisinin <i>S. pombe</i> parental ve <i>sdj1</i> Δ ırklarının hücre morfolojisi üzerine etkisi (PK: parental kontrol, PT: parental tunikamisin, SK: <i>sdj1</i> Δ kontrol, ST: <i>sdj1</i> Δ tunikamisin).....	30
Şekil 4.4: Tunikamisin uygulanan <i>S. pombe</i> parental ve <i>sdj1</i> Δ ırklarında kontrollerine göre artan ROT düzeyleri. (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).....	31
Şekil 4.5: Tunikamisin uygulanan ve uygulanmayan <i>S. pombe</i> parental ve <i>sdj1</i> Δ ırklarında apoptoz düzeyinin floresan mikroskobu görüntüleri. (PK: parental kontrol, PT: parental tunikamisin, SK: <i>sdj1</i> Δ kontrol, ST: <i>sdj1</i> Δ tunikamisin).....	32

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ırklarının genotipleri	21
Tablo 3.2: Maya özütü sıvı ve katı besi ortamları	21
Tablo 3.3: PBS hazırlanması	25
Tablo 3.4: Ao/EtBr hazırlanması.....	26



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°	: Derece
~	: Yaklaşık
Δ	: Delta
°C	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
dH_2O	: Distile Su
g	: Gram
KCl	: Potasyum klorür
KH_2PO_4	: Potasyumdihidrojen fosfat
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
Na_2HPO_4	: Disodyum hidrojen fosfat
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: “Optical Density” (optik yoğunluk)
μl	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
AO/EtBr	: Acridine Orange/Ethidium Bromide
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCFH	: 2',7'-Diklorofloresan diasetat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ER	: Endoplazmik Retikulum
PBS	: “Phosphate Buffer Saline”(Tuzlu fosfat tamponu)
PD	: Parkinson hastalığı
rpm	: “Revolutions per minute” (Dakikadaki devir sayısı)
YES	: Takviyeli maya özütü besiyeri (“Yeast Extract Supplemented”)
YES petri	: “Yeast Extract Agar” (Maya özütlü katı besi ortamı)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe *sdj1* GENİNİN HÜCRESEL KORUMA MEKANİZMALARI İLE İLİŞKİSİ

TUERXUN RESHALAITI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

Parkinson hastalığı (PD) bilinen bir tedavisi olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. PD’da nöronların nasıl ve neden bozulduğu az bilinir. Bu süreçte, 6 genin PD oluşumunda etkisi olduğu vurgulanır: α -synuclein, Parkin, PTEN uyarıcı putatif kinaz1 PTEK1, DJ-1, lösin-zengin tekrarlı kinaz2 (LRRK2) ve ATP13A2.

Çalışmada bu genlerden biri olarak dikarbonil bileşiklerinin detoksifikasyonu, otofaji ve oksidatif stres yanıtı gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynadığı bilinen DJ-1 geninin *Schizosaccharomyces pombe*’deki ortoloğu olan *sdj1* geni ele alındı.

Bu tez çalışmasında, Parkinson hastalığına neden olan genlerden DJ-1 geninin *S. pombe*’deki ortoloğu olan *sdj1* geninin endoplazmik retikulum stresi bağlantılı hücresel yanıtlardaki etkisinin biyokimyasal düzeyde araştırılması hedeflendi.

Çalışma sürecinde, ilk olarak, *S. pombe* *sdj1Δ* ve parental ırklarının tunikamisin uygulanması için üreme grafiği çıkarıldı. Buna göre, parentalde kültürün 15.saatinde ve *sdj1Δ*’da kültürün 17. saatinde 1μg/μL tunikamisin 1, 4 ve 24 saat uygulandıktan sonra, spot ekim yapıp *sdj1Δ*’nin tunikamisine karşı duyarlılığı, *S. pombe* parental ırkı ile karşılaştırmalı olarak, belirlendi. 4 saat tunikamisin uygulaması ile hücre içi oksidasyon analizi ve floresan mikroskopunda hücre morfolojileri incelendi. Son olarak, *S. pombe* *sdj1Δ* ırkının, parental ırkla karşılaştırmalı olarak, tunikamisin uygulamasına karşı apoptoz yanıtı araştırıldı.

Sonuç olarak, *S. pombe sdj1* geninin bulunmadığı hücrelerde (*sdj1Δ*), duyarlılığın ve hücre içi ROT seviyesinin artması (*S. pombe* parental ırkta 1.5 kat, *S. pombe sdj1Δ* ırkında 2.5 kat) sonucunda tunikamisin kaynaklı ER stresi ile *sdj1* geninin bağlantısı olduğu, ancak, tunikamisin bağlantılı bir apoptoz oluşmadığı belirlendi.

Temmuz 2019, 53 sayfa.

Anahtar kelimeler: Parkinson hastalığı, ER stresi, *Schizosaccharomyces pombe*, *sdj1*.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

RELATIONSHIP OF *Schizosaccharomyces pombe* *sdj 1* GENE WITH CELLULAR PROTECTION MECHANISMS

TUERXUN RESHALAITI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease without a known cure. It is little known how and why neurons fail in PD. In this process, it is emphasized that 6 genes have an effect on PD formation: α -synuclein, Parkin, PTEN-stimulating putative kinase1 PTEK1, DJ-1, leucine-rich repeat kinase2 (LRRK2) and ATP13A2.

In this study, the *sdj1* gene of *Schizosaccharomyces pombe*, which is known to play a role in various cellular processes such as detoxification of dicarbonyl compounds, autophagy and oxidative stress response, was discussed.

In this study, we aimed to investigate the effect of *sdj1* gene, which is the ortholog of DJ-1 gene in *S. pombe*, on the cellular responses related to stress in endoplasmic reticulum at biochemical level.

In the study process, firstly, growth curve of *S. pombe sdj1Δ* and parental strains for the application of tunicamycin was prepared. According to this, after applying 1μg / μL tunicamycin 1, 4 and 24 hours at the 15th hour of the culture in parental and 17th hour of the culture in *sdj1Δ*, the susceptibility of *sdj1Δ* to tunicamycin compared to *S. pombe* parental race, determined. Intracellular oxidation analysis and cell morphology were examined by fluorescence microscopy with tunicamycin application for 4 hours. Finally, the apoptosis

response of *S. pombe sdj1*Δ against tunicamycin administration was investigated in comparison with the parental race.

As a result, in the absence of *S. pombe sdj1* gene (*sdj1*Δ), increase in sensitivity and intracellular ROT level (1.5 times in *S. pombe* parental race, 2.5 times in *S. pombe sdj1*Δ race) is associated with *sdj1* gene stress. However, it was determined that no apoptosis was associated with tunicamycin.

July 2019, 53 pages.

Keywords: Parkinson's disease, ER stress, *Schizosaccharomyces pombe*, *sdj1*.



1. GİRİŞ

İlk kez 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından, “titrek felç” adıyla tanımlanan Parkinson hastalığı (PD), bu hekimin adıyla anılan ve bugünkü anlamda felç özelliği taşımayan bir hastalıktır (Apaydın ve diğ., 2013). Hastalığın temel belirtileri hareketlerin yavaşlaması, titreme, kasların sertliği, duruş ve denge bozuklukları olarak bilinmektedir (Yin ve Zhou, 2019).

PD, üst beyin sapı bölgesinde yer alan (iki yanlı olarak) substansiya nigradaki beyin hücrelerinin azalmasıyla meydana gelir. Bu hücreler “dopamin” denilen bir maddeyi üretmekten, depolamaktan sorumludur ve bu maddeyi beynin derinliğindeki “striatum” denilen yapıların sinir hücreleriyle kurulan bağlantıda kimyasal iletilici olarak kullanır. Striatum beyin kabuğundan gelen hareketle ilişkin verileri işleyerek ahenk, beceri katar, denge ve koordinasyonu sağlar ve veriler tekrar beyin kabuğu, beyin sapı ve omurilik aracılığıyla kaslara iletilir (Apaydın ve diğ., 2013).

PD genel olarak 40 - 75 yaş arasında, sıklıkla da 60 yaştan sonra görülmeye başlar. Tüm Parkinson hastalarının sadece % 5-10’unda hastalık başlangıç yaşı 20 - 40 arasındadır. Genç yaşta bu hastalığa yakalananların genetik nedenleri araştırılmalıdır. PD, erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sık görülür (Apaydın ve diğ., 2013). Dünyanın her yanında ve çeşitli koşullarda rastlanılan hastalığın görülme sıklığı çeşitli ülkelerde farklı olmaktadır (Liu ve diğ., 2016).

PD'nin oluşmasını geciktiren veya önleyen etkili tedaviler ve yöntemlerde bazı eksiklikler vardır. Dünya nüfusunun yaşlanma sorununun gittikçe artmasıyla, PD anahtar bağlantılarını bulmak ve sistematik, etkili bir tanı ve tedavi yöntemi oluşturmak gereklidir (Wang ve diğ., 2019).

Tek hücreli fasyon mayası olan *Schizosaccharomyces pombe*, Ascomycetes sınıfına dahildir (Forsburg, 2006). Haploid ve diploid genoma sahip olan *S. pombe* genetik çaprazlamaların kolaylıkla yapılabilmesine olanak verir. Ayrıca, hem plazmid aktarımı ile gen klonlama çalışmalarının hem de yüksek etkili homolog rekombinasyon mekanizmalarına sahip olması ile heterolog gen anlatımı çalışmalarının uygulanabilirliği ile yüksek ökaryotik hücresel süreçlerin

araştırılmasında bir ökaryotik model organizma olarak kullanılabilmektedir (Hoffman ve diğ., 2015).

PD proteini olan DJ-1, dikarbonil bileşiklerinin detoksifikasyonu, otofaji ve oksidatif stres tepkisi de dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonlarda rol oynar. DJ-1 ortologları, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın olarak bulunur (Su ve diğ., 2015).

Mayalardan *S.pombe*, *hsp3101- hsp3105* ve *sdj1* (daha önce SpDJ-1 olarak adlandırılmıştır) olarak adlandırılan altı adet DJ-1 ortoloğu içerir. Burada, bu altı genin herhangi birinin delesyona uğraması, uzun süreli durağan fazda bir şekilde otofajiyi etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, bu DJ-1 homologlarının her birinin delesyona uğraması, durağan fazda hayatta kalma oranının da düşmesine neden olur (Su ve diğ., 2015).

S. cerevisiae'deki DJ-1 ortologlarının aksine, *S.pombe* DJ-1 ortologlarının özellikleri oldukça farklıdır; Bu genler arasında, sadece *sdj1*, insan DJ-1 geni ile önemli derecede bir sekans homolojisi sergilerken, Hsp3101-Hsp3105, *E. coli* ve *S. cerevisiae* Hsp31 proteinlerine benzer bir sekans homolojisi sergilemiştir (Su ve diğ., 2015).

Endoplazmik retikulum (ER), hücre dışına gönderilecek proteinlerin ve membran yapısındaki proteinlerin sentezinin ve katlanmasının gerçekleştiği mebranöz ağ yapısında bir organeldir. Protein sentezi için kalite kontrol merkezi olarak da tanımlanmaktadır (McLaughlin ve Vandenbroeck, 2011; Seydel ve diğ., 2012).

ER, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, hücre biyolojisinde temel ve merkezi rolü olan özel bir organel olarak bilinmektedir. ER, membran, lipid ve salgı proteinleri sentezinde, veziküler transportta, proteinlerin katlanmasında ve taşınmasında, strese karşı hücresel yanıt oluşturulmasında ve hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) seviyelerinin düzenlenmesinde görev almaktadır (Chevet ve diğ., 2001; Seydel ve diğ., 2012).

Proteinlerin katlanması çok karmaşık işlem döngüsünden oluşmaktadır ve hata olasılığı oldukça yüksektir. N-bağımlı glikolizasyon inhibisyonu, kalsiyum homeostazının bozulması, hipoksi, oksidatif stres, enfeksiyonlar, ortamın sıcaklığı gibi çok sayıda etkenin proteinlerin doğru katlanması üzerine etkisi vardır. ER stresi olarak tanımlanan böyle stresler ER'nin protein katlama kapasitesini azaltmaktadır ve katlanmamış proteinlerin birikimine yol açmaktadır (Lee, 1965; Seydel ve diğ., 2012).

ER stresi, ER'nin protein katlama kapasitesi ile işlenen protein yükü arasındaki dengenin yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimi ile sonuçlanması olarak da tanımlanır (Tatar ve diğ., 2018).

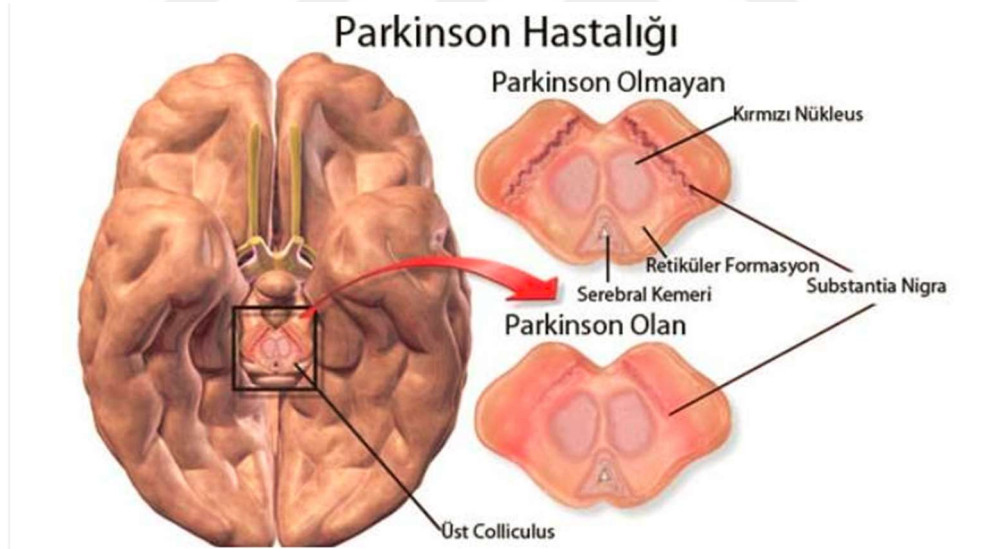
Salgı proteinlerinin fazla miktarda sentezlenmesi, protein katlanmasında rol oynayan proteinlerdeki mutasyonlar, ER'deki Ca^{+2} miktarındaki anormal değişiklikler ve viral enfeksiyonlar ER'de protein birikimine neden olan etkenlerden bazılarıdır (Zhang ve diğ., 2004; Kincaid ve diğ., 2007).

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PARKİNSON HASTALIĞI

Parkinson hastalığı, ilk olarak 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından “titrek felç”, olarak tanımlanmıştır (Apaydın ve diğ., 2013). 1872 yılında da Jean-Martin- Charcot bu hastalığa Parkinson hastalığı (Parkinson's disease, PD) adını vermiştir (Yin ve Zhou, 2019).

Beynin üst beyin sapı bölgesinde yer alan iki yanlı çekirdeklerde dopamin üreten hücreler bulunur (Şekil 2.1). Dopamin, beynin sinir hücreleri (nöronlar) arasında sinyal iletmekten sorumlu olan kimyasallardandır (nörotransmitterdir). Bu hücreler dopamini depolar ve beynin derinliğinde yer alan “striatum” çizgili cisim olarak adlandırılan yapıların sinir hücreleriyle kurdukları bağlantılarda kimyasal iletici görevi üstlenir (Lucas ve Marin, 2007).



Şekil 2.1: PD’de substantia nigranın dejenerasyonu (Stanley ve diğ., 2011).

Yukarıda bahsettiğimiz çizgili cisim beyin kabuğundan gönderilen hareketlere ilişkin verileri işler ve düzeltilmiş veriler tekrar beyin kabuğu, beyin sapı ve omurilikten geçerek kaslara iletilir. Bu şekilde, gerçekleştirdiğimiz hareketlerin ahenkli, ritmik ve incelikli olması sağlanır. Ayrıca bu kimyasal iletici olan dopamin, vücudumuzda dengeyi sağlamakta ve kasların uyumlu olmasında rol oynar (Apaydın ve diğ., 2013).

Beynin bir yarısında yer alan substantia nigradaki sinir hücrelerinin yaklaşık %80'i hasara uğrarsa, o hücrelerin akson uçlarının bağlandığı çizgili cisimdeki dopamin eksikliği karşı beden yarısında hareket bozukluğuna neden olur ve PD semptomları tek yanlı olarak ortaya çıkmaya başlar. Hastalık boyunca her iki çizgili cisimde de dopamin üreten hücrelerin sayısı gittikçe azalır ve tüm bedende PD semptomları görülmeye başlar (Apaydın ve diğ., 2013).

PD'nin dünya genelinde görülme sıklığı % 0,3 civarındadır (Ma ve diğ., 2014). Yaşlılarda sık görülen tipik bir kronik hastalık olarak, yaşlılar arasında PD'nin görülme sıklığı artmıştır, 65 yaş üstü toplumda görülme sıklığı %1-2'dir ve 85 yaş üstü toplumda görülme sıklığı %3-5'tir (Liu ve Chan, 2016; Zhang ve diğ., 2003).

Bu haliyle PD, yaşlılar arasındaki Alzheimer hastalığı (AD) ndan sonra gelen en büyük ikinci kronik nörodejeneratif hastalık olarak belirlenmiştir. Yıllık ortalama görülme sıklığı 8 ~ 18 / 100.000 kişi. 2030 yılına kadar, PD'nin görülme sıklığının yukardakinin iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir. PD'nin görülme sıklığı, 50 yaşın altındaki kişilerde düşüktür ve 60 yaşından sonra belirgin bir şekilde artar (Zhang ve diğ., 2018).

Farklı cinsiyet grupları arasında PD'nin görülme sıklığında fark vardır, PD erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sık görülür. Meta-analizlerde, erkeklerde PD'nin görülme sıklığının kadınlarınkinin yaklaşık 1,46 katı olduğu gösterilmektedir (Liu ve Chan, 2016).

Avrupa, Kuzey Amerika gibi ekonomik açıdan gelişmiş bölgelerde PD'nin görülme sıklığı fark göstermemiştir. Tüm toplumda hastalık görülme sıklığı 100-300 / 100,000 kişidir ve 65 yaşın üzerindeki yaşlılarda hastalık görülme sıklığı yaklaşık 950 / 100,000 kişidir (Liu ve Chan, 2016). Asya'da PD'nin görülme sıklığı düşüktür ve Çin'de görülme sıklığı sadece 16.7 / 100.000 kişi olduğu, Asya'daki tüm popülasyonun hastalık görülme sıklığı 51.3- 176.9 / 100.000 kişidir, Asya dışı bölgelerde ise 61.4 ~ 141.1 / 100.000 kişi civarında olduğu gösterilmiştir (Liu ve Chan, 2016). Çin'deki PD'nin görülme sıklığı düşük olsa da, 11 Nisan 2018'deki 22. Dünya PD Gününde gösterilen yeni istatistiklere göre, dünya genelinde 5.8 milyon Parkinson hastası olduğu ve Çin'deki hasta sayısı yaklaşık 2.6 milyon olarak dünyada ilk sırayı aldığı gösterilmiştir. PD, kötü huylu tümörlerden sonra orta yaşlı ve yaşlı kişilerin iş ve yaşamını ciddi şekilde etkileyen üçüncü faktördür (Zhang ve diğ., 2018).

PD'nin ana sebebi substantia nigradaki dopamin üreten nöronların yavaş yavaş kaybıdır. Mitokondri fonksiyonunun bozukluğu, oksidatif stres, hücre içi Ca^{+2} dengesinin bozulması,

nöroenflamasyon gibi süreçlerin hastalığın gelişiminde rol oynadığı son yıllardaki çalışmalarda ortaya konmuştur (Herrero ve diğ., 2011).

2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM VE ER STRESİ

Endoplazmik retikulum (ER) çok karmaşık ve hassas bir organeldir, bir fosfolipid zar tabakasından oluşan bir dizi kistik ve ince tüpten oluşur. İki ana yapı tipi vardır: biri dış zara bağlı ribozomlardan dolayı elektron mikyograflarında pürüzlü tüp görüntüsüne atfen granüllü endoplazmik retikulumdur (GER), diğeri ise pürüzsüz bir tüp yapısında olan granülsüz endoplazmik retikulum (DER)' dur (Li ve diğ., 2017).

ER heterojen yapısına adapte edilmiş birçok farklı işleve sahiptir. Örneğin, DER, detoksifikasyon, yağ asitlerinin / kolesterolün sentezi ve kalsiyum iyonlarının depolanması gibi fonksiyonlara sahiptir. GER, esas olarak membran proteinlerinin ve salgılanan proteinlerin katlanmasından ve transkripsiyon sonrası işlemlerden sorumludur. ER üzerinde, glikosidaz, kalsiyuma bağlı moleküler şaperonlar, protein disülfid izomeraz ailesinin moleküler üyeleri gibi normal fizyolojik koşullar altında doğru protein katlanmasından sorumlu olan bir dizi moleküler şaperon sistemi vardır (McLaughlin ve Vandenbroeck, 2011).

Ek olarak, ER zarı hücre zarına bağlanır ve nükleer zar ile iletişim kurar, bu nedenle ER hücre içerisindeki çeşitli yapıları birleştirir ve hücre içi maddelerin taşınmasında görevlidir.

ER, proteinlerin kalitesini kontrol eder ve hücre içi kalsiyum seviyelerini ve hücrelerde sentezlenen ve katlanan proteinleri düzenleyerek proteinlerin normal işlevini korur (Lee, 1965). ER fonksiyonu, kalsiyum iyonu konsantrasyonu, redoks homeostazı, oksijen temini vb. gibi ER lümeninin çeşitli faktörlerine bağlıdır (Gotoh ve diğ., 2011). Örneğin, ER lümeninde yeni sentezlenen proteinlerin işlenmesi, yüksek oksidatif ortam ve kalsiyum iyonları gerektiren bir dizi moleküler şaperon ve katlanma enzimi gerektirir. ER, iç ve dış ortamındaki değişikliklere karşı çok hassastır. Katlanmamış / yanlış katlanmış / mutasyona uğramış proteinler (Hetzel, 2012; Viana ve diğ., 2012), reaktif oksijen türleri (Fedoroff, 2006), hipoksi (Sawada ve diğ., 2008), kalsiyum düzenleme bozukluğu (Gorlach ve diğ., 2006), yüksek glukoz / hiperlipidemi (Fonseca ve diğ., 2011; Back ve diğ., 2012) ve çeşitli enfeksiyonlar (Zhang ve Wang, 2012; Sen ve diğ., 2014) ER stresine yol açar.

ER'de katlanmamış proteinlerin yükü ile bu yükü idare eden hücresel mekanizmanın kapasitesi arasında bir dengesizlik sonucu oluşan ER stresini ortadan kaldırmak için hücre katlanmamış protein ("unfolded protein response", UPR) yanıtını devreye sokmaktadır (Yoshida, 2007).

2.3. KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITI

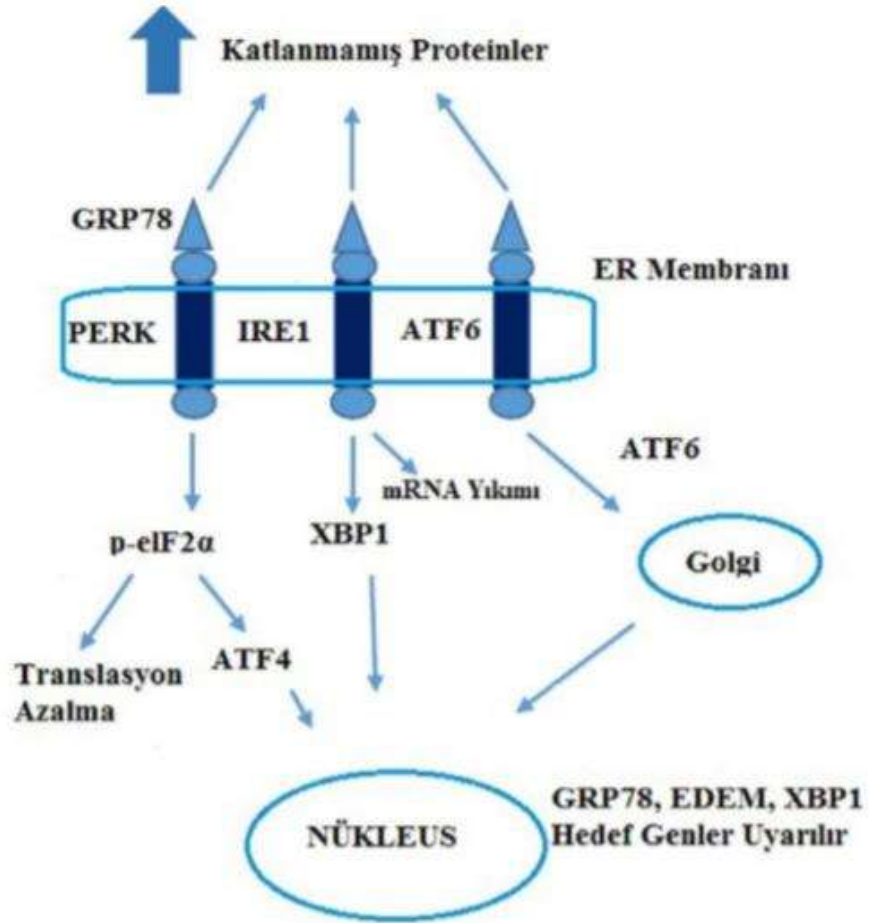
Proteinlerin doğru katlanması, hücre sağ kalımının anahtarıdır: ER'de katlanmamış proteinlerin veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER'nin fonksiyonunu ve bütünlüğünü bozar ve katlanmamış protein (UPR) adı verilen savunma mekanizmasını devreye sokar (Yoshida, 2007). UPR, protein katlanması, kalite kontrolü, ER içine giriş ve organel üretimi gibi farklı işlemlerde yer alan proteinlerin ekspresyonunu seçici olarak düzenleyen karmaşık bir sinyal verme sürecidir. UPR, ER stresini yavaşlatarak ER şaperon ("chaperones") ekspresyonunu indükleyerek UPR'yi geliştirir. Bununla birlikte, yüksek yoğunluklu ER stresi, apoptozu tetiklediği bilinmektedir (Li ve diğ., 2017).

Katlanmamış protein yanıtı, ökaryotlarda genel olarak üç yoldan oluşur: protein kinaz benzeri ER Kinaz (PERK) (Heather ve Harding, 1999), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve İnositol kinaz 1 alfa (IRE1 α) gerektirir (Shen ve diğ., 2001; Yoshida ve diğ., 2001). UPR transdüksiyon proteinleri, salgı yolunda yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol ederek ER'da yanlış katlanmış proteinlerin yüklenmesini azaltır. UPR'nin aktivasyonu, protein katlanmasının ve kalite kontrolünün verimliliğini artırabilir, ER ve Golgi aygıtının üretimini artırabilir, protein salgılanmasını teşvik edebilir ve anormal katlanma proteinlerinin otofaji ve ERAD yolları ile temizlenmesini arttırabilir (Li ve diğ., 2017).

Normal koşullar altında, GRP78 (Bip olarak da bilinir), IRE1, PERK ve ATF6 ile birleşmiş halde olur ve etkin olmaz. Ancak, ER stresi meydana geldiğinde, katlanmamış proteinler GRP78'in diğer bileşenlerden ayrılmasına neden olur, bu da UPR'nin aktivasyonu, ve ER stresinde azalma ve protein yükleme yükünde azalma ile sonuçlanır.

UPR, değişik fizyolojik ve patolojik durumlarda ER'nin adaptasyon için kullandığı yoldur. ER kapasitesinden fazla yükle karşılaşır ve baş edemezse UPR aktive olur. Asıl amaç hücre yaşamının devam ettirilmesi için koruyucu mekanizmaların kullanılmasıdır (Schroder ve Kaufman, 2005; Kapoor ve Sanyal, 2009).

UPR yolaklarının aktive edilmesi sonucu elde edilen ilk yanıt translasyonun durdurularak protein yükünün azaltılmasıdır (Kaufman, 1999). Bu arada şaperonların gen ekspresyonları da arttırılmaktadır (Ma ve Hendershot, 2004) ve katlanamayan proteinlerin ER'ye ek yük getirmemesi için proteinler yıkıma gönderilmektedir (Shen ve Zhang, 2004; Lai ve Teodoro, 2007).



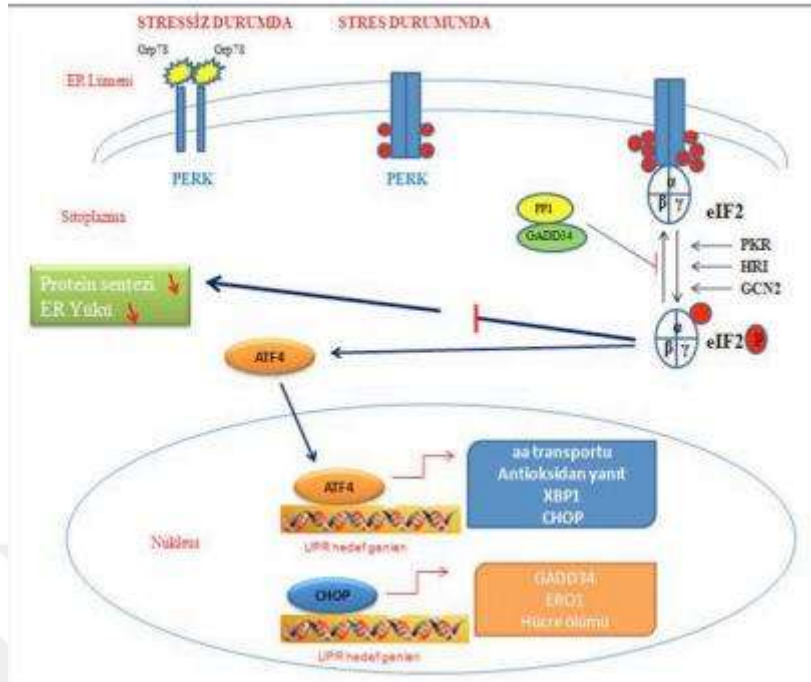
Şekil 2.2: UPR Yolakları (Bu süreçler ER stresi karşısında hücrenin hayatta kalma veya ölümünü kontrol eden sinyal iletim yolağını başlatırlar).

Yanlış katlanmış protein, ER lümeninde biriktiğinde, yeni protein sentezi reaksiyonu hemen inhibe edilir. Bu inhibisyon reaksiyonu, PERK'nin ER stres aktivasyonu sayesinde gerçekleşir. (Heather ve Harding, 1999). Bu kinaz yaygın şekilde eksprese edilebilir, ancak rolü, ER'daki

protein sentezini protein katlama verimliliğine adapte eden, çok salgılanan bir doku olan beyin dokusunda özellikle önemlidir (Owen ve diğ., 2005).

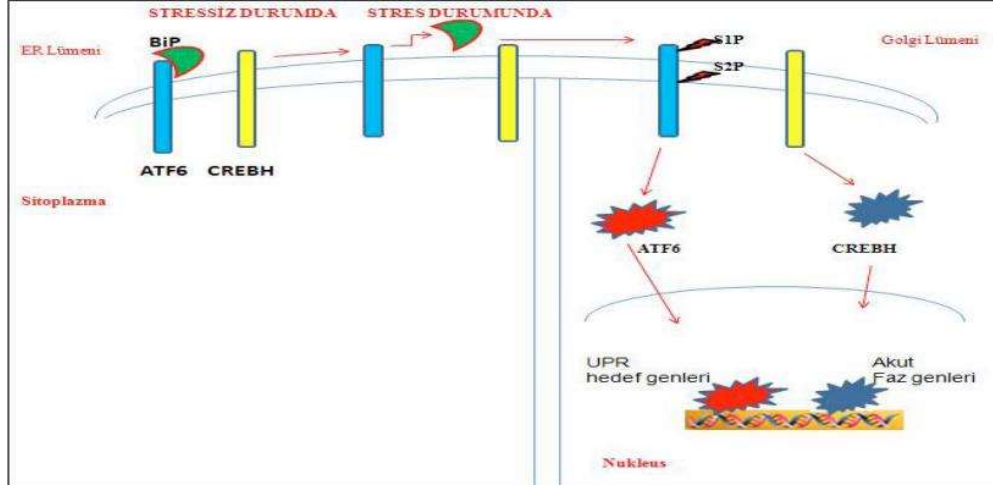
Proteinin katlanması düzgün bir şekilde ilerlerken, PERK etkin değildir ve yanlış katlanmış protein toplandığında, PERK, ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF2a'yı fosforile etmek için aktive edilir (Marciniak ve diğ., 2006). PERK fosforilasyonu için gerekli olan substrat, heterotrimerik GTP bağlayıcı kompleks eIF2'nin alt birimidir ve eIF2, protein sentezinin başlatılmasını düzenler (Heather ve Harding, 1999). Protein translasyonunun başlangıcında, eIF2 ribozoma N-Formilmetilionin-tRNA'yı alır, ancak eIF2'nin alfa alt birimi fosforile edildiğinde, eIF2 bu etkiyi kaybeder ve bu da translasyonun sonlandırılmasına yol açar. Bu nedenle PERK aktivasyonundan sonra ER'a giren protein miktarı azalır, bu da yanlış katlanmış proteinlerin daha fazla birikmesini önler.

EIF2a'nın fosforilasyonu ile protein translasyonu inhibe edilir, ancak mRNA'nın küçük bir kısmı bu koşullar altında daha verimli bir şekilde çevrilir. En iyi örnek, strese duyarlı bir gen başlatma transkripsiyon programını tetikleyen transkripsiyon faktörü ATF4'ün aktivasyonudur (Harding ve diğ., 2003). EIF2a kinaz ailesinin diğer üyeleri, translasyonu inhibe edebilir ve bu strese duyarlı genleri aktive edebilir: örneğin, PKR, çeşitli enfeksiyonlara yanıt verir, HRI, demir eksikliğine cevap verir ve GCN2, amino asit eksikliğine cevap verir (Dalton ve diğ., 2012). EIF2a fosforilasyonu bazı stres yanıtlarını düzenlediğinden, bu yol aynı zamanda kapsamlı stres yanıtı olarak da bilinir (Harding ve diğ., 2003).



Şekil 2.3: PERK aracılı sinyalizasyon (CHOP; C / EBP homolog proteini, ERO1; ER oksidoredüktaz 1, eIF2alfa; Ökaryotik başlangıç faktörü 2, GCN2; genel kontrol deprese edilemez 2, GADD34; Büyüme önleme ve DNA hasarı indüklenebilir protein, HRI; Heme-regüle edilmiş eIF2alfa kinaz, ATF4; Transkripsiyon faktörü 4'ün aktifleştirilmesi, PKR; Protein kinaz R) (Ron ve Walter, 2007; Zhang ve Wang, 2012).

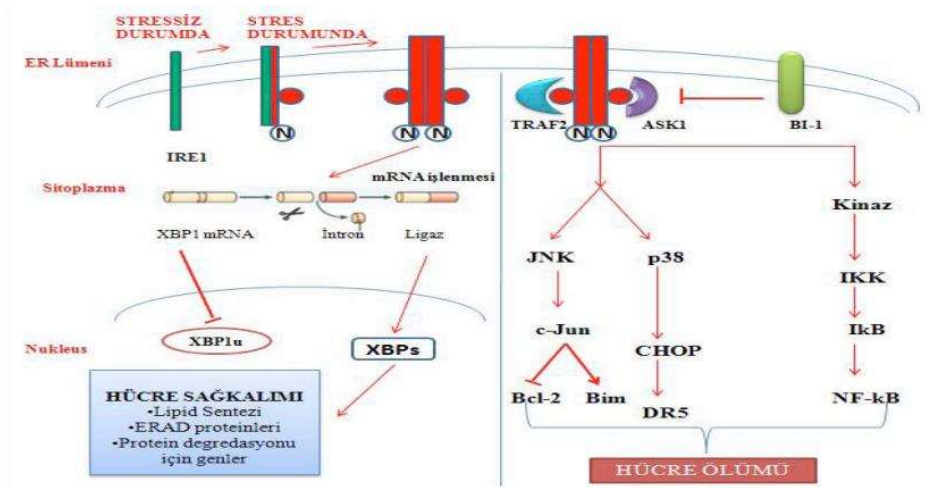
Stres tepkisini düzenleyen PERK ve ATF4 moleküllerine ek olarak, iki ER stres sensörü proteini daha vardır: aktive edilmiş transkripsiyon faktörü ATF6 ve IRE1 (endoplazmik retikulum ve nukleus sinyalleşmesiyle ilgili). Bu iki molekül ayrıca, UPR'da yer alan diğer birçok genleri de düzenler (Marciniak ve Ron, 2006). PERK gibi, bu iki protein de ER şaperon GRP78'e bağlanma nedeniyle normal koşullar altında etkin olmayan ER proteinleridir. Stres meydana geldiğinde, yanlış katlanmış protein ile GRP78 bağlanır ve ATF6'nın serbest bırakılmasını sağlar. Salınan ATF6, Golgi aygıtına taşınır ve Golgi aygıtında serin proteaz S1P ve serin proteaz S2P tarafından kesilir (Haze ve diğ., 1999; Ye ve diğ., 2000). Kesim ürünü, bazık lösin fermuarını (b-ZIP) içeren 50 kD'lik bir moleküler parçadır.



Şekil 2.4: ATF6 aracılı sinyalizasyon (CREBH; cAMP response element-binding protein, S1P; serin proteaz bölgesi-1, S2P; metalloproteaz bölgesi-2 proteaz) (Ron ve Walter, 2007).

Bu moleküler parça, GRP78, CHOP, XBP1 gibi UPR hedef transkriptlerini aktive etmek için sitoplazmadan nukleusa aktarılır (Haze ve diğ., 1999; Yoshida ve diğ., 2001). Astrositler, ATF6'nın bazı fonksiyonlarına benzer şekilde işlev görüyor gibi görünen OASIS adlı ATF6 ile ilgili bir proteini eksprese eder (Kondo ve diğ., 2005). Bu protein astrositlerin ER stresine cevap vermesini sağlar. ATF6 kesilmesi ER stresinin güçlü bir kanıtıdır ve tespit edilmesi zordur, bu nedenle birçok çalışma UPR'nin bu yolunu tespit etmez. Bununla birlikte, ATF6'nın spesifik DNA sekanslarına bağlanmasını ölçmek için *in vitro* olarak hassas haberci moleküllerin kullanılması bu zorluğun üstesinden gelebilir (Davies ve diğ., 2009).

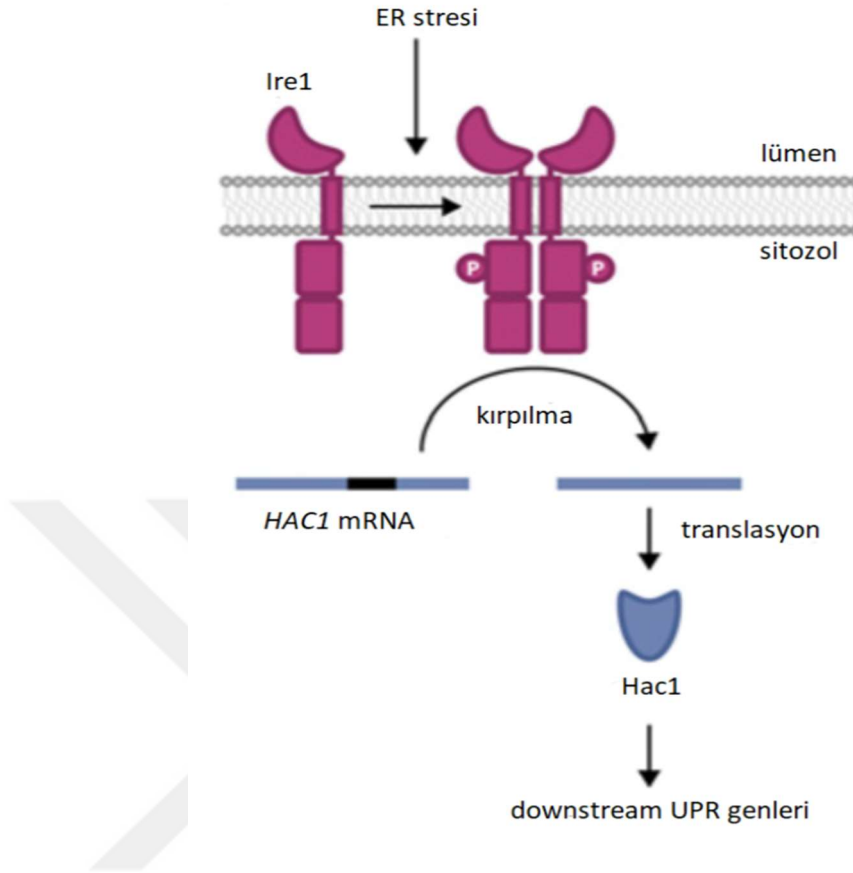
IRE1'in aktivasyonu PERK'ye benzer fakat PERK'den farklıdır ve IRE1, X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'nın spesifik eklenmesini tetiklemektedir (Calfon ve diğ., 2002). Bu ekleme, çerçeve kaymasına neden olur ve sonra aktif XBP1'i ifade eder. XBP1, GRP78'in ifadesini artırır. GRP78 bir ER stresi yanıt elemanı içerir ve UPR'nin Hedef moleküldür, UPR'yi destekleyip ER stresini azaltır ve hücre içi ortamın homeostazına katkıda bulunur. EIF2a'nın fosforilasyonu gibi, XBP1 mRNA'nın spesifik eklenmesi de geçicidir. UPR hedef geninin ER stresini rahatlatmak için uyarılmasının tamamlanmasının ardından, eklenmiş XBP1 mRNA, hücrede hemen bozulur ve bunun yerine eklenme olmaz (Marciniak ve diğ., 2004).



Şekil 2.5: IRE1 aracılı sinyalizasyon (Bcl-2; B-hücreli lenfoma 2, BI-1; Bax inhibitörü-1, CHOP; C / EBP homolog proteini, JNK; Jun N-terminal kinaz, p38 MAPK; p38 Mitojenle aktive olan protein kinaz, TRAF2; TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2, ASK1; Sinyal düzenleyici kinaz 1, DR5; Ölüm reseptörü 5) (Xu ve diğ., 2005; Ron ve Walter, 2007).

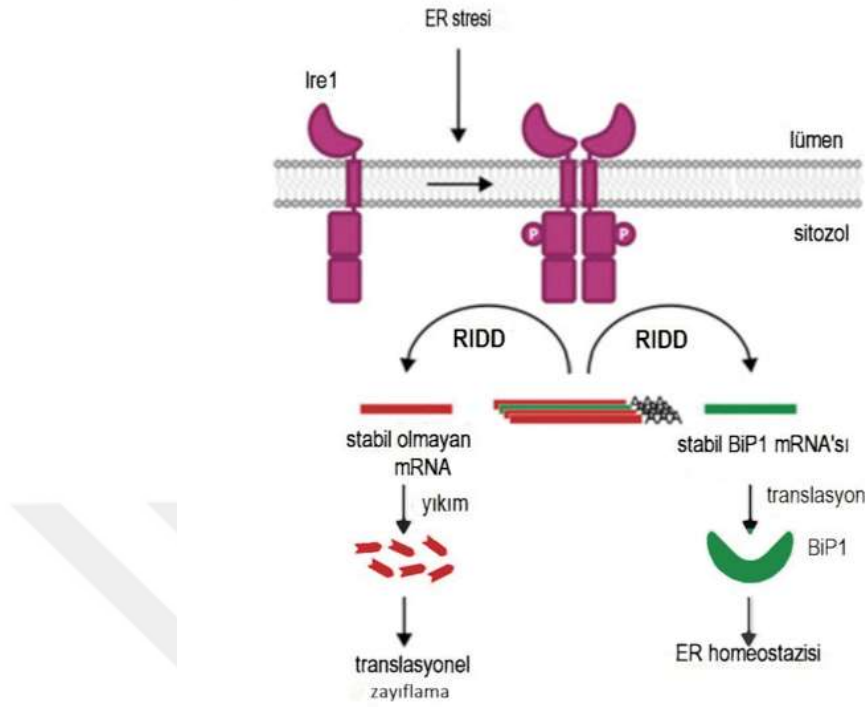
Yukarıdaki üç UPR stres sensörü molekülü esas olarak GRP78 / Bip tarafından düzenlenir (Xu ve diğ., 2005). UPR, genel stres ağının düzenlenmesinde rol oynar, UPR, stresi kontrol edemediğinde, apoptoz gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla hücrelerin kaderini de belirler (Gozuacik ve Kimchi, 2004; Yorimitsu ve diğ., 2006; Ullman ve diğ., 2008; Tabas ve Ron, 2011).

Mayalarda ER stres yanıtında sadece transmembran sensör protein Ire1 bulunmaktadır ve katlanmamış proteinlerin ire1' bağlanması veya moleküler şaperon BiP'in serbest bırakılması ile aktive edilir (Şekil 2.6). Ire1'in aktivasyonuna bağlı olarak otofosforilasyonu gerçekleştikten sonra Ire1'in sitosolik ribonükleaz alt birimi *S. cerevisiae*'de RNA-HAC1 transkriptinin intronunu keserek çıkarılmasını sağlar. Hac1 transkripsiyon faktörü nükleusa geçerek UPR genlerinin düzenmesine katılır (Thibault ve diğ., 2011).



Şekil 2.6: *S. cerevisiae*'de ER stresi ile aktive edilen Ire1(Wu ve diğ., 2014).

UPR de görevli Ire1 korunmuş bir proteindir. Ancak, *S. pombe*'de *S. cerevisiae* HAC1'i veya memeli XBP1 mRNA ortologları *S. pombe*'de bulunmaz (Frost ve diğ., 2012). *S. pombe*'de, Ire1'e bağlı mRNA parçalanmasının düzenlenmesi ("Regulated Ire-1-dependent decay of messenger RNAs", RIDD) mekanizması ER stresi kaynaklı mRNA seviyelerinin düşürülmesinde iş görür (Şekil 2.7). *S. pombe* Ire1'i tarafından kesilen belli mRNA'lar daha kararlı bir form alırlar (Kimmig ve diğ., 2012). Örneğin, bir ısı şoku proteini (HSP70) olan Bip1 mRNA'sının 3' poliA kuyruğunun Ire1 tarafından çıkarılması, Bip mRNA'sının daha kararlı hale gelmesini sağlar.



Şekil 2.7: *S. pombe*'de ER stresi ile aktive edilen Ire1 (Wu ve diğ., 2014).

2.4. ER STRESİYLE İLGİLİ APAPTOZ YANITI

Günümüzde apoptoz mekanizması tam belli değildir, ancak apoptozun mitokondriyal yolağı, ölüm reseptörü yolağı ve ER yolağı ile düzenlenmesi yaygın olarak kabul edilmektedir. ER yolağı son yıllarda keşfedilen başka bir apoptotik yolaktır (Paez ve diğ., 2011). ER stresi, diğer yolaklardan bağımsız olarak apoptozu doğrudan indükleyebilir (Kloet ve diğ., 2005). ER stresine bağlı apoptoz temel olarak aşağıdaki hususlarda ortaya çıkar.

2.4.1. Kaspaz-12'yi Etkinleştirilmesi

ER stresine bağlı apoptozun önemli bir molekül olan Caspase-12, ER stresinin spesifik bir apoptotik üyesidir ve ER zarında bulunur (Smith, 2005). Kaspaz-12, kaspaz-3 aktivasyonunu indükler (Hitomi ve diğ., 2004). Kaspaz-12'ye bağlı kaspaz-3 aktivasyonu, çapraz apoptoz ile tetiklenebilir, yani ER stresi ile indüklenir ve en son mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar. (Boya ve diğ., 2002; Germain ve diğ., 2002; Hori ve diğ., 2002). ER stresi oluştuğunda,

sitoplazmada kaspaz-7 otoaktivasyon ile kaspaz-12 kesilir ve kaspaz-12 sonra ER'dan sitoplazmaya taşınabilir ve disregülasyonla kaspaz apoptoz yolunu aktive eder.

2.4.2. CHOP İfadesini İndüklenmesi

ATF4 tarafından indüklenen CHOP transkripsiyon faktörü, ER stresinin apoptotik bir marker olarak yaygın şekilde kabul edilmiştir ve Chop - / - hayvanlar, ER stresi kaynaklı hücre ölümüne karşı dirençlidir (Marciniak ve diğ., 2004). CHOP aşırı ekspresyonu, diğer uyarıcılar olmadan hücre ölümünü indükleyebilir ve CHOP ekspresyonu, patolojik koşullar tarafından aktive edilen UPR'de de tespit edilebilir. CHOP eksikliği, hücreleri ve hayvanları ER stresi kaynaklı hücre ölümünden belli bir yere kadar koruyabilir (Oyadomari ve Mori, 2004). CHOP, anti-apoptotik protein Bcl-2'nin aşağı regülasyonunu indükler ve Bcl-2, hücrelerin CHOP ile indüklenen apoptozisini önlemesini önler (Matsumoto ve diğ., 1996; McCullough ve diğ., 2001). CHOP ayrıca transkripsiyonla indüklenen pre-apoptotik protein Bim ile hücre ölümünü düzenler (Puthalakath ve diğ., 2007).

2.4.3. IRE1 Yolağı ile İlişkili Apoptoz İndüklenmesi

Son zamanlarda IRE1'e bağımlı UPR çalışmaları, IRE1'in endoplazmik retikulum stresi altında hücre kaderinin ana düzenleyicisi olduğunu doğrulamıştır (Chen ve Brandizzi, 2013). IRE1 α , tümör nekroz faktörü reseptör-ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve apoptotik sinyal kinazı 1'e (ASK1) bağlanır, daha sonra amino-terminal kinazı (JNK) ve nükleer faktör-B'yi (NF- κ B) aktive ederek apoptozu yol açar. Aynı zamanda bunlar PD ile ilişkilidir.

2.4.4. ER Stresi ile İlişkili Diğer Apoptotik Yolakların Uyarılması

CHOP ve kaspaz-12 yoluyla doğrudan ER stresi tarafından indüklenen apoptotik yolağı ek olarak, ER ve mitokondri arasındaki etkileşimler tarafından indüklenen apoptotik yolaklar ayrıca, esas olarak mitokondriden kaspaz salıvermek ve aktive etmek için sitokrom c indükleyerek gösterilmiştir (Hacki ve diğ., 2000). Çalışmalar, TNF reseptör bağlama faktörü 2 (TRAF2) apoptoz sinyal kinaz 1 (ASK1) aracılı yolağın ER stresi ile ilişkili apoptozda da rol oynadığını göstermiştir (Takeda ve diğ., 2003). ER stresi ayrıca otofajiye neden olabilir. Genel olarak, otofaji, parçalayıcı ve dolaşımdaki yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu stres yaşadıklarında, hücrelere besin sağlayan hücrelere koruyucu bir mekanizma görevi görür (Ding

ve Yin, 2008), ancak hücre stresi devam ettiğinde ya da fazla olduğunda, Otofaji, hücrelerde kaspazdan bağımsız apoptozu teşvik eder (Gozuacik ve Kimchi, 2004).

2.5. ER STRESİ VE PARKİNSON HASTALIĞI

PD'nin patogenezi tamamen net değildir, ancak genellikle yaş, genetik faktörler ve çevresel faktörlerin kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Bekris ve diğ., 2010). PD patolojisi üzerine yapılan bazı çalışmalar, PD oluşumunun, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, hücre içi kalsiyum metabolizması bozukluğu, aşırı serbest radikal üretimi ve sinir büyüme faktörü eksikliği ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Li ve diğ., 2017).

Son yıllarda, birçok çalışma ER Stresinin PD patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Cooper ve diğ., 2006; Thayanidhi ve diğ., 2010), ancak etki mekanizması tam olarak belli değildir. PD'de endoplazmik retikulum stres üzerine yapılan çalışmalar, endoplazmik retikulum stresinin, PD'dan sonra genetik ve moleküler seviyelerde meydana geldiğini ve PD tedavisi için yeni fikirler sunmayı amaçladığını göstermiştir (Li ve diğ., 2017).

ER stresi ve PD arasındaki bağlantı klinik çalışmalar ve hayvan modeli deneyleri ile doğrulanmıştır. Örneğin, PD hastalarından alınan örneklerde ER stresi belirteçlerinden PERK ve eIF2a genlerinin ekspresyonlarının indüklendiği gözlemlenmiştir (Hoozemans ve diğ., 2007). Alfa-sinükleini aşırı eksprese eden transgenik bir fare modelinde de GRP78, XBP1, CHOP ve ATF4 genlerinin ekspresyonları da tetiklenmiştir (Bellucci ve diğ., 2011). Alfa-sinüklein'in aşırı ekspresyonu, ER ve Golgi aygıtı arasındaki vesikül alışverişini bozmakta ve bu da ER stresinin gelişmesine yol açmaktadır (Cooper ve diğ., 2006; Thayanidhi ve diğ., 2010).

Mitokondriyal toksin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), rotenon ve 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), dopaminerjik nöron ölümüne neden olabilir. Mitokondriyal kompleks I'in aktivitesini inhibe ederler veya oksidatif fonksiyonunu tahrip ederler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini teşvik ederler (Gee ve Davison, 1989). Transkripsiyonel değişiklikleri tanımlamak için fonksiyonel genomik yöntemi kullanılmıştır ve birçok gen değişikliğinin UPR ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Ryu ve diğ., 2002). Özellikle, UPR sinyali yolundaki ana molekül olan CHOP transkripsiyon faktörü, GRP78, XBP1'in eklenmesi ve PERK ve JNK'lerin sinyal yollarını içeren moleküller de dahil olmak üzere birçok UPR işaretleyicisinin yanı sıra önemli ölçüde anlatımlarının uyarılması ile düzenlenir. 6-OHDA, rotenon ve MPP + kaynaklı PD hücre modellerinin sonuçları, UPR sinyali yolundaki birçok

molekölün transkripsiyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığını ve sonuçlar ER disfonksiyonunun PD patogenezinde rol oynadığını doğrulamaktadır (Ryu ve diğ., 2002; Holtz ve O'Malley, 2003; Yamamuro ve diğ., 2006).

Mitokondriyal toksinin ER stresini indüklediği olası bir mekanizma, bu toksinlerin, mitokondriyal solunum zincirinde okside olmuş proteinlere zarar vermesi ve biriktirerek ER Stresine yol açmasıdır (Friedlander ve diğ., 2000). Araştırmalar ayrıca PD hastalarının ve PD'nin hücre modelinde, ER izomerazın (PDI) S-nitrosillenmiş olduğu ve PDI aktivitesinin inhibe edilmesine ve poliübikuitinli proteinlerin birikmesine yol açtığını göstermiştir (Uehara ve diğ., 2006). Rotenon kaynaklı SK-N-MC hücrelerinde, ROS, SK-N-MC hücrelerinde rotenon kaynaklı erken apoptozide yer almaması, ER stresinin önemli bir rol oynayabileceğini düşündürdüğü rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2008). Bu durumda, ER stresinin dopaminerjik nöronların erken ölümünde daha büyük bir rol oynayabileceğini ve buna bağlı olarak da ER stresinin erken müdahalesinin, PD'nin tedavisi ve önlenmesi için büyük öneme sahip olabileceğini düşündürür.

Kalıtsal PD'nin çoğu, α -sinüklein, parkin, ubikuitin karboksi terminal hidrolaz (UCHL-1), LRRK2 / dardalina, DJ-1, PINK-1 ve ATP kinaz 13A2 (ATP13A2) dahil olmak üzere çoklu gen mutasyonlarından kaynaklanır (Shen, 2004; Ramirez ve diğ., 2006).

Smith, α -synuclein'in, endoplazmik retikulum stresi arttırdığını ve A53Ta-synuclein mutasyonundaki PC12'de kaspaz-12 aktivitesini arttırdığını tespit etmiştir (Smith, 2005). Parkin geni aynı zamanda kalıtsal PD'na bağlı bir gendir. Parkin proteini, katlanmamış proteinlerin parçalanmasında rol oynayan bir enzim olan ubikuitin E3 ligaz olarak tanımlanmıştır (Zhang ve diğ., 2000). Parkin proteinleri hücreleri ER stresinden korur (Yuzuru, 2000).

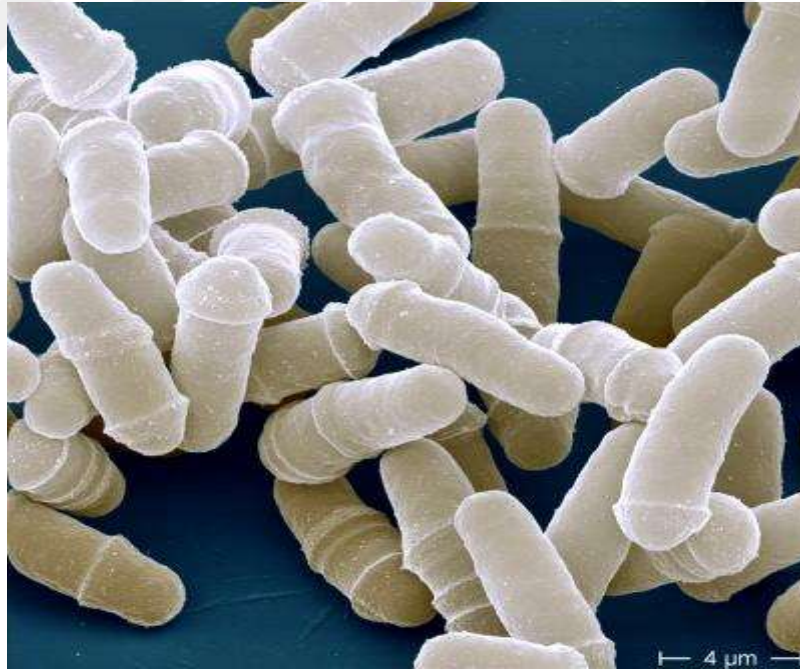
Nöronal hücreler ER stresi ortamındayken, Parkin proteininin ekspresyon seviyesi upregüle edilemez (Dolores ve diğ., 2002), bu nöronal hücrelerin ER strese göre parkin proteini ekspresyonunu aktifleştirmemesi hücrelerin ciddi stres altında kalmasına neden olduğunu ve böylece hücrelerin daha çok hasar aldığını belirtir. Parkinin proteozomu tamir etmede rolü vardır, böylece hücre canlılığını artırır. Parkin'deki mutasyonlar ER stresine yol açan hücre içi toksik fibrin birikimine neden olarak ER stresine neden olabilir (Imai ve Takahashi, 2004). LRRK2, Parkinson hastalarının beyinde yaygın olarak bulunur ve endoplazmik retikulumda

lokalize eden LRRK2'deki mutasyonlar, ER stresi ile ilişkili olabilecek nöronal hücre ölümünü artırır (Vitte ve diğ., 2010).

Ryu ve diğ (2002), çeşitli PD hücre modellerinde farklı gen ifadelerini analiz etmiş ve katlanmamış protein tepkilerinin aktivasyonu ile ilişkili genlerin, transkripsiyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır.

2.6. *Schizosaccharomyces pombe* VE ÖZELLİKLERİ

Schizosaccharomyces pombe, veya "fısyon mayası", maya tipi tek hücreli bir ökaryottur. Hücreler çubuk şeklinde, 3-4 mikrometre çapında, 7-14 mikrometre uzunluğundadır (Şekil 2.8) (Forsburg, 2005). 1893'de P. Lindner tarafından "Pombe" adlı Doğu Afrika bira mayasından izole edilmiş ve *Schizosaccharomyces pombe* olarak adlandırılmıştır (Lindner, 1893). *S. pombe* ortadan ikiye bölünerek çoğaldığı için, adlandırma, yaygın olarak çalışılan tomurcuklanarak bölünen *Saccharomyces cerevisiae*'den farklılığını vurgulayacak şekilde yapılmıştır (Hoffman, 2015).



Şekil 2.8: *S. pombe*'nin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü (Jürgen Berger, Max Planck Institut).

S. pombe'nin hücre döngüsü dört faza (G1, S, G2 ve M) ayrılır (Russell ve Nurse, 1986). Öncelikle G1 fazında (gap1) hücre metabolik olarak aktiftir, bu fazda DNA sentezi için gerekli

olan proteinler sentezlenir. S fazında (sentez fazı) DNA replikasyonu gerçekleştirilir. G2 fazında (gap2) hücre büyümeye devam eder ve mitoz için gerekli olan proteinler sentezlenir. M fazında ise (mitoz ya da mayoz) genetik içeriği eşit olarak iki yavru hücreye dağıtılır ve sitokinez ile iki bağımsız hücre meydana getirilir (Egel, 2004).

S. pombe haploid ve diploid yaşam döngüsüne sahiptir ve hem vegetatif hem de eşeyli üreme geçirmektedir (Kelly ve diğ., 1988). *S. pombe* eşey (mat1) lokusunda 3 adet allel (h^+ , 975, P; h^- , 972, M; h^{90} 968) bulunmaktadır (Leupold, 1950).

S. pombe genom dizilemesi (Wood ve diğ., 2002), tamamlanan 6. ökaryotik model organizmadır (Smith et al. ve diğ., 1987). Genom boyutu 13.8 Mbp olup 5118 adet protein kodlayan gen tanımlanmıştır. 5.7, 4.6 ve 3.5 Mbp boyutlarında 3 adet kromozomu vardır (Robinow ve diğ., 1997; Kim ve diğ., 2010).

1950'lerde Leupold'un başlattığı genetik çalışmaların ardından 1970'lerde Nurse'ün hücre döngüsü çalışmaları ile dikkat çeken *S. pombe*'yi *S. cerevisiae* gibi kolay üretilmesi, genomunun küçük olması, manipülasyon tekniklerinin kolay uygulanması, haploid ve diploid genoma sahip olması, genetik ve moleküler biyoloji alanlarında model olarak kullanılmasının yanı sıra, genlerin organizasyonu, yapısı, RNA işlenmesi ve gen ekspresyon düzenlemesi ve post-translasyonel modifikasyonların korunmuş olması ve daha çok yüksek ökaryotlara benzemesi, biyoteknoloji alanında da heterolog protein üretiminde konak olarak yaygın kullanımına yol açmıştır (Mateos ve Domingues, 1991; Gigi Hama ve diğ., 2000; Palabiyik ve diğ., 2008; Cheret ve diğ., 2010).

Ayrıca *Schizosaccharomyces pombe*, biyolojik evrimde önemli bir taksonomik statüye sahip olan eski bir tek hücreli ökaryottur. Genomu nispeten küçük olduğu için çoğu gen, tek kopyadır, bu nedenle genetiği değiştirmesi kolaydır. Biyologlar tarafından ökaryotik canlıların moleküler biyoloji ve hücre biyolojisini çalışmak için bir model organizma olarak kullanılmaktadır.

2.7. *S. pombe* *sdj1* GENİ

Parkinson hastalığı proteini DJ-1, dikarbonil bileşiklerinin detoksifikasyonu, otofaji ve oksidatif stres tepkisi de dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonlarda rol oynar. DJ-1 ortologları, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın olarak bulunur, bu da stres içinde yer alan proteinlerin bir süper ailesini oluşturur (Su ve diğ., 2015).

Mayalardan *Schizosaccharomyces pombe*, *hsp3101- hsp3105* ve *sdj1* (daha önce SpDJ-1 olarak adlandırılmıştır) olarak adlandırılan altı adet DJ-1 ortoloğu içerir. Burada, bu altı genin herhangi birinin silinmesinin, uzun süreli durağan fazda bir şekilde otofajiyi etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, bu DJ-1 homologlarının her birinin silinmesi, durağan fazda hayatta kalma oranının da düşmesine neden olur (Su ve diğ., 2015).

S. cerevisiae DJ-1 ortologlarının aksine, *S. pombe* DJ-1 ortologlarının özellikleri oldukça farklıdır; Bu genler arasında, sadece *sdj1*, insan DJ-1 ile önemli derecede bir sekans homolojisi sergilerken, Hsp3101-Hsp3105, *E. coli* ve *S. cerevisiae* Hsp31 proteinlerine benzer bir sekans homolojisi sergilemiştir (Su ve diğ., 2015).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMALAR

Çalışmada kullanılan *Schizosaccharomyces pombe* EDD666 ve *sdj1Δ* ırkları (Tablo 3.1) Bioneer'den temin edilmiş olan *S. pombe* mutant kitaplığından sağlanmıştır.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ırklarının genotipleri.

İrk	Genotip
EDD666 Parental	h ⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32
EDD666 <i>sdj1Δ</i>	h ⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 <i>sdj1::KANMX4</i>

3.2. BESİ ORTAMLARI

Çalışma boyunca *S. pombe* hücrelerinin üretilmesinde maya özütü (“Yeast extract”) sıvı ve katı (YES, YES Petri) besi ortamları kullanıldı. Besi ortamlarının içerikleri aşağıdaki tabloda verildi (Tablo3.2).

Tablo 3.2: Maya özütü sıvı ve katı besi ortamları.

YES Petri (1L)	YES (1L)	Maya Ekstresi (“Yeast Extract”)	5 g
		Glukoz	30 g
		Distile su	1000 mL
		Adenin	50 mg/L
		Urasil	50 mg/L
		Histidin	50 mg/L
		Lizin	50 mg/L
		Losin	50 mg/L
		Agar	20 g

YES besi ortamları tabloda verilen içerikler distile su ile çözülerek hazırlandı. Çalışma süresi boyunca kullanılan besi ortamları otoklavda 121°C'da 1.2 atm basınç altında 15 dakika steril edildi.

3.3. *S. pombe* *sdj1Δ* HÜCRESİ'NİN ÜRETİLMESİ VE SAKLANMASI

Çalışmalar sırasında kullanılan *S. pombe* ırkları üretilmesinde ve saklanmasında Gutz ve diğ. (1974) önerdikleri standart yöntemler kullanıldı.

-80°C'de %50 gliserol içinde saklanan stoklardan alınan *S. pombe* ırkları YES petri besi ortamında 30°C'de 3 gün inkübe edildi. Bu kültürden öze ile alınan bir miktar örnek YES petri besi ortamına tek koloni düşürme tekniği ile ekildi ve 30°C'de 2 gün üremeye bırakıldı. Rastgele seçilen tek bir koloni, ışık mikroskopunda morfolojileri gözlemlendikten sonra eğri YES petri besi ortamına öze ile ekilerek 30°C'de 2 gün inkübe edildikten sonra stok kültür olarak +4°C'de saklandı. Bu stok her 30 günde bir yenilendi ve tüm deneyler bu stoktan öze ile alınan bir miktar hücrenin YES petri veya YES sıvı besi ortamlarında çoğaltılmasıyla başlatıldı. *S. pombe* *sdj1Δ*'nin çoğaltılması YES petri besi ortamında 30°C'de 2 gün, YES sıvı besi ortamında 30°C'de 150 devir/dakika çalkalamalı etüvde (Benchmark Incu-Shaker Mini) 1 gün inkübe edilerek gerçekleştirildi.

3.3.1. *S. pombe* Hücrelerinin Üremesinin İzlenmesi

Üremeleri izlenecek *S. pombe* ırkları katı besi ortamında 30°C'da 2 gece üretildikten sonra, 2 mL distile su ile süspanse edilerek toplandı. 100 kat sulandırılan bu süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı Malassez lamı kullanılarak, aşağıdaki (Denklem 3.1) formülden yararlanılarak hesaplandı. Ortalama hücre sayısı mikroskopta sayım yapılarak belirlendi.

$$\text{Hücre sayısı / mL} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırım oranı} \times 10^5 \quad (3.1)$$

S. pombe ırkları 10^6 / mL hücre olacak şekilde 20 mL YES sıvı besi ortamına ekildi. Çalkalayıcı etüvde (Benchmark Incu-Shaker Mini) 150 devir/dakika 30°C'da üremeye bırakıldı. Hücrelerin üremesindeki artış her iki saatte bir 96 kuyulu plakalarda 2 tekrarlı olarak, her kuyuya 200 µL alınarak spektrofotometre cihazında (EON, Biotek Instruments Inc.) 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğun (OD₆₀₀) ölçülmesi ile belirlendi. Bu şekilde 34 saat boyunca ölçüm alındı. OD değerlerini zamana bağlı hücre/mL cinsine çevirmek için, parental ve *sdj1 Δ* ırklarına ait

zamana bağılı üreme grafiğı çıkarıldı. Bunun için, mililitresindeki hücre sayısı bilinen sulandırım serileri 600 nm dalga boyunda ölçülerek, OD₆₀₀-hücre sayısını gösteren zamana bağılı üreme grafiğı çizildi.

Her iki *S. pombe* ırkının jenerasyon sayı ve süreleri (Denklem 3.2 ve Denklem 3.3)'lere göre hesaplandı.

$$\text{Jenerasyon sayısı (n)} : \frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2} \quad (3.2)$$

$$\text{Jenerasyon süresi (S}_t\text{)} : \frac{T_2 - T_1}{n} \quad (3.3)$$

N₂ : Logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı T₁: Logaritmik üremenin başlama zamanı

N₁ : Kültürdeki üremenin başlangıcındaki hücre sayısı T₂: Logaritmik üremenin bitiş zamanı

n: Jenerasyon sayısı

3.4. ER STRESİNİN İNDÜKLENMESİ

3.4.1. Spot Ekim Analizi

ER stresinin indüklenmesi, asparajin-bağılı glikoproteinlerin sentezinin ilk adımında görev alan GPT (GlcNAc fosfotransferaz) enzimini inhibe ederek hücrede ER lümeninde N-glikozilasyonu durduran bir antibiyotik olan tunikamisin (Sigma-Aldrich, Almanya) ile gerçekleştirildi. *S. pombe* ırklarının üreme grafiğinden yararlanılarak tespit edilen logaritmik fazın ortasında 1 mg/mL tunikamisin uygulandı. Tunikamisin dozu (1 mg/mL) DMSO (Dimetil Sülfoksit)'da çözülerek hazırlandı (Özarabacı, 2019).

Logaritmik evrenin ortasındaki *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarına ait hücre kültürleri kontrol (PK ve SK) ve deney (PT ve ST) grubu olarak ikiye ayrıldı. Deney gruplarına 1 mg/mL tunikamisin eklenirken, kontrol gruplarına tunikamisin eklenmedi. Hücreler (PK, PT, SK, ST) 30°C 150 devir/dakika çalkalamalı etüvde inkübasyona devam ettirildi. Tüm gruplardan 1., 4. ve 24. saatlerde spot ekim yapmak için sulandırım serilerinde kullanılmak üzere 100 µL örnek alındı.

Belirlenen saatlerde alınan bu örnekler bir kez steril distile su ile yıkanarak 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ve 10^5 kat sulandırıldıktan sonra 5'er μL olarak YES petri besi ortamına spot ekimleri yapıldı. Hücreler 3 gün 30°C 'de inkübasyona bırakıldı.

3.5. *S. pombe* HÜCRE MORFOLOJİLERİNİN FLORESAN MİKROSKOBUYLA İNCELENMESİ

Kontrol ve deney grubuna ait hücrelerin morfolojileri ve özellikle nukleus yapılarının analizi için (Johnson, 1981; Williamson ve Fennell, 1975) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, ThermoFisher) floresan boyası kullanılarak floresan mikroskopta (Olympus BX53, Japonya) görüntü alındı.

Deney ve kontrol gruplarına ait taze hücre kültürlerinden 1'er mL mikrosantrifüj tüplerine alınan örneklerin üzerine 1/10 oranında (100 μL) %37 formaldehit eklendi, oda sıcaklığında 1 saat fikse edildikten sonra 7000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler 0.1 M potasyum fosfat (p.H 7,5) ile yıkandı, 2 $\mu\text{L}/\text{ml}$ β -merkaptoetanol içeren 1 mL 0.1 M Potasyum Fosfat ile süspanse edildi ve 30°C 'de 30 dk inkübasyonu takiben çöktürülen hücreler 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI içeren PBS'te 1 saat, karanlıkta inkübe edildi. Bu süspansiyondan 10 μL alınan örnekler polylysin kaplı lamlara aktarılarak preparatlar hazırlandı.

3.6. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON ANALİZİ

Hücre içi oksidasyon düzeyinin belirlenmesinde Inoue ve diğ. (1999) ile Pereira ve diğ. (2003) tarafından önerilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. ROS üretimi, hücrelere ROS'a özgü boya 2',7'-diklorodihidrofloresan diasetat (DCFH) ile boyanarak ölçüldü. Bu reaktif, canlı maya hücrelerine nüfuz edebilir, ancak ROS tarafından oksitlenmediği sürece floresans vermez.

Çalışmada, tunikamisin uygulanan deney gruplarından 4. saat 1'er mL hücre süspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine alınıp 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1'er mL taze YES sıvı besi ortamında süspanse edilip 24 kuyulu plakaya alındı. Her bir kuyuya 5.2 μL (son derişim 40 μM olacak şekilde) DCFH eklenip, 1 saat boyunca 30°C 180 devir/dakika çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda örnekler plakadan mikrosantrifüj tüplerine alındı. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücreler üst sıvı atıldıktan sonra bir kez 1'er mL steril dH_2O ile yıkandı. Son kez 5000 rpm'de 5 dakika çöktürülüp üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 450 μL PBS

(Tablo 3.3) ile süspanse edildi. Spektroflorometre (Biotek FLx800) cihazında okunması için opak siyah 96'lık mikroparka kuyularına 200 μ L olacak şekilde replikalarıyla birlikte dağıtıldı. Cihazda floresan ışımanın 600 saniye aralıklarla 16 kez kinetik okuması, 485/20 eksitasyon ile 530/20 emisyon dalga boyunda ve 37°C'de gerçekleştirildi. Her 106 hücreye denk gelen ışıma miktarı hesaplanarak floresan şiddeti grafiği çizildi.

Spektroflorometre cihazının süreç sonunda verdiği sonuçlar, kültürlerdeki canlı hücre sayısına bölünerek, 10^3 hücreye denk gelen floresans ışıma miktarı hesaplandı. Zamana bağlı olarak tunikamisin uygulanmış gruplardaki floresans ışıma miktarı değişimi, bu değerleri kontrol grupları değerlerine bölünerek hesaplandı. Parental ve *sdj1* Δ ırklarının kontrol gruplarına göre tunikamisin uygulanmış gruplarına ait zamana bağlı canlı hücre sayısındaki değişim ve hücre içi oksidasyon miktarını gösteren grafik bu değerler karşılaştırılarak çizildi.

Tablo 3.3: PBS hazırlanması.

Bileşen	Miktar (g/L dH ₂ O)	Son Konsantrasyon (mM)
NaCl	8	137
KCl	0,2	2,7
Na ₂ HPO ₄	1,44	10
KH ₂ PO ₄	0,24	1,8

3.7. APOPTOZ ANALİZİ

Bu tez kapsamında tunikamisin uygulanan *S. pombe* ırklarında apoptoz oluşup oluşmadığı Ao/EtBr boyaları kullanılarak floresan mikroskopunda incelendi. Buna göre, kontrol ve deney gruplarına ait taze hücre kültürlerinden alınan örnekler (100 µl) 1,5 mL PBS ile iki kere yıkandı, 5 dk 7200 rpm’de santrifüj edildi, 100 µL hücreye (2×10^5) 5 µL AO/EtBr eklendi (Tablo 3.4), oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı, tekrar 5 dk 7200’de rpm santrifüj edildikten sonra PBS ile iki kere daha yıkandı ve 100 µL PBS ile çözündürüldü, 7 µL (25 µL) mikroskopta incelendi, Red 450-490 nm (B2A filtre iki ph2), sonuç olarak apoptoza uğramış hücreler turuncu, canlı hücreler yeşil renklerde görülmesi beklenir.

Tablo 3.4: Ao/EtBr hazırlanması.

	Ao	EtBr	PBS
Ao/EtBr (60 µg mL / 100 µg mL)	60 µL	100 µL	840 µL

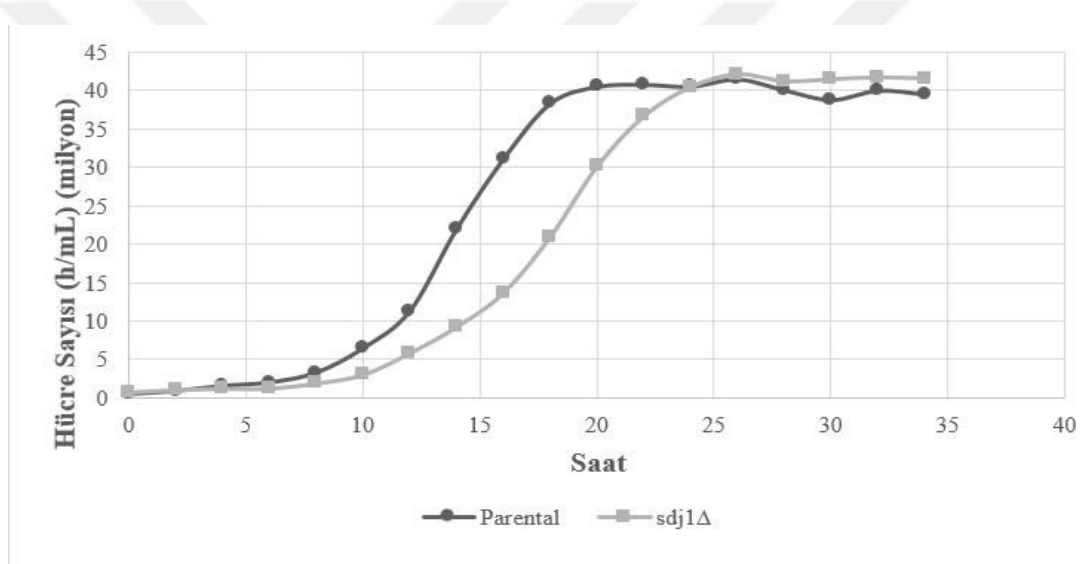
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma iki deney tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Deney ile kontrol grupları arasındaki farkı tespit etmek üzere tek yönlü varyans analizi (“One-way ANOVA”) kullanıldı. Gruplar arası ortalama varyansının, grup içi dağılım varyansına oranı $P < 0.05$ olarak hesaplandığında veriler anlamlı olarak kabul edildi. Analizler “GraphPad Prism 6” yazılımında yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 ÜREME GRAFİĞİNİN ÇIKARILMASI

Çalışmada kullanılan *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarının üreme grafiği çıkarıldı. Her 2 saatte bir 34 saat boyunca OD₆₀₀ değerleri ölçülünerek, zamana bağlı hücre sayısı değişimini gösteren grafik çizildi (Şekil 4.1). Buna göre, logaritmik fazın ortası parental ırkta 15.saat, *sdj1Δ* ırkında da 17. saat olarak belirlendi. Ayrıca, *S. pombe* parental ırkında jenerasyon sayı 3.523, jenerasyon süresinin 2.84 saat iken *sdj1Δ* ırkının jenerasyon sayısı 3.748 ile jenerasyon süresi 3.74 saat olarak Bölüm 3.3'te anlatıldığı gibi hesaplandı.



Şekil 4.1: Parental ve *sdj1 Δ* ırklarının zamana bağlı üreme grafiği. Hücre sayısı / saat.

Parental

$$N_1 : 3333333 \quad N_2 : 38370672$$

$$\text{Jenerasyon sayısı (n)} : \frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2} = 3.523$$

$$T_1 : 8 \quad T_2 : 18$$

$$\text{Jenerasyon süresi (S}_t\text{)} : \frac{18-8}{3.523} = 2.84 \text{ saat}$$

sdj1Δ

$N_1 : 3000050 \quad N_2 : 40478615$

Jenerasyon sayısı (n) : $\frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2} = 3.748$

$T_1 : 10 \quad T_2 : 24$

Jenerasyon süresi (S_t) : $\frac{24-10}{3.748} = 3.74$ saat

4.2. TUNİKAMİSİNİN *S. pombe* IRKLARININ CANLILIĞINA ETKİSİ

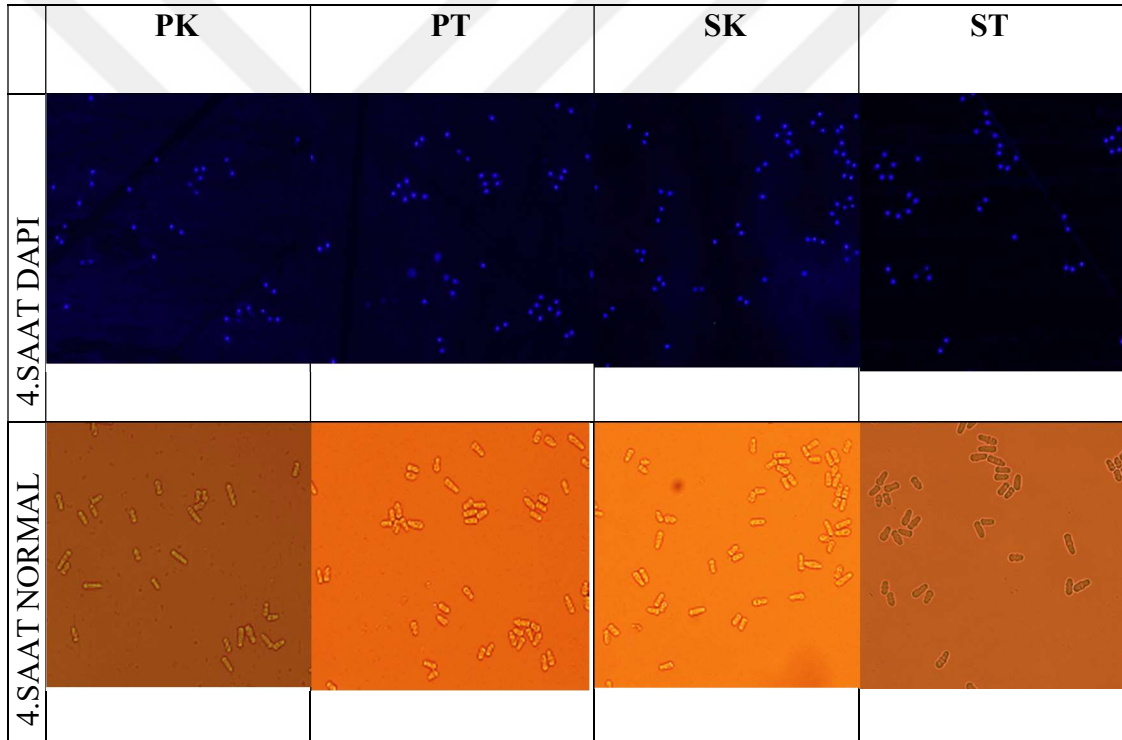
Endoplazmik Retikulum stresini indüklemek amacıyla kullanılan tunikamisin *S. pombe* yabancı tip hücrelerindeki %50 öldürücü dozu, daha önce çalışma grubumuz tarafından belirlenmiştir (Özarabacı, 2019). Bu çalışmada, *S. pombe* hücrelerini 1 saatte %30 öldüren doz olan 1µg/mL tunikamisin kullanılarak, deney (tunikamisin uygulanan parental, PT ve tunikamisin uygulanan *sdj1Δ*, ST) ve kontrol (tunikamisin uygulanmayan parental, PK ve tunikamisin uygulanmayan *sdj1Δ*, SK) gruplarından 1., 4. ve 24. saatlerde alınan örneklerin seri sulandırımından sonra yapılan spot ekim analizi sonuçları Şekil 4.2’de gösterildi. Buna göre, *S. pombe sdj1Δ* ırkının 1 saatlik tunikamisin uygulamasına dirençli iken, 4 ve 24 saatlik uygulamalara karşı duyarlı oldukları belirlendi. Ancak, *S. pombe* parental ırkının tunikamisin uygulamasına karşı 1 saatte dirençli, 4 ve 24 saatlerde orta düzey duyarlılığı tespit edildi.

IRKLAR	ZAMAN	GRUP	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>sdj1Δ</i>	1.SAAT	K						
		D						
	4. SAAT	K						
		D						
	24. SAAT	K						
		D						
Parental	1.SAAT	K						
		D						
	4.SAAT	K						
		D						
	24.SAAT	K						
		D						

Şekil 4.2: Parental ve *sdj1Δ* ırklarına tunikamisin uygulandıktan sonraki 1., 4. ve 24. saate ait spot ekim görüntüleri (K: kontrol grubu, D: deney grubu).

4.3. TUNİKAMİSİNİN *S. pombe* IRKLARININ HÜCRE MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

S. pombe parental ve *sdj1Δ* ırklarında 1 saatlik 1μg/mL tunikamisin uygulamasının kontrol gruplarına göre hücre canlılığı üzerine etki etmemesi, 4 ve 24 saatlik uygulamaların etki etmesi nedeniyle, tunikamisinin hücre morfolojisi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada 1μg/mL tunikamisin, 4 saat uygulandı. Alınan örnekler DAPI boyama yapıldıktan sonra, floresan mikroskopta analiz edildi. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi tunikamisinin gerek *S. pombe* parental, gerekse *S. pombe sdj1Δ* ırklarının hücre morfolojileri üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlendi.

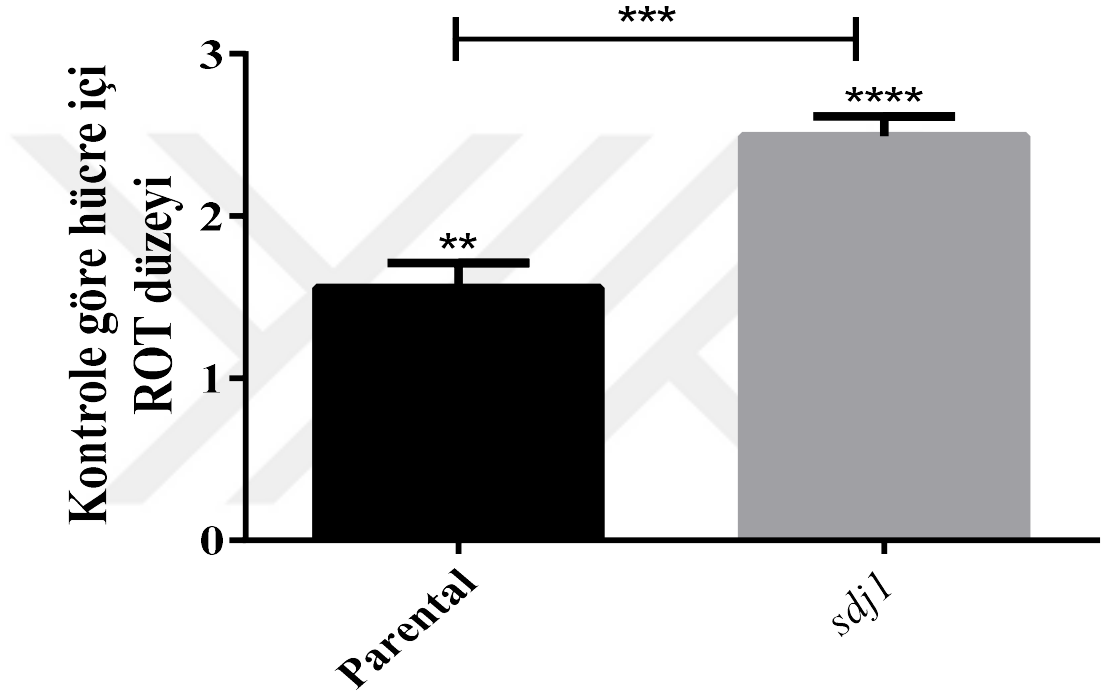


Şekil 4.3: Tunikamisinin *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarının hücre morfolojisi üzerine etkisi (PK: parental kontrol, PT: parental tunikamisin, SK: *sdj1Δ* kontrol, ST: *sdj1Δ* tunikamisin).

4.4. TUNİKAMİSİNİN *S. pombe* IRKLARINDA HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNE ETKİSİ

Hücre canlılığı analizinde 1μg/mL tunikamisinin 4 ve 24 saat uygulanmasında, *S. pombe* parental ve *S. pombe sdj1Δ* ırklarının duyarlı olmalarının altında yatan nedeninin ROT kaynaklı

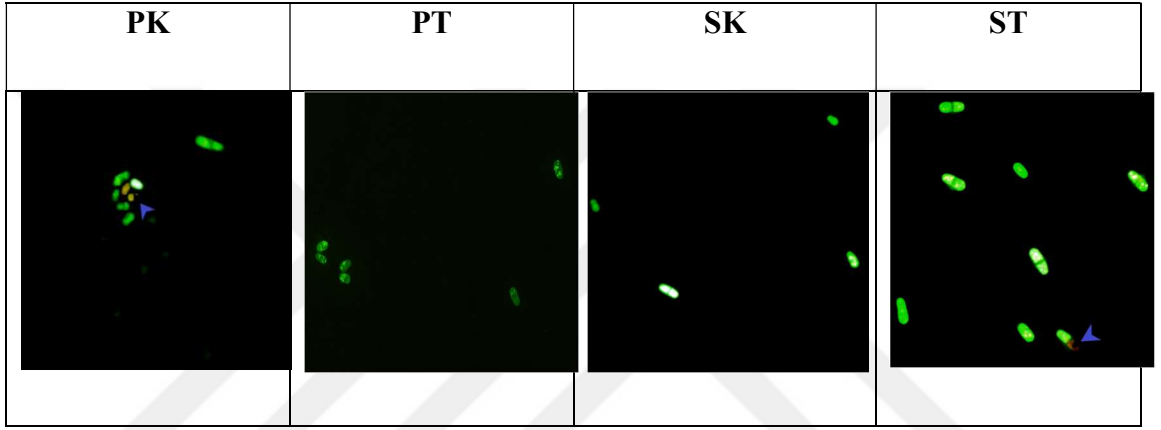
olup olmadığı, hücre içi oksidasyon düzeyi analizi ile araştırıldı. Bu amaçla *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarının deney gruplarına 1µg/mL tunikamisin, 4 saat uygulandıktan sonra bölüm 3. 6’da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen analiz sonuçları Şekil 4.4’de verildi. *S. pombe* parental ırkta hücre içi oksidasyon düzeyi kontrole göre 1.5 kat artarken, *S. pombe sdj1Δ* ırkının 2.5 kat artmıştır. Bu artışlar istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca, parental ırkla *sdj1Δ* ırkı arasında da anlamlı bir fark tespit edilmiştir.



Şekil 4.4: Tunikamisin uygulanan *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarında kontrollerine göre artan ROT düzeyleri (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

4.5. *S. pombe* IRKLARININDA TUNİKAMİSİNİN APOPTOZA ETKİSİ

Artan hücre içi ROT seviyeleri ve *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarının tunikamisine duyarlılıkları ile apoptoz arasında bir ilişkinin olup olmadığı, Bölüm 3.7’ de anlatıldığı şekilde incelendi. Buna göre, ne *S. pombe* parental ırkında nede *S. pombe sdj1Δ* ırkında tunikamisine bağlı artan bir apoptoz düzeyi belirlenmedi. Sadece *S. pombe* parental ırkın kontrolünde bir alanda ve *S. pombe sdj1* mutantında da bir alanda birer hücre apoptozlu olarak belirlendi (Şekil 4.5). Normal hücreler yeşil renk, apoptozlu hücreler turuncu renk floresan vermektedirler.



Şekil 4.5: Tunikamisin uygulanan ve uygulanmayan *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarında apoptoz düzeyinin floresan mikroskopu görüntüleri (PK: parental kontrol, PT: parental tunikamisin, SK: *sdj1 Δ* kontrol, ST: *sdj1 Δ* tunikamisin).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Parkinson hastalığı Alzheimer hastalığı (AD)'ndan sonra sık rastlanan ikinci kronik nörodejeneratif hastalıktır. Yıllık ortalama görülme oranı 8 ~ 18 / 100.000 kişi. 2030 yılına kadar, Parkinson hastalığının görülme sıklığının yukardakinin iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir. PD görülme sıklığı, 50 yaşın altındaki kişilerde düşüktür ve 60 yaşından sonra belirgin şekilde artar (Zhang ve diğ., 2018).

PD'nin ana sebebi, substantia nigradaki dopamin üreten nöronların yavaş yavaş kaybıdır ve bu kaybın mitokondri fonksiyonunun bozukluğu, oksidatif stres, hücre içi Ca^{+2} dengesinin bozulması, nöroenflamasyon gibi nedenlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Qu, 2014).

Parkinson hastalığı proteini DJ-1'in dikarbonil bileşiklerinin detoksifikasyonu, otofaji ve oksidatif stres yanıtı dahil olmak üzere çeşitli hücrel işlevlerde rol oynadığı bilinmektedir. DJ-1 ortologları, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın olarak bulunur (Su ve diğ., 2015).

Schizosaccharomyces pombe'de, DJ-1 ortoloğu olduğu belirlenmiş altı adet gen (*hsp3101* - *hsp3105* ve *sdjl*) bulunmaktadır. *S. pombe*'de DJ-1 ortologlarının her birinin delesyona uğraması, durağan fazda hayatta kalma oranının düşmesine yol açtığı rapor edilmiştir. *S. cerevisiae* DJ-1 ortologlarının aksine, *S. pombe*'deki DJ-1 ortologlarının özellikleri oldukça farklıdır. Bu genler arasında, sadece *sdjl*, insan DJ-1 ile önemli derecede bir sekans homolojisi sergilerken, Hsp3101-Hsp3105, *E. coli* ve *S. cerevisiae* Hsp31 proteinlerine benzer bir sekans homolojisi sergilemiştir (Su ve diğ., 2015).

Son yıllarda, birçok çalışma ER stresinin PD patogenezinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Cooper ve diğ., 2006; Thayanidhi ve diğ., 2010), ancak etki mekanizması tam olarak belirlenememiştir. PD'de ER stresi üzerine yapılan çalışmaların, hastalığın genetik ve moleküler düzeyde nedenini ve PD tedavisi için yeni fikirler doğurmasını hedeflemiştir.

Bu kapsamda, Tunikamisin ile tetiklenen ER stresinin hücre içi ROT artışına yol açtığı ve bunun da katlanmamış protein (UPR) yanıtını indüklediği bilinmektedir (Özarabacı, 2019). Sunulan bu çalışmada, PD'e neden olan genlerden DJ-1 ortoloğu olan *S. pombe sdjl* geninin ER stresi bağlantılı hücrel yanıtlardaki etkisi biyokimyasal düzeyde araştırıldı.

Bu amaçla, öncelikle, optimal koşullar altında üretilen *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarında, jenerasyon süreleri 2.84 ve 3.74 saat hesaplanarak *sdj1* mutantının üreme durumu tanımlandı. Daha sonra ER stresinin *sdj1Δ* ırkındaki etkilerinin, parental ırkla karşılaştırmalı olarak, araştırılmasına geçilmiştir. Logaritmik fazın ortasında 1 saat süreyle uygulanan tunikamisine (1 µg/µL) karşı her iki ırkında dirençli olmasına karşın, uygulama süresinin uzatılması (4 ve 24 saat) durumunda, *S. pombe sdj1Δ* ırkının parental ırka göre daha duyarlı olduğu tespit edildi (Şekil 4.2). Bu nedenle, çalışmaya 4 saatlik tunikamisin uygulaması ile devam edildi. ER stresinin *S. pombe* parental ve *sdj1Δ* ırklarının hücre morfolojilerinde bir fark oluşturmadığı (Şekil 4.3), ancak hücre içi oksidasyon düzeylerinin kontrole göre, *S. pombe* parental ırkta 1.5 kat, *S. pombe sdj1Δ* ırkında ise 2.5 kat arttığı tespit edildi (Şekil 4.4). *S. pombe sdj1Δ* ırkında parental ırka göre tespit edilmiş daha yüksek hücre içi oksidasyon düzeyi, bu ırkın parentale göre tunikamisine karşı neden daha duyarlı olduğunu açıklayabilir.

ER’de katlanmamış proteinlerin veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER’nin işlevselliği ve bütünlüğünü bozarak UPR’yi devreye soktuğu (Yoshida, 2007) ve akabinde apoptozu tetiklediği bilinmektedir (Li ve diğ., 2017). *S. pombe sdj1Δ* ırkının tunikamisine karşı parental ırka göre daha duyarlı olmasının, apoptoz süreci ile bağlantılı olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.5). Bu durumun ya uygulanan tunikamisin dozunun (%30 öldürücü, 4 saat, ılımlı stres) yeterli olmamasından ya da UPR’nin apoptoz ile değil otofaji ve ya başka bir hücresel süreç ile devam ettiğinden kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. Çünkü, ER stresinin otofajiyi de tetiklediğini rapor eden yayınlar bulunmaktadır (Gozuacik ve Kimchi, 2004; Ding ve Yin, 2008).

Sonuç olarak, *S. pombe sdj1* geninin bulunmadığı hücrelerde (*sdj1Δ*), tunikamisin duyarlılığı ve yüksek hücre içi ROT seviyesi, tunikamisin kaynaklı ER stresi ile *sdj1* geni bağlantısı olduğunu, ancak, tunikamisin bağlantılı bir apoptozun oluşmadığını düşündürmektedir. Bu durumda, literatürde de belirtilen ER stresi ile PD arasında bir bağlantının olabileceği bu çalışma ile de desteklenmiştir. Ancak, ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Apaydın, H., Özekmekçi, S., Oğuz, S., Zileli, İ., 2013, Parkinson hastalığı hasta ve yakınları için el kitabı, Gözden geçirilmiş 5.baskı, Bayçınar Tıbbi Yayıncılık, İstanbul.
- Bandyopadhyay, S., Cookson M.R., 2004, Evolutionary and functional relationships within the DJ-1 superfamily, *BMC Evolutionary Biology*, 4(6), 1471-2148.
- Bonifati, V., Rizzu, P., Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., 2003, Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, *Science*, 299(5604), 256-259.
- Bush, D.A., Horisberger, M., Horman, I., Wursch, P., 1974, The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of General Microbiology*, 81(1), 199–206.
- Byrne, S.M. and Hoffman, C.S., 1993, Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of cell science*, 105(4), 1095-1100.
- Cox, J. S., Shamu, C. E., Walter, P., 1993, Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase, *Cell*, 73(6), 1197–1206
- Dibdiakova., Saksonova., Pilchova., Klacanova., Tatarkova., Racay., 2019, Both thapsigargin- and tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress increases expression of Hrd1 in IRE1-dependent fashion, *Neurological Research*, 41(2):177-188.
- Egel, R., 2004, The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*, Springer, ISBN 978-3642056314.
- Forsburg, S., Rhind, N., 2006, Basic methods for fission yeast, *Yeast*, 23, 173-183.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, Handbook of Genetics, Vol. 1., New York and London, 395-446.
- Herrero, M.T., Pagonabarraga, J., Linazasoro, G., 2011, Neuroprotective role of dopamineagonists: evidence from animal models and clinical studies, *Neurologist*, 17, 54-66.
- Hetz C., 2012, The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2): 89-102.
- Hoffman, C.S., Wood, V., Fantes, P.A., 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System, *Genetics*, 201, 403-423.
- Huang, C.X., Zhang, H.N., 2017, A Meta-analysis of DJ-1 gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease, *International Journal of Neurology and Neurosurgery*, 44(5), 512-517.

- Huang, L., 2015, *Schizosaccharomyces pombe* Homologs of Human DJ-1 Are Stationary Phase-Associated Proteins That Are Involved in Autophagy and Oxidative Stress Resistance, *Chinese Journal of Gerontology*, 18(10), 2716-2719.
- Kincaid, M.M., Cooper, A.A., ERADicate ER stress or die trying, 2007, *Antioxidants & Redox Signaling*, 9:2373-2387.
- Li, L., Li, H.H., Jia, Y.N., Bao, B., 2017, Research progress of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Genomics and Applied Biology*, 36(2), 523-530.
- Liang, Z.G., Luo, D.Z., Wang, X.M., 2018, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease, *Chinese Journal of Gerontology*, 38(11), 2809-2812.
- Licker, V.K., Kövari, E., Hochstrasser, D.F., Burkhard, P.R., 2009, Proteomics in human Parkinson's disease research, *Journal of Proteomics*, 73(1): 10-29.
- Liu, S.Y., Chen, P., 2016, Epidemiology of Parkinson's disease, *Chinese Journal of Modern Neurology*, 16(2), 98-101.
- Liu, W.H., Zhao, G.F., 2018, Research progress of miRNA-induced autophagy in Parkinson's disease, *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 27(27), 3071-3074.
- Lucas JI., Marin I., 2007, A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1, *Molecular Biology and Evolution*, 24(2), 551-561.
- Ma, C.L., Su, L., Xie, J.J., Long, J.X., Wu, P., Gu, L., 2014 The prevalence and incidence of Parkinson's disease in China: a systematic review and meta-analysis, *J Neural Transm*, 121:123-134.
- McLaughlin, M., Vandenbroeck, K., 2011, The endoplasmic reticulum protein folding factory and its chaperones: new targets for drug discovery? *Br J Pharmacol*, 162(2): 328–345.
- Moreno, S., Klar, A., Nurse, P., 1991, Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in Enzymology*, 194, 795-823.
- Mukaiyama, H., Kajiwar, S., Hosomi, A., GigaHama, Y., Tanaka, N., Nakamura, T., Takegawa, K., 2009, Autophagydeficient *Schizosaccharomyces pombe* mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation, *Microbiology*, 155: 3816–3826.
- Özarabacı, İ., 2019, *Schizosaccharomyces pombe*'de Endoplazmik Retikulum Stresi İle Apoptoz Arasındaki İlişki, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Palabıyık, B., Ghods, F.J., Önay Uçar, E., 2013, The effects of glucose sensing/signaling on oxidative stress response in glucose repression mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics and Molecular Research*, 12 (4), 5046-5056.
- Przedborski, S., The two-century journey of Parkinson disease research, 2017, *Nat Rev Neurosci*, 18(4):251-259. doi: 10.1038/nrn.2017.25.

- Ren, B.Y., Wang, Y.J., Wang, H., Wu, Y.Y., Li, J.Y., Tian, J., 2018, Comparative proteomics reveals the neurotoxicity mechanism of ER stressors tunicamycin and dithiothreitol, *Neurotoxicology*, 5(1), 26-34.
- Richard Y., Zhao, C., 1995, *Schizosaccharomyces pombe*: A Model for Molecular Studies of Eukaryotic Genes, *Article in DNA and Cell Biology*, 14(5), 359-371.
- Robinow, C.F., 1977, The number of chromosomes in *S. pombe*: light microscopy of stained preparations. *Genetics*, 87(3), 491-497.
- Seydel, G.Ş., Aksoy, K., 2012, Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 21(4):221-235.
- Shen, E.D., Weng, J., Wen, F., Xiao, J., Luo, P., Xie, W.Q., Su, Y.Q., Huang, H.Y., 2019, Effect of tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress on autophagy and apoptosis of human esophageal cancer cells and its association with oxaliplatin The relationship between chemotherapy resistance, *Cancer Pharmacy*, 9(1), 26-34.
- Su, Y., 2016, Functional study of DJ-1 homologous protein of *Schizosaccharomyces pombe* and mechanism of cell flocculation and apoptosis induced by PPR protein deletion, Doktora Tezi, Nanjing Normal University.
- Su, Y., Chen, C., Huang, L., Yan, J., Huang, Y., 2015, *Schizosaccharomyces pombe* Homologs of Human DJ-1 Are Stationary Phase-Associated Proteins That Are Involved in Autophagy and Oxidative Stress Resistance, *Plos One*, 10(12): e0143888. doi:10.1371.
- Tatar, M., Tatar, T., 2018, Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar, *Osmangazi Tıp Dergisi*, doi: 10.20515/otd.417682.
- Terzioglu M., Galter D., 2008, Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models, *The Febs Journal*, 275: 1384-1391.
- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sanso, M. and Hidalgo, E., 2006, Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways, *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 495-502.
- Walker, G.M., 1998, Yeast physiology and biotechnology, *J. Wiley & Sons, Chichester*, New York.
- Wang, G., Cui, H.L., 2019, Current status and progress of clinical diagnosis and treatment of Parkinson's disease, *Journal of Chongqing Medical University*, 44(04), 464-467.
- Wang, G., Cui, H.L., Liu, J., Ding, J.Q., Xiao, Q., Ma, J.F., Chen, S.D., 2018, Research progress in the pathogenesis, diagnosis and treatment of Parkinson's disease, *Chinese Journal of Modern Neurology*, 18(1), 19-24.
- Wei, Y., Ringe, D., Wilson, M.A., Ondrechen, M.U., 2007, Identification of functional subclasses in the DJ-1 super- family proteins, *PLOS Computational Biology*, 3(1):e10.

- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., et al., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415(6874), 871-880.
- Xu J. Z., Lu, M., 2019, Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy and Their Interactions Affect Endothelial Cell Apoptosis, *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(3), 240-250.
- Yanagida, M., 2002, The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*, *Genome Biology*, 3(3), 248-251.
- Yin, S., Zhou, J.W., 2019, Advance in the basic research on Parkinson's disease, *Journal of Chongqing Medical University*, 44(04):468-472.
- Yoshida, H., 2007, ER stress and diseases, *FEBS Journal*, 274(3): 630-658.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001, XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor, *Cell*, 107(7): 881-891.
- Zhang, K., Kaufman, R.J., 2004, Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum, *Journal of Biological Chemistry*, 279(25): 25935-25938.
- Zhao, Z.H., Wang, X.S., Wei, Z., He, Y.C., Cheng, Q., Wang, Y.Z., 2018, Study on the level of plasma oxidative stress biomarkers in patients with Parkinson's disease, *Chinese General Practice*, 21(22), 2720-2723.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	TUERXUN RESHALAITI
Doğum Yeri	XINJIANG, ÇİN
Doğum Tarihi	12.03.1987
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:
Telefon	0555 895 53 89
E-Posta Adresi	risalet030150@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Suzhou Teknoloji Üniversitesi
Fakülte	Biyoloji ve Kimya Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	30.06.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı