

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***IN VITRO* PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE HSP27 İNHİBİTÖRÜ J2
MOLEKÜLÜNÜN FERROPTOZİS İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Nihan GÜNAY

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fidan ERDEN KARAOĞLAN

TEZ JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN

Doç. Dr. Betül ÇİÇEK

Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

DOKTORA TEZİ

ERZİNCAN, 2025

© 2025 [Nihan GÜNAY]. Tüm hakları saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Doç. Dr. Mehmet KUZUCU ve Dr. Öğr. Üyesi Fidan ERDEN KARAOĞLAN danışmanlığında, Nihan GÜNAY tarafından hazırlanan bu çalışma 03.03.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul oybirliği (5/5) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat ÇANKAYA İmza:
Üye : Doç. Dr. Mehmet KUZUCU İmza:
Üye : Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN İmza:
Üye : Doç. Dr. Betül ÇİÇEK İmza:
Üye : Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun / / 20.... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR

Enstitü Müdür V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“*In Vitro* Parkinson Hastalığı Modelinde HSP27 İnhibitörü J2 Molekülünün Ferroptosis ile İlişkinin İncelenmesi” isimli “Doktora” tezime tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 03/03/2025

(İmza)

Nihan GÜNAY

ÖZET

IN VITRO PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE HSP27 İNHİBİTÖRÜ J2 MOLEKÜLÜNÜN FERROPTOZİS İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Nihan GÜNAY

Doktora Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fidan ERDEN KARAOĞLAN

2025, 82 sayfa

Isı şok proteini 27 (HSP27), hücrel stres koşullarında ekspresyon seviyesi artan bir şaperon proteindir. Parkinson hastalığı (PH), dopaminerjik nöron kaybı ve HSP'lerin azalan aktivitesine paralel olarak α -sinüklein protein agregatlarının birikimi ile karakterize edilen bir nörodejeneratif hastalıktır. Ferroptozis, PH ile ilişkisi ortaya konmuş, demir birikimi ve lipid peroksidasyonu sonucu tetiklenen hücre ölümü yolağıdır.

Çalışmada, çeşitli kanser türlerinde kullanımı araştırılan HSP27 inhibitörü J2 molekülünün, rotenon ile oluşturulan *in vitro* PH modeli üzerindeki ferroptotik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. SH-SY5Y hücre hattı ve bu hücre hattından rotenon ile oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde, J2 molekülünün farklı konsantrasyonları uygulanmış ve hücre canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. Apoptotik ve pro-apoptotik protein/mRNA seviyeleri ile hücrelerin apoptotik süreçleri incelenmiştir. HSP27'nin translasyonel ve post-translasyonel seviyede (Western blot ve lüsiferaz agregasyon deneyi ile) analizi yapılmıştır. Ayrıca, hücre gruplarında Fe^2/Fe^3 oranı, antioksidan-oksidan dengesi, malondialdehit ve GPx4 seviyeleri belirlenerek ferroptotik etki değerlendirilmiştir. J2'nin HSP27'yi inhibe etmesiyle hücre gruplarında oluşturduğu stresin hücrel sağkalımı olumsuz etkilediği, hem apoptotik hem de ferroptotik yolları aktive ettiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HSP27, J2 molekülü, Parkinson hastalığı, SH-SY5Y

ABSTRACT

EXPLORING THE RELATIONSHIP BETWEEN CERTAIN HEAT SHOCK PROTEIN ISOFORMS AND THE FERROPTOSIS PATHWAY IN PARKINSON'S DISEASE

Nihan GÜNAY

PhD Thesis, Erzincan Binali Yıldırım University, Institute of Science and Technology,

Department of Biology

Advisor: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

Co- Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Fidan ERDEN KARAOĞLAN

2025, 82 pages

Heat shock protein 27 (HSP27) is a chaperone protein whose expression level increases under cellular stress conditions. Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by dopaminergic neuron loss and the accumulation of α -synuclein protein aggregates, which parallel the decreased activity of heat shock proteins (HSPs). Ferroptosis is a cell death pathway triggered by iron accumulation and lipid peroxidation, and its association with PD has been established.

In this study, the ferroptotic and apoptotic effects of the HSP27 inhibitor J2 molecule, which has been investigated for its use in various cancer types, were examined in an in vitro PD model induced by rotenone. Different concentrations of the J2 molecule were applied to the SH-SY5Y cell line and a rotenone-induced PD model derived from this cell line, and cell viability percentages were determined. Apoptotic and pro-apoptotic protein/mRNA levels were analyzed to investigate apoptotic processes. The translational and post-translational levels of HSP27 were examined using Western-blot analysis and a luciferase aggregation assay. Furthermore, ferroptotic effects were assessed by determining the Fe^2/Fe^3 ratio, antioxidant-oxidant balance, malondialdehyde levels, and GPx4 levels in the cell groups. It was determined that J2-mediated inhibition of HSP27 negatively affected cellular survival and activated both apoptotic and ferroptotic pathways.

Keywords: HSP27, J2 molecule, Parkinson disease, SH-SY5Y

TEŞEKKÜR

Yüksek öğrenim sürecimde değerli bilgilerini benimle paylaşan, beni yönlendiren ve araştırmamı daha iyi bir noktaya taşımamda katkısı olan danışmanım Doç. Dr. Mehmet KUZUCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel bilgi birikiminizi, anlayışınızı ve desteğinizi cömertçe paylaştığınız için teşekkür ederim. Ve ayrıca eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fidan ERDEN KARAOĞLAN başta olmak üzere Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN ve Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR, Doç. Dr. Betül ÇİÇEK, Dr. Ahmet ÇETİN'e desteklerini, bilgi birikimlerini her daim esirgemeyen ve sonsuz katkıları olan saygıdeğer hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında desteklerini benden esirgemeyen Dr. Seda KILINÇ ve laboratuvar ekibime teşekkür ediyorum.

Ve elbette bu sürecin her anında yanımda olan aileme; babam Yaşar FARUK GÜNAY, annem Nermin GÜNAY ve sevgili kardeşlerim Edanur GÜNAY ve Kerimcan GÜNAY'a sevgim ve minnettarlığım sonsuz. Verdiğiniz destek, sabır ve dualarınız bu yolculuğumu kolaylaştırdı. Hayatımı kolaylaştırdığınız için sizlere müteşekkirim.

Son olarak, beni her zaman motive eden, cesaretlendiren ve bu zorlu süreçte enerjimi yüksek tutmamı sağlayan dostlarım ve sevdiklerime teşekkür ediyorum. Her zorluğun içinde bir armağan olduğuna inanarak attığım adımlar öğrenmenin sınırsız doğasıyla tanıştırdı beni. En anlamlı teşekkür kendime ve hayallerime...

Nihan GÜNAY

Mart, 2025

İçindekiler

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	10
1.1. Araştırmanın Amacı	10
1.2. Araştırmanın Önemi	10
1.3. Varsayımlar	11
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	12
2.1. Parkinson Hastalığı.....	12
2.2. Isı Şok Proteinleri	16
2.2.1. HSP27 ve Parkinson hastalığındaki yeri	17
2.3. Ferroptozis	19
2.4. HSP27 İnhibitörü J2 Molekülü.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Plazmid.....	23
3.1.2. Mikroorganizma Suşları ve Besiyerleri.....	24
3.1.3. Plazmid Transformasyonu ve Restiriksiyon Enzimleri.....	24
3.1.4. Hücre Hatları ve J2 molekülü.....	24
3.1.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.1.5.1. Çözeltiler ve tamponlar için kullanılan kimyasal maddeler	24
3.1.5.2. Hücre kültürü deneylerinde ve biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddeler	25
3.1.6. Yararlanılan alet ve cihazlar	25
3.1.7. Kullanılan kimyasal çözeltiler	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Hücre Kültürü Deneyleri ve Biyokimyasal Analizler	28
3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları.....	28
3.2.1.2. Hücre kültürünün pasajlanması	28

3.2.1.3. Hücre kültürünün stoklanması.....	29
3.2.1.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi	29
3.2.1.5. Hücre sayımı.....	29
3.2.1.6. Sitotoksosite çalışmaları.....	30
3.2.1.7. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	32
3.2.1.8. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi.....	34
3.2.1.9. Protein ifade düzeylerinin belirlenmesi.....	35
3.2.1.10. Western-blot analizi.....	36
3.2.1.11. Total antioksidan ve oksidan seviyeleri.....	37
3.2.1.12. Malondialdehit tayini.....	39
3.2.1.13. Demir seviyelerinin ölçümü	40
3.2.1.14. GPx4 aktivite tayini	41
3.2.1.15. Plazmid Transformasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
3.2.1.16. HSP27 plazmitinin dondurularak stoklanması	42
3.2.1.17. HSP27'nin üretimi ve saflaştırılması.....	43
3.2.1.18. Lüsiferaz konformasyonel değişim tayini	44
3.2.1.19. İstatistiksel hesaplamalar	45
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. MTT Canlılık Testi.....	46
4.2. Apoptotik Gen ve Protein Düzeylerinin RT-qPCR ve ELISA ile Belirlenmesi.....	48
4.3. HSP27 Seviyelerinin Western-blot ile Belirlenmesi	51
4.4. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS).....	52
4.5. MDA Tayini	54
4.6. Demir Seviyelerinin Ölçümü.....	55
4.7. GPx4'ün Gen ve Spesifik Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi.....	56
4.8. Rekombinant HSP27'nin Üretimi ve Saflaştırılması	57
4.9. Lüsiferaz Aktivite Tayini.....	59
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	60

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deney seti kodları.....	33
Tablo 2. Primer sekansları.....	36
Tablo 3. RT-qPCR sıcaklık siklusu.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Normal nigrostriatal yolun şematik gösterimi ve Parkinson hastalığında belirgin dejenerasyon	15
Şekil 2.1. HSP27/HSPB1 protein yapısı	20
Şekil 3.1. pET-22b(+) 'de HSP27 ekspresyon vektörünün şematik gösterimi	24
Şekil 3.2. SH-SY5Y hücre hattı ve rotenon ile indüklenen Parkinson modellenmesi	32
Şekil 3.3. Hücre kültürü çalışmaları	38
Şekil 3.4. Western-blot protein transferi.....	39
Şekil 3. 5. Ekim işlemi sonrası OD ₆₀₀ ölçümü.....	45
Şekil 4.1. J2 molekülünün deney grupları üzerindeki 12. saat MTT canlılık testi sonuçları...	49
Şekil 4.2. J2 molekülünün deney grupları üzerindeki 24. saat MTT canlılık testi sonuçları...	50
Şekil 4.3. J2 molekülünün deney grupları üzerindeki 48. saat MTT canlılık testi.....	51
Şekil 4.4. Deney gruplarının BAX protein seviyeleri	53
Şekil 4.5. Deney gruplarının BCL-2 protein seviyeleri	54
Şekil 4.6. Deney gruplarının CASP3 protein seviyeleri	55
Şekil 4.7. Deney gruplarında HSP27'nin Western-blot analizi	56
Şekil 4.8. Deney gruplarında ki toplam antioksidan seviyeleri	57
Şekil 4.9. Deney gruplarında ki toplam oksidan seviyeleri	58
Şekil 4.10. Deney gruplarında belirlenen MDA miktarları	59
Şekil 4.11. Deney gruplarında belirlenen demir miktarları	60
Şekil 4.12. Deney gruplarında belirlenen GPx4'ün gen ve spesifik aktivite düzeyleri	61
Şekil 4.13. Ampisilin içeren LB agar besiyerinde <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücrelerinin gelişimi.	62
Şekil 4.14. HSP27'nin saflaştırma adımlarının SDS-PAGE analizi	62
Şekil 4.15. Rekombinant olarak üretilen HSP27'nin SDS-PAGE ve Western-blot görüntüleri	63

Şekil 4.16. Deney gruplarında lüsiferaz aktivite tayini.....	64
Şekil 5.1. J2 molekülünün apoptoz ve ferroptozis üzerindeki etkileri.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>C</i>	Celcius
<i>dk</i>	Dakika
<i>kDa</i>	Kilo Dalton
<i>m</i>	Mili (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
<i>OD</i>	Optik Density
<i>pH</i>	H ⁺ iyon konsantrasyonunun eksi logaritması
<i>sn</i>	Saniye
<i>T_m</i>	Erime sıcaklığı
<i>V</i>	Volt
<i>%</i>	Yüzde
<i>A.B.D.</i>	Amerika Birleşik Devletleri
<i>cDNA</i>	Complementer Deoksiribonükleik Asit
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<i>FBS</i>	Fetal Bovine Serum
<i>DMSO</i>	Dimetil Sülfoksit
<i>DNA</i>	Deoksiribonükleik Asit
<i>NCBI</i>	National Center Of Biotechnology Information
<i>PAGE</i>	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<i>PCR</i>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>RT-qPCR</i>	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>RNA</i>	Ribonükleik Asit

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Amacı

Nörodejeneratif bozukluklar arasında en yaygın ikinci hastalık olan Parkinson hastalığı beyindeki dopamin üreten nöronların kaybı ile karakterize edilir. Yapılan son çalışmalarda, Parkinson hastalığında programlanmış hücre ölümü mekanizmalarından biri olan ferroptozisin de rol oynadığı gösterilmektedir (Wen vd., 2020). Bu araştırmanın amacı, kemoterapötik bir ajan olarak da kullanılan HSP27 inhibitörü J2 molekülünün, SH-SY5Y hücre hattı ve bu hücre hattından rotenon ile oluşturulan Parkinson hastalığı modeli üzerinde farklı dozlarda kullanılması sonucunda hücre de meydana gelebilecek ferroptozis durumunun değerlendirilmesidir. Özellikle, J2 molekülünün ferroptozis biyobelirteçleri ve lipid peroksidasyonu gibi parametreler üzerindeki etkileri kısmen ortaya konulmuştur. Bu değerlendirme sonucunda, HSP27 inhibitörlerinin Parkinson hastalığına eşlik eden çeşitli kanser türlerinin tedavisindeki kullanımı için öncül bir değerlendirme yapılmıştır.

1.2. Araştırmanın Önemi

Kanser hastalığında HSP27'nin aşırı ekspresyonunun, hücreleri apoptozdan koruduğu ve tedaviye direnç geliştirebileceği bilinmektedir (Choi vd., 2019). HSP27 inhibitörü olan bilinen J2 molekülü, kanser hastalığı tedavisinde kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye karşı direncini azaltmayı hedefleyen klinik çalışmaları devam eden bir inhibitördür (Karademir ve Özgür, 2023). Kanser hastalığında umut vadeden sonuçlar doğurmuş olsa da HSP27'nin inhibisyonunun, nörodejeneratif hastalıklar için risk teşkil edebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışma Parkinson hastalığında HSP27'nin bilinen rolüne ek olarak J2 molekülünün, Parkinson hastalığı modellemesi üzerindeki etkilerine dair yeni bilgiler sunmayı hedeflemektedir. Ayrıca Parkinson hastalığında ferroptozis mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisine dair yeni bakış açıları geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

1.3. Varsayımlar

- HSP27 inhibitörü J2 molekülü, SH-SY5Y hücre hattında ve Parkinson modeli oluşturulmuş hücrelerde ferroptosis biyobelirteçlerinde belirgin değişikliklere neden olur.
- J2 molekölünün farklı konsantrasyonları; hücre canlılık yüzdeleri, BAX, BCL-2, CASP3 ve GPx4 protein ekspresyon değerleri, lipid peroksidasyonu ve demir düzeyleri gibi parametreler üzerinde doza bağlı etkiler gösterir.
- Rotenon ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde J2 molekülü, apoptoz ve ferroptosis üzerindeki etkilerini daha belirgin hale getirir.
- HSP27 ve ferroptosis arasındaki etkileşimin incelenmesi, nörodejeneratif hastalıkların terapötik hedeflerini belirlemek için önemli bir temel oluşturur.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH), beynin arka bölgesinde bulunan Substantia Nigra Pars Compacta (SNPC)'da ki dopaminerjik nöronların kaybı ve farklı beyin bölgelerinde protein kümelerinin (Lewy cisimcikleri) oluşumu ile karakterize edilen; hem motor sistemi hem de motor dışı sistemleri etkileyen, merkezi sinir sisteminin dejeneratif bir bozukluğudur. Parkinson, Alzheimer ve Huntington gibi hastalıklar, belirli bir proteinin hücre içi birikintilerinin oluşumu ile yanlış katlanmaya ve kontrolsüz agregasyona yol açarak doğal olmayan bir konformasyonu benimsemesiyle ortaya çıkmaktadır. Anormal protein katlanması, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptotik mekanizmaların tümü, zararlı moleküller üreterek nörodejenerasyona yol açan olaylar dizisini teşvik edebilen nöroinflamatuvar mekanizmalarla bağlantılı olarak nörodejeneratif hastalıkların nedenleri arasında rapor edilmektedir (Aridon vd., 2011).

Çeşitli stres faktörleri, kimyasallara maruz kalma ya da mutasyon gibi içsel ve dışsal etkenler, protein-protein etkileşimlerini etkileyerek proteinlerin konformasyonunda değişikliklere yol açabilir. Bu tür durumlar, yeni sentezlenen proteinlerin doğru bir şekilde katlanamamasına veya düzgün katlanmış proteinlerin doğal yapılarının bozulmasına neden olabilir. Sonuç olarak, proteinler arasında güçlü bir agregasyon eğilimi gözlenebilir (Stefani, 2004; Tutar vd., 2013; Wang, 2005).

Protein agregatları hücrede belirli bir miktarın üzerinde biriktiğinde toksik etki göstermektedir. Anormal proteinlerin birikmesi, nöronların ölümü de dahil olmak üzere ilerleyici yapı ve/veya işlevi kaybına yol açar (Mori vd., 2006, Nakamura ve Lipton, 2009). Parkinson hastalığı basitçe dopaminerjik hücre ölümü olarak tanımlansa da bu hastalıkların patogenetik mekanizması henüz net olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Nörodejeneratif hastalıklarda protein agregasyonunu etkileyen faktörler arasında; protein yapıları -ki özellikle ikincil yapılar stabilitenin yanı sıra proteinin yanlış katlanmasını da içerir-, mutasyonlar, post-translasyonel modifikasyonlar, birçok nörodejeneratif hastalık için

bir biyobelirteç olan oksidatif stres, protein konsantrasyonu ve pH kritik önem taşımaktadır (Tutar vd., 2013).

Anormal protein birikiminin sebep olduğu Lewy cisimciklerinin biyolojik rolü ve patojenik süreçleri hala belirsizliğini korumaktadır. Lewy cisimcikleri anormal protein agregatlarıdır ve bu agregatları oluşturan proteinler arasında olan α -sinüklein (α -syn) proteinleri, sitoplazma da doğal olarak bulunan katlanmamış proteinlerdir. PH'de çok önemli bir rol oynamaktadır (Ma vd., 2003).

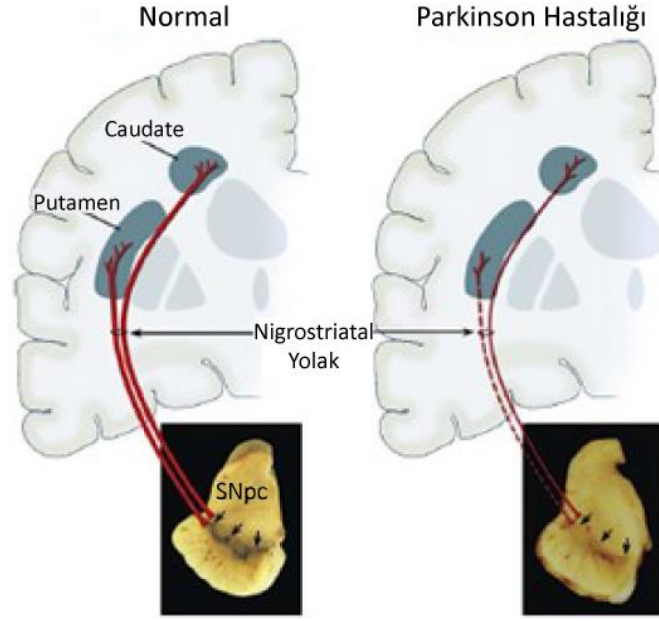
Parkinson hastalığı, en yaygın nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığından sonra ikinci sırada yer alırken; yaş, hastalık için en önemli risk faktörü olup altmış beş yaşın üzerindeki popülasyonun yaklaşık yüzde üçünü etkilemektedir (Lang ve Lozano, 1998). Ayrıca kişinin cinsiyeti de, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklar da dahil olmak üzere tüm önemli karmaşık hastalıkların görülme sıklığını ve/veya doğasını etkileyen bir faktör olarak kabul görmektedir (Gillies vd., 2014).

Yaşlanmanın ardından epidemiyolojik çalışmalar, erkek cinsiyetinin, her yaşta ve incelenen tüm milletlerde Parkinson hastalığının gelişmesinde belirgin bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan geniş bir meta-analiz çalışmasında gösterildiği üzere erkeklerin kadınlardan iki kat daha fazla Parkinson hastası olduğu ortaya konulmaktadır (Elbaz vd., 2002).

Parkinson hastalarının ölüm sonrası beyinlerinde yapılan incelemelerde, SNPC içindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve korpus striatumda ki sinir terminallerinin dejenerasyonu ile ilişkili olan dopamin düzeylerinde azalma bulunduğu rapor edilmiştir (Bernheimer vd., 1973).

Beynin büyük bir kısmı pembemsi gri renkte görünmesine rağmen Substantia Nigra Latince "*siyah madde*" anlamına gelir ve dopaminerjik nöronlardaki yüksek nöromelanin seviyeleri nedeniyle Substantia Nigra bölgesi komşu alanlardan daha koyu görünür, bu nedenle 'siyah madde' olarak da anılmaktadır (Rabey ve Hefti, 1990).

Dopaminerjik nöronlar, koyu nöromelanin pigmentasyonlarına sahip olması sebebiyle ölüm sonrası beyinlerde tanımlanabilir hale gelmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Normal nigrostriatal yolun şematik gösterimi ve Parkinson hastalığında belirgin dejenerasyon (Dauer ve Przedborski, 2003).

Yapılan istatistiksel bir araştırma da dünyada 50 yaşın üzerindeki PH'li bireylerin sayısı 2005'te 4,1 ile 4,6 milyon arasındayken 2030'a gelindiğinde bu rakamın ikiye katlanarak 8,7 ile 9,3 milyon aralığında olacağı öngörülmektedir (Dorsey vd., 2007).

Dünya çapında beklenen yaşam süresi arttıkça kronik hastalıkların yükü de artmakla beraber özellikle gelişmekte olan Doğu ülkelerinde de bu yük muhtemelen büyüyerek artmaya devam edecektir. Hastalık yükünü hafifletmek, sosyal ve ekonomik olarak da bu durumu dengelemek adına çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

Parkinson hastalığı için etkili tedavi yöntemleri bulunmamakla birlikte hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için mevcut tedaviler arasında ilaç tedavisi ve cerrahi yer alır. Derin beyin stimülasyonu (DBS), PH için hedeflenen beyin alanına bir elektrot implante edilerek yüksek frekanslı (100-200 Hz) elektriksel bir uyarı aracılığıyla gerçekleştirilen cerrahi bir tedavi olup beyin dokusunu yok etmeye gerek kalmadan bir lezyonun etkisini taklit edebilir kılar (Poewe vd., 2007).

Kan-beyin bariyerinden geçerek dopamine dönüştürülebilen L-Dopa, dopaminerjik ilaçlar arasında en sık kullanılan ilaçtır. L-Dopa yaşam kalitesini sınırlı da olsa iyileştirebilme

potansiyelinden dolayı Parkinson için değerli bir ilaç olma konumundadır. Fakat bu ilaca karşı geliştirilen direnç ve motor komplikasyonları nedeniyle kullanımını karmaşık hale getirmektedir ve her hasta aynı terapötik etkiyi elde edememektedir (Cools vd., 2003; Jamebozorgi vd., 2019; Peschanski vd., 1994; Pinna vd., 2014; Reichman, 2016).

Yapılan tedavilerin yetersizliği, bilim insanlarını moleküler düzeyde çalışmaya itmektedir. PH hastalarının çoğu sporadiktir ve hastalığın etiyojisi bilinmemektedir ve bu formlar genellikle genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonu tarafından oluşmaktadır (Mastrangelo, 2017).

Parkinson hastalığının yanı sıra kanser hastalığında yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanların nörotoksik olabileceği ve sinir hasarı ile karakterize edilen; kemoterapinin neden olduğu periferik nöropatiye (CIPN) yol açabileceği bazı çalışmalarda gösterilmektedir (Holz, 2016; Kannarkata, 2008; Shah vd., 2018).

Kanser kemoterapisi, malign hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kontrol etmek için farmakolojik ajanların kullanımını ifade eder. Esas olarak çoğalan kanser hücrelerini hedef alan kemoterapötik ajanlar aynı zamanda sağlıklı nöronlar üzerinde de güçlü hedef dışı etkilere sahiptir; bu, kemoterapinin neden olduğu periferik nöropati olarak bilinen patolojik bir durumdur (Au vd., 2014; Jaggi ve Singh, 2012; Wolf vd., 2008).

CIPN patogenezinin aksonopati (akson dejenerasyonu) ve nöropati (nöronal hücre ölümü) gelişiminin yanı sıra mitokondri ve kalsiyum kanallarındaki işlev bozukluklarıyla ilişkili olduğunu öne süren kanıtlar da birikmektedir (Berbusse vd., 2016; Canta vd., 2015; Cashman ve Hoke, 2015; Siau ve Bennett, 2006). CIPN prevalansı üzerine yakın zamanda yapılan bir meta-analiz çalışması, kemoterapi alan kanser hastalarının %68 kadarının CIPN geliştirdiğini ve hastaların yaklaşık %30'unun kemoterapiyi bıraktıktan 6 ay veya daha uzun süre sonra hala CIPN yaşadığını ortaya koymaktadır (Seretny vd., 2014) .

Kemoterapiye bağlı periferik nöropati gibi rahatsızlıklar, kanser hastalarının yaşamı tehdit eden hastalıklarına yönelik tedavilerden vazgeçmelerine neden olan önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Günümüzde CIPN'nin etkili bir tedavisi ya da önleyici bir yaklaşımı bulunmamaktadır. CIPN, duyu ve motor fonksiyonlarda kalıcı kayıplara yol açarak

hastaların günlük yaşam aktivitelerini ve yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir (Chine vd., 2019).

2.2. Isı Şok Proteinleri

Canlı hücreler ve dokular, yaşam döngüleri boyunca akut veya kronik stres koşullarına sürekli olarak maruz kalmaktadır. Yüksek sıcaklık, ağır metaller, toksinler ve hipoksi gibi proteine zarar veren çevresel faktörlerin yanı sıra kanser, iskemi, enfeksiyonlar ve inflamasyon gibi patolojik durumlar, protein homeostazının (proteostaz) korunmasını sağlamak amacıyla hücrel stres tepkilerini tetiklemektedir. Bu tepkilerden biri, hücrel koruma mekanizmalarının önemli bir parçası olan ve ısı şoku proteinlerinin (HSP'ler) artan ekspresyonuyla karakterize edilen evrimsel olarak korunmuş ısı şoku yanıtıdır. HSP'lerin çoğu, protein agregasyonunun önlenmesi ve ubiquitin-proteazomal degradasyonun yönlendirilmesi için gerekli olan moleküler şaperonlar olarak işlev görmektedir (De Mai, 1999; Multhoff, 2007; Vihervaara ve Sistonen, 2014; Westerheide vd., 2012).

Anormal protein katlanması, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptotik mekanizmaların tümü, zararlı moleküller üreterek nörodejenerasyona yol açan olaylar dizisini teşvik edebilen nöroinflamatuvar mekanizmalarla bağlantılı olarak nörodejeneratif hastalıkların nedenleri olarak rapor edilmektedir (Aridon vd., 2011).

HSP'lerin işlevsel yollarının engellenmesi, proteostazın bozulmasına yol açarak hücrelerde yanlış katlanmış ve agregat oluşturmuş proteinlerin birikmesine neden olur. Bu durum, nörodejeneratif hastalıkların göstergesi olan inklüzyonların oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Gidalevitz vd., 2010; Neef vd., 2011). Öte yandan, yapısal olarak yüksek HSP seviyeleri, tümör oluşumunda görülen düzensiz hücre proliferasyonu ve baskılanmış hücre ölümünü destekleyen bir mekanizma olarak da değerlendirilmektedir (Dai vd., 2007; Scherz-Shouval vd., 2014).

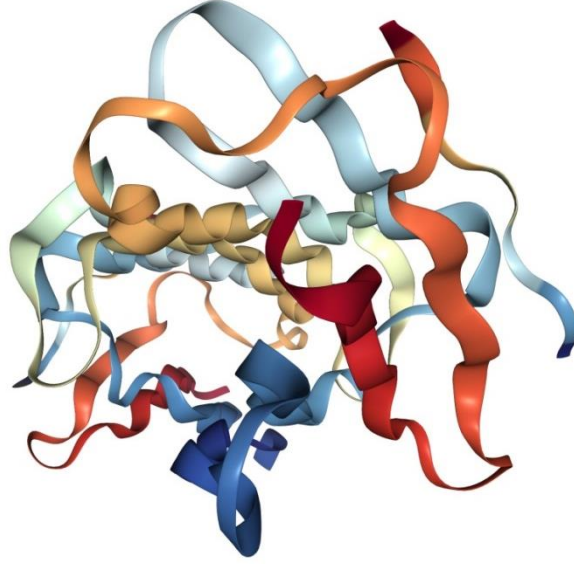
Alzheimer, Parkinson, amyotrofik lateral skleroz ve poliglutamin hastalıkları (örneğin, Huntington hastalığı) gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ortak bir özelliği, beyinde yanlış katlanmış proteinlerin birikimidir. Bu nedenle birçok çalışma HSP'lerin nöroprotektif rolüne odaklanmıştır.

PH, toksik protein agregatlarının oluşumu ve birikimi ile ilişkilendirildiğinden, moleküler şaperonların bu agregatları çözme yetenekleri sayesinde nöronları dejeneratif süreçlerden koruyabileceği öne sürülmektedir (Soto ve Pritzkow, 2018). Bu bağlamda, moleküler ağırlıkları 10-150 kDa arasında değişen ve çeşitli alt gruplara ayrılan ısı şok proteinleri, özellikle küçük ısı şok proteinleri (sHSP'ler) (HSP27), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve büyük HSP'ler (HSP110 ve GRP170) gibi şaperon protein aileleri, bu koruyucu mekanizmalarda önemli bir rol oynamaktadır (Johnston vd., 2018).

2.2.1. HSP27 ve Parkinson hastalığındaki yeri

HSP27 (HSPB1 olarak da adlandırılır), küçük ısı şok proteinleri ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler, yanlış katlanmış veya kısmen katlanmış proteinlerle etkileşim kurarak bunların agregat oluşturmasını engeller ve stabilizasyonlarını sağlar. sHSP'ler yapısal olarak ifade edilir ve özellikle yüksek sıcaklık gibi stres koşullarında ekspresyon seviyeleri artmaktadır. İşlevlerini yerine getirmek için ATP'ye ihtiyaç duymamaları, düşük enerjili hücresel stres ortamlarında etkili bir şekilde çalışabilmelerine olanak tanımaktadır (Treweek vd., 2015).

HSP27, fizyolojik koşullarda çeşitli hücre türlerinde yapısal olarak ifade edilir ve stres koşullarında ekspresyon seviyesinin artmasıyla hücre içi protein konformasyonunun korunmasına ve protein fonksiyonlarının stabilizasyonuna katkı sağlar. Ayrıca, HSP27'nin hücre proliferasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, otofaji ve fibrozis gibi sinyal iletim süreçlerinde de rol oynadığı bilinmektedir (Alexander vd., 2022; Holguin vd.,2022; Yang vd., 2021).



Şekil 2.1. HSP27/HSPB1 protein yapısı

(RSCB, PDB, <https://www.sinobiological.com/resource/hsp27-hspb1/proteins>).

Son yıllarda kapsamlı bir şekilde incelenen HSP27'nin hücre içi redoks homeostazisini düzenlediği ve lipid peroksidasyonuna (LPO) ve protein oksidasyonuna karşı koruma sağlayarak oksidatif hasara karşı hücrel direnci arttırdığı gösterilmiştir (Martínez-Laorden, 2020).

HSP27, yapılan bir çalışmayla Lewy cisimciklerinin birikintilerinde tespit edilmiştir (McLean vd., 2002). *In vitro* bir çalışmada ise, HSP27'nin α -syn'in amiloid fibril oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Cox vd., 2016). Ayrıca HSP27, yaşa bağlı olarak biriken ve polimerize olan oksitlenmiş dopaminin birincil depolama alanları olan, Substantia Nigra'daki nöromelanin granüllerinin bileşenlerinden biridir. Bu veriler göz önüne alındığında, HSP27, Parkinson hastalığının patofizyolojisinde özellikle etkilenen dopaminerjik nöronlarda mevcut olduğundan, potansiyel tedavi hedefleri arasında yer almaktadır (Stefani ve Dobson, 2003).

Hücre içindeki protein agregasyonunun, proteostatik dengesizliklere karşı ilk savunma mekanizması olarak α Bc ve HSP27 gibi sHSP'ler tarafından hafifletildiği bildirilmektedir (Dai vd., 2007). HSP27'nin, Parkinson hastalarına ait beyin dokularındaki Lewy cisimciklerinde α -syn ile birlikte çökelti oluşturduğu bilinmektedir. α -syn birikiminin hücre tabanlı bir modelinde, bu model kullanılarak sHSP'ler olan HSP27 ve α Bc'nin, α -syn'in hücrelerde kalıntı olarak birikmesini engellediği rapor edilmiştir (Cox ve Ecroyd, 2017).

Bireysel HSP'lerin koruyucu etkileri üzerine yapılan çalışmalarda çoğunlukla ana uyarılabilir ısı şoku proteini HSP70'ye odaklanılsa da, mevcut kanıtlar, küçük ısı şoku proteini HSP27'nin sinir sisteminde daha güçlü bir koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, örneğin kültürlenmiş nöronlarda HSP70'in aşırı ekspresyonu, termal veya iskemik strese karşı koruma sağlarken, diğer bazı stres uyaranlarına karşı koruma sağlamamaktadır. Diğer taraftan, HSP27'nin aşırı ekspresyonu, pek çok stres faktörüne karşı etkili bir koruma sunmaktadır. Benzer şekilde, HSP70'i aşırı eksprese eden transgenik hayvanlar kalp iskemisine karşı korunmuş olsa da, serebral iskemik ve sinir sistemi üzerindeki diğer streslere karşı daha az koruma gösterdiği rapor edilmiştir. Buna karşın, HSP27'yi aşırı ekspresyon gösteren transgenik hayvanlar, kalp iskemisine karşı koruma sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda nörolojik koruma da sergilemişlerdir (Duffy ve Boucher, 2015; Latchman, 2005).

2.3. Ferroptozis

Hücre ölümü, temel bir patofizyolojik süreç olmanın yanı sıra, normal yaşam ve gelişim süreçlerinde de hücre homeostazı korumada önemli bir rol oynamaktadır. Hücre ölümü, iki ana modelde incelenebilir: kazara hücre ölümü (accidental cell death; ACD) ve düzenlenmiş hücre ölümü (regulated cell death; RCD) (Han vd., 2020). ACD, hücrelerin kimyasal, fiziksel veya mekanik streslere maruz kaldığında ani ve yıkıcı bir şekilde ölmesiyle karakterizedir. Buna karşın RCD, özel bir moleküler mekanizmaya dayanan ve genetik ya da farmakolojik müdahalelerle modüle edilebilen, hızlandırılabilen veya geciktirilebilen bir hücre ölümü sürecidir (Galluzzi vd., 2018).

Hücre ölümünün ilk sınıflandırması 1970'lere dayanmaktadır. Hücre ölümünün 3 ana türü kapsadığı belirtilmiştir. Bunlar; apoptoz, nekroz ve otofajidir (Schweichel ve Merker, 1973).

Apoptoz, hücre dışı veya hücre içi mikro ortamın bozulmasıyla başlatılan düzenlenmiş hücre ölümü türüdür. En iyi tanımlanmış hücre ölüm mekanizmalarından biri olan apoptozda hücrelerin kontrollü bir şekilde ölmesiyle çevre dokulara zarar verilmez. Bu mekanizma da rol BCL-2 protein ailesi ve Kaspaz enzimleri önemli rolleri alan proteinlerdir (Han vd., 2020; Hao vd., 2018; Li vd., 2020; Tang vd., 2019).

Nekroz, kazara hücre ölümü olarak da tanımlanırken apoptozdan farklı olarak dokulardan inflamasyona neden olabilir ve kaspaz bağımsızdır. Rol alan proteinler, RIPK1 ve RIPK3 (Reseptör etkileşimli protein kinazları) ve MLKL (Karışık soy kinaz alanı benzeri protein). (Galluzzi vd., 2018; Li vd., 2020; Wang vd., 2014).

Otofaji, vücudun hasarlı hücreleri temizleyerek daha yeni ve sağlıklı hücreler oluşturduğu doğal ve biyolojik bir süreçtir. Rol alan proteinler; Beclin-1 ve LC3 (Mikrotübül ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3) (Latunde-Dada, 2017; Li vd., 2020; Park ve Chung, 2019).

Nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi durumlarda önemli bir rol oynayan ferroptozis, demir bağımlı, lipid peroksidasyonu ile tetiklenen bir hücre ölümü şeklindedir. Rol oynayan proteinler, glutatyon peroksidaz 4 (GPx4), lipid peroksidasyon ürünleri (örn. malondialdehit ve 4-HNE) (Han vd., 2020; Li vd., 2020).

Ferroptozis, apoptotik olmayan bir hücre ölümü biçimi olarak, ilk kez Dixon ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Ferroptozis, hücre içi demir depolarına bağlı olarak meydana gelirken, diğer metallere bağlı değildir. Morfolojik, biyokimyasal ve genetik açıdan apoptoz, nekroz ve otofaji ile farklılık gösteren ferroptozisin karakteristik mekanizmaları, demir ve reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyonunun (LPO) birikimi, indirgenmiş glutatyon (GSH) tükenmesi ve sistein/glutamat taşıma süreçlerini içermektedir (Dixon vd., 2012; Jiang vd., 2021; Yan vd., 2021).

Ferroptozis, son zamanlarda kanserle ilişkili bir hücre ölümü süreci olarak tanımlanmış olmakla birlikte, mevcut çalışmalarda ferroptozisin dopaminerjik nöronlar için de önemli bir hücre ölüm yolu olduğu gösterilmiştir (Costa vd., 2023; Do Van vd., 2016; Green, 2019; Luoqian vd., 2022; Wang vd., 2022).

PH'nın patolojik belirteçlerinden biride etkilenen nöronlarda anormal demir birikimidir. Demir, DNA sentezi, mitokondriyal solunum ve oksijen taşınması dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik işlevlerde hayati bir rol oynar. Nöronal olarak demir, miyelinleşme ve nörotransmisyonunda rol oynar ve beyindeki en bol bulunan metaldir. Ayrıca demir, dopamin biyosentezinde önemli bir enzim olan tirozin hidroksilaz (TH) için bir kofaktör görevi gördüğü yapılan çalışmalarla vurgulanmaktadır. Demir bu eylemlerde fizyolojik olarak

önemli olsa da, aşırı miktarda bulunması oksidatif stres yoluyla toksik etkiler gösterebilmektedir (Mounsey ve Teismann, 2012; Rausch vd., 1988).

Nörodejeneratif hastalık bağlamında, nöronlarda sıklıkla azalmış glutatyon, yüksek hücrel demir ve artmış lipid peroksidasyonu gözlenmektedir (Do Van vd., 2016; Yoo vd., 2010). Beyinde demir birikmesi, GSH tükenmesi ve lipid peroksidasyonu gibi durumların görünmesi nörodejeneratif hastalıklarda ferroptozun da dahil olduğunu düşündürmektedir (Reichert vd., 2020).

2.4. HSP27 İnhibitörü J2 Molekülü

Kanser tedavisinde kemoterapi ve radyasyon tedavisinin etkinliğini artırma potansiyeli nedeniyle klinik öncesi araştırmalarda incelenen J2 ($C_{13}H_{12}O_4S$) molekülü, bir HSP27 inhibitörüdür. Yapılan çalışmalar, J2'nin HSP27'nin dimerizasyonunu değiştirerek büyük polimerlerin oluşumunu engellediğini ve bu yolla HSP27'nin şaperon aktivitesini bozduğunu göstermektedir (Choi vd., 2017; Hwang vd., 2017). Bu inhibisyon, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesine ve hücrel stresin artmasına yol açmaktadır (Karademir ve Özgür, 2023).

Nörodejeneratif rahatsızlıklarda HSP'lerin aktivitelerinin önemi sıkça vurgulanmaktadır. Son çalışmalar diğer HSP'lere göre HSP27'nin sinir sisteminde daha güçlü bir koruyucu etkiye sahip olabileceğini vurgulamaktadır (Latchman, 2005). Mevcut literatürde, J2 molekülünün SH-SY5Y hücreleri veya Parkinson hastalığı modellenmiş hücreleri üzerinde doğrudan spesifik çalışmalara rastlanmamıştır. HSP27 inhibitörü J2'nin HSP27'yi baskılaması sonucunda nöronal hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Rotenonun hücreler üzerinde yarattığı tahrip de değerlendirilerek; mitokondriyal disfonksiyon, Fe^{2+} birikimi ve ferroptozis mekanizmasının SH-SY5Y hücre hattında ve Parkinson hastalığı modelinde nasıl bir ilişki içinde olduğu incelenmiştir. Fe^{2+} seviyelerindeki artış ve GPx4 düzeylerindeki azalma, ferroptozis mekanizmasının nöronal hücrelerde hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir. Ayrıca, HSP27 inhibisyonunun bu sürece etkisini değerlendirmek amacıyla J2 molekülü ile gerçekleştirilen deneylerde ferroptozisin daha da

arttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgular, ferroptosis mekanizmasının Parkinson hastalığında önemli bir rol oynayabileceğini ve HSP27'nin bu süreçte koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

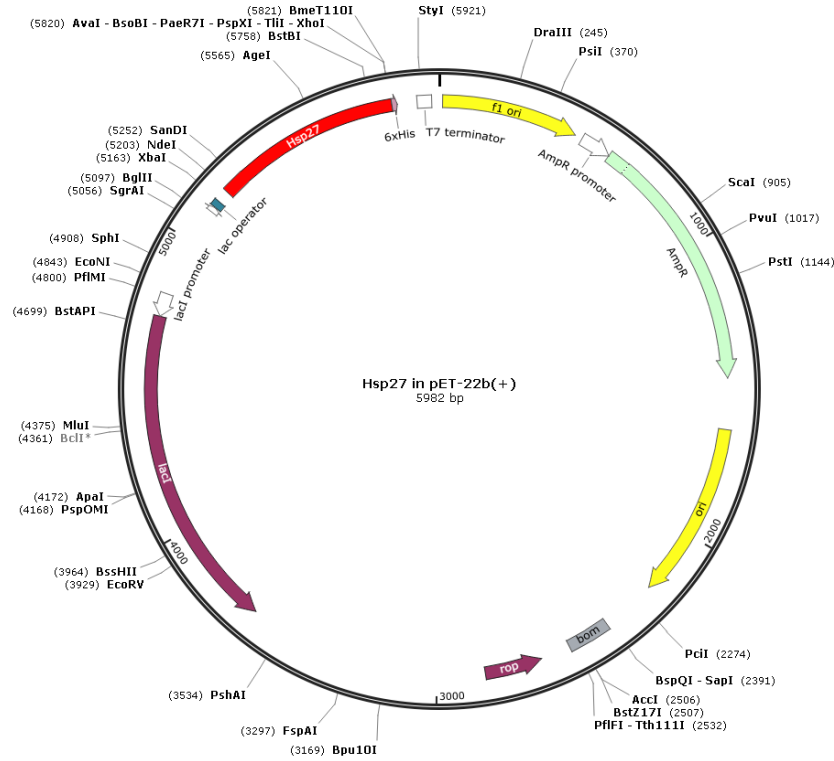
3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez kapsamında yapılan tüm deneyler Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi/Mühendislik Fakültesi/Gıda Mühendisliği Bölümü/Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarında ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi/Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Plazmid

İnsan HSP27 gen dizisi (NM_001540), plazmid vektör pET-22b(+)'e klonlanmış bir şekilde liyofilize olarak Biomatik'ten (Ontario, Kanada) temin edilmiştir.



Şekil 3.1. pET-22b(+) 'de HSP27 ekspresyon vektörünün şematik gösterimi

3.1.2. Mikroorganizma Suşları ve Besiyerleri

Plazmid amplifikasyonu ve rekombinant HSP27'nin ekspresyonunda, *Escherichia coli* XL1-Blue ve BL21(DE3) suşları kullanılmıştır. %0,5 maya ekstraktı, %1 NaCl ve %1 pepton içeren LB besiyerine ilave olarak seçim sağlamak amacıyla ampisilin antibiyotiği eklenerek bir kültür ortamı hazırlanmıştır. Klonlama işlemi sonrasında pozitif *E.coli* BL21(DE3) hücre transformantlarının seçimi, ampisilin içeren LB agar besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Plazmid Transformasyonu ve Restriksiyon Enzimleri

HSP27 genini içeren plazmid, *E.coli* XL1-Blue ve BL21(DE3) suşlarına aktarılmıştır. XL1-Blue yüksek verimli plazmid replikasyonu için kullanılırken, BL21(DE3) suşu rekombinant protein üretimi için kullanılmıştır. Transformasyon sonrası plazmidin doğruluğunu teyit etmek amacıyla, plazmid DNA'sı *ApaI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim analizi yapılmıştır. Elde edilen bant profilleri, hedef genin doğru bir şekilde aktarıldığını ve plazmidin öngörülen şekilde yapılandırıldığını göstermiştir.

3.1.4. Hücre Hatları ve J2 molekülü

SH-SY5Y hücre hattı ATCC'den ticari olarak satın alınarak temin edilmiştir. J2 bileşiği ProbeChem Biochemicals Co. Ltd. (Şanghai, Çin) firmasından temin edilmiştir.

3.1.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.5.1. Çözeltiler ve tamponlar için kullanılan kimyasal maddeler

Çözeltilerin ve besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich (ABD), ve Merck (Almanya) firmalarından tedarik edilmiştir.

3.1.5.2. Hücre kültürü deneylerinde ve biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Aquaguard-1	: Vivacell Bioscience
Aquaguard-2	: Vivacell Bioscience
BAX ELISA kit	: Cusabio
BCL-2 ELISA kit	: Cusabio
CASP3 ELISA kit	: Cusabio
cDNA sentez kiti	: iScript™ cDNA Kit, Biorad
Cell Proliferation Kit (MTT)	: Biological Industries
Demir Ölçüm Kiti	: Iron Osr 6186, Osr 6286, Beckman Coulter
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	: Serana
ECL substrast	: Clarity Western ECL Substrat, 500 mL, BioRad
Fetal Bovine Serum	: Biological Industries
Jel hazırlama kiti	: TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%, BioRad
L-Glutamin	: Serena
Penisilin-Streptomisin	: HyClone
Protein ekstraksiyon kiti	: M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent
Protein inhibitör mix M	: Serva 39102.01
RNA izolasyon Kiti	: RNeasy Mini Kit (50), Qiagen
RT-qPCR Kit	: SYBR Green PCR Master Mix, Qiagen
TAS Assay Kiti	: Rel Assay Diagnostics
TOS Assay Kiti	: Rel Assay Diagnostics
Tripsin-EDTA	: Serana

3.1.6. Yararlanılan alet ve cihazlar

Biyogüvenlik kabin	: Bil-ser B2 Class II,
Buz makinesi	: Scotsman AF-20
Buzdolapları	: Arçelik
CO ₂ inkübatörü	: Nüve EC 160
Çalkalamalı inkübatör	: ISS-7200 Incubated Shaker

Demir Ölçüm Cihazı	: Beckman Coulter AU5800
Derin dondurucu (-30 °C)	: Hairer
Dikey Elektroforez Sistemi: Mini-Protean Electrophoresis System (Bio-Rad)	
Elektroporasyon Cihazı	: BioRAD Gene Pulser Xcell
ELISA okuyucu	: Epoch, Biotek
ELISA yıkayıcı	: ELx50, BioTek
Güç kaynağı	: Thermo EC 300 XL
Hassas terazi	: Shimadzu ATX 120
Inverted Mikroskop	: Nikon Eclipse Ti2-U Inverted
Işık mikroskobu	: Leica DM 4000B
Jel görüntüleme cihazı	: ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad)
Lüminometre	: Biofix lumi-10 Macherey–Nagel
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standard
Mikrodalga fırın	: Arzum
Otoklav	: Zealway GR110DR
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
pH metre	: Radiometer meterlab PHM 210
DNA/RNA tayin cihazı	: Qubit 4 Fluorometer
Real-time PCR cihazı	: Qiagen Rotor Gene 6flex
Saf su cihazı	: Nüve
Santrifüj	: Hettich Santrifüj 220, Hettich Santrifüj 220R, Beckman
Coulter Allegra X-30R Santrifüj	
Soğutmalı santrifüj	: Beckman Coulter Allegra X-30R
Spektrofotometre	: Spektronic 20 Genesis
Su banyosu	: Memmert
Şarjlı otomatik pipet	: Isolab
Ultra-low dondurucu (-85 °C)	: Haier, New Brunswick U410
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Yatay Elektroforez tankı	: Thermo Owl Easycast B2-BP

3.1.7. Kullanılan kimyasal çözeltiler

10X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu: 10x TBE için 54 g Tris, ve 27,5 g borik asit 600 mL distile su ile çözülmüş ve saf HCL ile pH= 8,0'a ayarlandıktan sonra 40 mL EDTA eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

10x TG tamponu: 250 mM Tris+1900 mM glisin içermektedir. 1 L için; 30,3 g tris-base ve 144 g glisin tartılarak hazırlanan tampon otoklav olarak steril hale getirilmiştir.

%10 SDS çözeltisi için 25 g sodyum dodesil sülfat tartılarak, 200 mL saf suda çözüldükten sonra 250 mL'ye tamamlanarak %10'luk bir çözelti hazırlanmıştır.

TGM (Tris-Glisin-Methanol) tamponu; 25 µM Tris, 190/192 mM Glisin, %20 metanol içermektedir. 250 mL için; 25 mL 10x TG, 175 mL ddH₂O ve 50 mL metanol eklenerek +4°C de muhafaza edilmiştir.

TGS (Tris-Glisin-SDS) yürütme tamponu; 10x TG tamponu 1x olacak şekilde kullanılmıştır. 2 kaset için hazırlanan yürütme tampon içeriği 7mL SDS+70 mL 10x TG karıştırılarak distile su ile 700 mL'ye tamamlanmıştır.

TBS (Tris-Buffered Saline) tamponu; 20 mM Tris base (pH=7,5), 150 mM NaCl içermektedir. 500 mL için; 1 M Tris stoktan (pH=8) 10 mL+1 M NaCl stoktan 75 mL eklenerek karıştırıldıktan sonra pH 7,5'e sabitlenmiştir.

TBST tamponu; 250 mL TBS + 250 µL Tween 20 eklenerek hazırlanmıştır.

Blocking solüsyonu; %1'5'lik BSA (bovine serum albumin) kullanılmıştır. 0,75 g BSA tartıldıktan sonra 50 mL TBST içinde çözüldürülmüş ve 0,22 µm por çapına sahip PES filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Deneyleri ve Biyokimyasal Analizler

3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin-Streptomisin (PenStrep) içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Hücrelerin 37°C'de, %5 CO₂ içeren steril atmosfer koşullarında inkübasyonu sağlanmıştır. Karbondioksit inkübatöründe, inkübasyon ortamının %95 nem seviyesinde sabit kalması ve kontaminasyonun önlenmesi amacıyla, 1 L otoklavlanmış saf suya %1 oranında aquaguard-1 eklenmiştir. Hücre kültürü işlemleri laminar akış kabini içinde gerçekleştirilmiş olup, her işlem öncesi ve sonrasında kabin, UV ışınlarıyla sterilize edilmiş ve %70'lik etanol ile temizlenmiştir.

3.2.1.2. Hücre kültürünün pasajlanması

İnkübasyon sürecinde, SH-SY5Y hücre kültürünün gelişimi günlük olarak izlenmiş ve besiyeri her gün yenilenmiştir. Hücrelerin yoğunluğu, T-flask yüzeyinin yaklaşık %90'ını kaplayana kadar besiyeri değişim işlemleri devam etmiştir. SH-SY5Y hücre hattının T-flask'ın 75 cm²'lik yüzeyinin %90'ını doldurması genellikle 2 ila 3 gün sürmektedir. Hücreler, invert mikroskop ile yeterli yoğunluğa ulaştığında, steril çalışma ortamında pasajlama işlemi yapılmıştır. T-flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 37°C'de 4 mL DPBS ile yıkanarak ölü hücrelerden temizlenmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için 6 mL %0,25 Tripsin-%0,02 EDTA solüsyonu eklenmiş ve yaklaşık 5-6 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin yüzeyden tamamen ayrıldığı invert mikroskop ile kontrol edilmiş ve ardından tripsin etkisini nötralize etmek amacıyla hücrelerin üzerine %1 L-glutamin, %1 PenStrep ve %10 FBS içeren 25 mL DMEM besiyeri eklenmiştir.

Daha sonra hücre kültürü, 50 mL'lik steril falkon tüplere transfer edilmiş ve 800 xg hızında 7 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletinin üzerine %1 L-glutamin, %1 PenStrep ve %10 FBS içeren 12 mL DMEM eklenmiş ve otomatik pipet kullanılarak hücreler tamamen homojen hale gelinceye kadar pipetaj yapılmıştır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak, hücreler 2 veya 3 T-

flaska aktarılmıştır. İnoküle edilen hücrelerin besiyerleri, %1 L-glutamin, %1 PenStrep ve %10 FBS içeren DMEM ile 10 mL'ye tamamlanmış ve pasajlanan hücre kültürleri, aynı inkübasyon koşullarında karbondioksit inkübatörüne yerleştirilerek inkübasyona devam edilmiştir.

3.2.1.3. Hücre kültürünün stoklanması

SH-SY5Y hücreleri, ilk kùltivasyonlarından sonra düzenli olarak pasajlanarak çoğaltılmış ve uzun süreli saklama amacıyla sıvı azot tankında dondurulmuştur. Hücre dondurma işlemi sırasında, hücreler T-flasklarda pasajlanmış ve ardından 800 μ g'de 7 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Her bir kriyo tüpü için, aseptik koşullarda 900 μ L FBS ve 100 μ L DMSO karışımı hazırlanmış ve bu hücre dondurma süspansiyonu hücre pelletinin üzerine eklenmiştir. Hücreler pipetleme işlemiyle homojen hale getirildikten sonra, 2 mL'lik kriyo tüplerine aktarılmış ve hızla sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

3.2.1.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi

Tez çalışmaları kapsamında stoklanan hücreler, ihtiyaç duyulduğunda çözündürülerek deneylere devam edilmiştir. Dondurulmuş hücreler, 37°C'de su banyosunda kısa süre inkübe edilerek çözülmüştür. Aseptik koşullar altında falkon tüpe aktarılan hücreler, 37°C'de ısıtılmış 30 mL DMEM'e eklenmiş ve DMSO'nun olası toksik etkileri ortadan kaldırılmıştır. Hücreler, 800 μ g hızında 7 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletine %1 L-glutamin, %1 PenStrep ve %10 FBS içeren 10 mL DMEM eklenerek pipetleme ile homojenize edilmiştir. Hazırlanan hücre kültürleri, aynı koşullarında yeniden inkübasyona alınmıştır.

3.2.1.5. Hücre sayımı

İnkübasyona bırakılan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 37°C'de 4 mL DPBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin TC-treated yüzeyden ayrılması amacıyla, 6 mL %0,25 Tripsin-%0,02 EDTA solüsyonu uygulanmış ve ardından hücre süspansiyonuna 37°C'de ısıtılmış DMEM eklenmiştir.

Hücreler, steril falkon tüplere aktarılmış ve santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Oluşan hücre pelletine 5 mL DMEM eklenerek pipetle homojenize edilmiştir. Hücre sayımı, 10 µL hücre süspansiyonu thoma lamına alınarak gerçekleştirilmiş; hücre sayısı, DMEM hacmi ve thoma lamındaki sıvı hacminin 1 mL'nin dörtte biri olduğu dikkate alınarak hesaplanmıştır.

3.2.1.6. Sitotoksisite çalışmaları

3.2.1.6.1. Rotenon ve J2 molekülünün hazırlanması

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında Parkinson hastalığı modeli oluşturmak amacıyla rotenon kullanılmıştır. Literatürdeki bilgilere dayanarak ana stok çözeltisi 0,1 M olarak hazırlanmıştır. Molekül ağırlığı 394,41 g/mol olan rotenondan 0,039 g tartılmış ve 1 mL DMSO içinde çözülmesi sağlanmıştır.

1 mg olan HSP27 inhibitörü J2 molekülü (Cat No: PC-63191) üzerine 378 µL DMSO eklenerek 0,01 M ana stok çözeltisi elde edilmiştir.

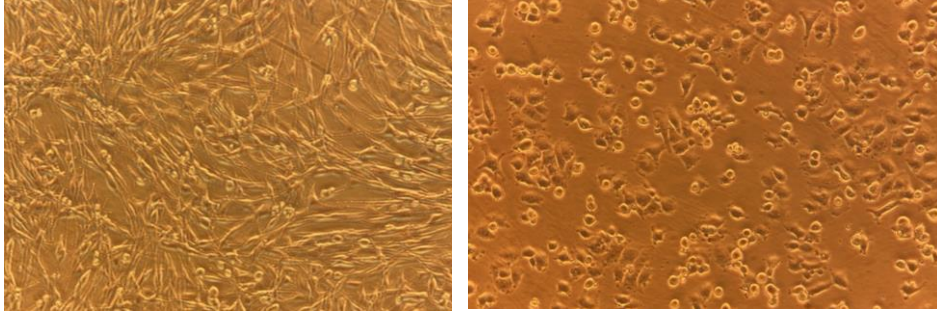
3.2.1.6.2. Hücre canlılık testi

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, her bir kuyucukta 200 µL besiyeri içinde 5×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu TC-treated plaklara inoküle edilmiştir. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında gece boyunca inkübe edilmiştir.

Parkinson modeli oluşturmak amacıyla her bir kuyucuğa 0,1 mM rotenon eklenmiş ve hücreler 12 saat boyunca bu koşullarda inkübe edilmiştir. J2 molekülünün zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerini incelemek için, 12, 24 ve 48 saatlik sürelerde farklı konsantrasyonlar (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 ve 0,0975 µM) kullanılarak 3 tekrarlı deneyler gerçekleştirilmiştir.

İlk grup, yalnızca SH-SY5Y hücre hattı olup, bu gruba J2'nin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. İkinci grup ise rotenon kullanılarak SH-SY5Y hücre hattından oluşturulan Parkinson modeli olup, bu gruba J2'nin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Belirlenen

zaman aralıklarının sonunda, hücre canlılığını ölçmek amacıyla her kuyucuğa 100 µL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) reaktifi eklenmiş ve hücreler 2,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında protokole uygun şekilde MTT solvent eklenmiş ve absorbans değerleri, hücre canlılık yüzdeleri hesaplamak amacıyla 570 nm'de ELISA mikropate okuyucusu ile ölçülmüştür.



Şekil 3.2. SH-SY5Y hücre hattı ve Rotenon ile indüklenen Parkinson modellemesi

IC₅₀ değerleri, AA Bioquest IC₅₀ hesaplama aracı (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) kullanılarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri, 24 saatlik inkübasyon süresi için 0,12 µM olarak belirlenmiş ve bu değer alt ve üst konsantrasyon değerleri de analizlere dahil edilmiştir. Sonra ki tüm hücre kültürü deneyleri, Tablo 1'de belirtilen deney setindeki madde ve konsantrasyonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Deney seti kodları

Kodlar	Uygulanan Madde
Negatif Kontrol (-K)	Sadece besiyeri
NK-1	0,06 µM J2
NK-2	0,12 µM J2
NK-3	0,24 µM J2
Pozitif Kontrol (+K)	Rotenon içeren besiyeri (10 mM)
PK-1	Rotenon + 0,06 µM J2
PK-2	Rotenon + 0,12 µM J2
PK-3	Rotenon + 0,24 µM J2

3.2.1.7. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı ve Parkinson modeli oluşturulmuş hücre hattı üzerinde test edilen J2 molekülünün her bir konsantrasyonu için belirlenen genlerin ekspresyonunu moleküler düzeyde değerlendirmek amacıyla, her gruptaki hücrelerin RNA'ları saflaştırılarak biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Deney setindeki 8 farklı grup için aseptik koşullarda TC-treated petrilere 10 mL'de yaklaşık 1×10^6 hücre içerecek şekilde gece boyunca inokülasyon yapılmış; daha önce açıklanan deney grupları oluşturulmuştur.. 24 saat sonra, Qiagen RNeasy Mini Kit (50) protokolü kullanılarak toplam RNA saflaştırma işlemleri aşağıda belirtilen adımlara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

- Petrilere alınan süpernatant, falkonlarda 10 dk boyunca 8000 xg 'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti elde edilmiştir. Peleti içeren falkonlar, buza gömülmüştür.
- Buzun üzerindeki petrilere üzerine 1 mL Qiagen RNAprotect Tissue Reagent eklenmiş ve 15 saat 4 °C'de penetrasyon için buz dolabında inkübe edilmesinin ardından kazıma işlemi yapılarak ilk santrifüj işleminin üzerine eklenip pipetle homojenize edilmiştir.
- Her örnek, 2 mL'lik ependorf tüplerine alınmış ve 8000 xg 'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler 1,5 mL PBS ile yıkanmış ve ardından santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- Her bir gruba hazırlanan RLT buffer karışımından (3000 μL RLT+30 μL β -merkaptoetanol) 350 μL eklenerek, 2 kez 1 dk vortekslenmiştir.
- Kitin içeriğinde bulunan QIAshredder tüplerine eklenen her örnek, maksimum hızda 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Soğuk, %70'lik hazırlanan etanol ile 350 μL (1:1 oranında) eklenerek pipetleme işlemi yapılmıştır.
- Hazırlanan her örnek, RNeasy kolona aktarılmış ve 45 saniye 8000 xg 'de santrifüj edilerek altta kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Her bir kolona 700 μL W1 buffer eklenmiş ve 45 saniye 8000 xg 'de santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- Her bir kolona 500 μL RPE buffer eklenmiş ve 45 saniye 8000 xg 'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- Bu adımda her bir kolona yeniden 500 µL RPE buffer eklenmiş ve 2 dk 8000 *xg*'de santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- Her bir kolon, boş halde maksimum hızda 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Bu aşamalarda kullanılan kolonların tüpleri atılmış ve kolonlar, 1,5 mL'lik RNaz-DNaz'dan arındırılmış steril yeni koleksiyon tüplerine yerleştirilmiştir.
- Her bir kolona 50 µL RNaz-free su eklenmiş ve +4°C'de 8000 *xg*'de 1 dk santrifüj edilerek toplam RNA elde edilmiştir.

Ekstrakte edilen RNA'nın saflık konsantrasyon ölçümünün yapılmasının ardından iScript™ cDNA sentez kit protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirilerek -80°C'de cDNA'lar RT-qPCR çalışmasında kullanılmak üzere stoklanmıştır.

RNA ve cDNA konsantrasyonu ve saflığının tespiti

260 nm, 280 nm, 320 nm dalga boylarında köre karşı bütün numunelerin absorbans değerleri ölçülerek RNA ve DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu ELISA mikrolate okuma cihazı aracılığıyla belirlenmiştir.

$$\text{RNA miktarı (ng/}\mu\text{L)} = (\text{OD}_{260}) \times \text{seyreltme faktörü} \times 40$$

$$\text{DNA miktarı (ng/}\mu\text{L)} = (\text{OD}_{260}) \times \text{seyreltme faktörü} \times 50$$

RNA konsantrasyonu ve saflık değerlendirmesi, farklı dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 260 nm dalga boyundaki absorbans RNA moleküllerinden, 280 nm'deki absorbans proteinlerden, 320 nm'deki absorbans ise partikül varlığından kaynaklanmaktadır. Saflık değerlendirmesi, RNA ve DNA için belirlenen aşağıdaki skalalar doğrultusunda yapılmıştır.

$$\text{RNA; } \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \geq 2,0$$

$$\text{DNA; } \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8$$

3.2.1.8. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi

Çalışmada negatif ve pozitif kontrol için belirlenen IC₅₀ değeri (0,12 µg/mL) referans alınarak, deney setindeki her bir grup için *BAX*, *BCL2*, *GPx4* ve *CASP3* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Referans geni olarak *GADPH* geni kullanılmıştır.

Primer tasarımları, *Homo sapiens*'e ait gen sekansları esas alınarak NCBI GenBank veritabanından yararlanılarak yapılmıştır. Tasarım sırasında, primerlerin hedef gen bölgesine özgü olmasına ve genomun diğer bölgeleriyle benzerlik göstermemesine dikkat edilmiştir. PCR ürünü uzunluğu 150-300 baz çifti ile sınırlandırılmış, primerlerin 3' uçlarında fazla sayıda G veya C nükleotidi bulunmamasına özen gösterilmiştir. GC içeriği %60'ı geçmeyecek şekilde ayarlanmış, seçimlerde mümkün olduğunca primerlerin G veya C ile sonlanmasına dikkat edilmiştir. Primer uzunlukları 15–30 baz çifti arasında olacak şekilde seçilmiş, T_m değerleri arasındaki farkın 5°C'yi aşmamasına özen gösterilmiştir. T_m değerleri, Rozen ve Skaletsky tarafından geliştirilmiş formül üzerinden hesaplanmış ve 67°C'nin altında olacak şekilde optimize edilmiştir (Rozen ve Skaletsky, 1999). Ayrıca, amplifikasyonun sadece cDNA'dan yapılmasını sağlamak ve genomik DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla primerlerin ekzon-ekzon birleşim bölgelerini kapsamamasına dikkat edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Primer sekansları

Gen	Primer Dizisi
<i>BAX</i>	F: 5-AGCAGATCATGAAGACAGGG R: 5-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA
<i>BCL-2</i>	F: 5-TATCTGGGCCACAAGTGAAG R: 5-ATTGACGTTTTGCCTGAAG
<i>GPx4</i>	F: 5-ATTGGTCGGCTGGACGAG R: 5-ACTTCGGTCTTGCCTCACTG
<i>CASP3</i>	F: 5-GCGCTCTGGTTTTCGTTAAT R: 5-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT
<i>GADPH</i>	F: 5-CTTTTGCGTCGCCAGCC R: 5-AATTTGCCATGGGTGGAATCA

Her bir gen için uygun bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla, gradient PCR yöntemi ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilen amplifikasyon sonucunda, en verimli ve spesifik amplifikasyonun gözlemlendiği sıcaklıklar belirlenip bu sıcaklıklar kullanılarak RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu değerler *BAX* ve *BCL2*, *GPx4* için 58°C, *CASP3* için 54°C ve *GADPH* için 53°C olarak belirlenmiştir.

Qiagen SYBR Green Master Mix kiti kullanılarak Tablo 2.'de ki genel sıcaklık siklusu protokolüne göre RT-qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. RT-qPCR sıcaklık siklusu

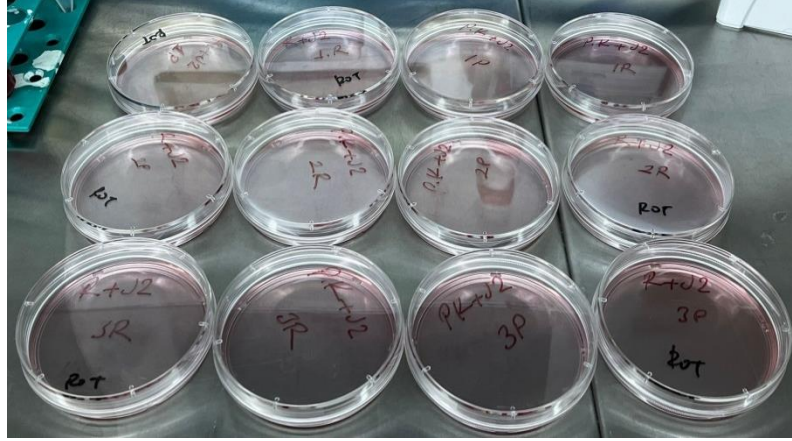
Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	30 sn.	1
Denatürasyon	95 °C	5 sn.	
Bağlanma	53-55 °C	30 sn.	50
Uzama (Florans okuma)	72 °C	45 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

3.2.1.9. Protein ifade düzeylerinin belirlenmesi

SH-SY5Y hücre hattı ve bu hücre hattından oluşturulan Parkinson modeli üzerinde denenen J2 maddesinin her bir konsantrasyonu HSP27 genindeki etkisini protein ifade düzeyinde belirleyebilmek için her bir hücre grubundan proteinler saflaştırılarak biyokimyasal analizler için kullanılmıştır. Deney setindeki 8 farklı grubun her biri için aseptik koşullarda TC-treated petrielerde 10 mL'de yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde 15-18 saat inokülasyon yapılmış, daha önce açıklanan basamaklar uygulanarak negatif ve pozitif kontroller oluşturulmuş ve belirlenen konsantrasyonlardaki ilaç uygulamaları gerçekleştirildikten 24 saat sonra total protein ekstraksiyon işlemi aşağıda ki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

- Petrieler üzerine proteaz inhibitör kokteyli ilave edilmesinin ardından 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Hücre üzerindeki sıvı kısım falkonlara alınarak 5 dk 8000 xg'de santrifüj edilmiştir, süpernetant ve pelletler ayrı tüplerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

- Petrile yüzeyinden hücre sıyrıcılar yardımı ile kazınan hücreler buz üzerinde 5-6 kez 21 gauge'luk steril şırınga ile çek-bırak yapılarak lizis işlemi gerçekleştirilmiştir.
- +4°C, 14.000 xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edilen örneklerin süpernetant kısmı yeni steril ependorf tüplere aliketlenerek -20°C'de stoklanmıştır.



Şekil 3. 3. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.1.10. Western-blot analizi

Western-blot analizi, her hücre grubunda HSP27'nin ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Deney protokolünde aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

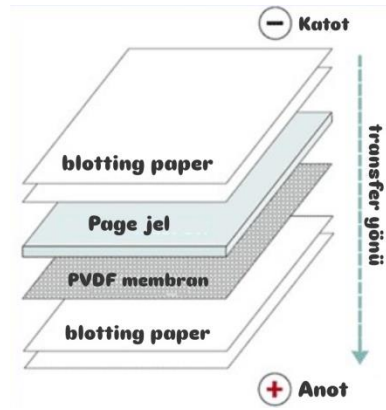
Hücre gruplarından elde edilen protein ekstraktlarının protein konsantrasyonları Bradford tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Bradford, 1976). Protein tayin işlemlerinde 1,4 mg/mL BSA çözeltisinden korelatif azalan konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır. Bir 96'lık plate kullanılarak her bir kuyucuğa standart çözeltilerden ve deney grubu protein ekstraktından 4'şer tekrarlı olacak şekilde 5'er µL eklenmiş, üzerilerine 250 µL coomassie brilliant blue reaktifi (Sigma, B9616) eklenerek pipetaj işleminden sonra 15 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildikten sonra 595 nm de absorbans değerleri okunmuştur.

Numunelerin hazırlanması;

Her örnek için her kuyucuğa 20-50 µg arasında protein aktarılmaktadır. Bir ependorf içinde 475 µL 2x Laemmli çözeltisi + 25 µL β-merkaptolanol hazırlanarak numunelerin denatürasyonunun kullanılacak olan numune boyama çözeltisi hazırlanmıştır. 1:1 olacak şekilde 20 µL numune boyama çözeltisi + 20 µL örnek eklenerek vorteksledikten sonra 95°C'de 5 dk denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Jel hazırlanırken TGX™ FastCast™ Akrilamid %12 (Biorad) kitinden faydalanılmıştır. Üreticinin protokolüne göre jel hazırlama basamakları takip edilmiştir. Hazırlanan jeller yürütme tamponu ile 80 voltta ön yürütme yapılarak tamponun jelin içine nüfuz etmesi için 10 dk boş bir şekilde sistem çalıştırılmıştır. Ardından boyanmış ve denatüre edilmiş protein numunelerinden her bir kuyucuğa 20 µL yüklenmiştir.

Yürütme işleminin ardından TGM içerisinde yıkama yapılan blotting paper, PVDF membran ve jelden aşağıda ki şekilde bir sandviç oluşturularak 7 dk 25 miliamper’de blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Western-blot protein transferi

Protein numunelerinin geçtiği PVDF membran hazırlanan blocking solüsyonu ile gece boyu muamele edilmiştir. Ertesi gün membran 3 kez 10 mL TBST ile 15 dk oda sıcaklığında, yıkama işlemine bırakılmıştır. Bu işlemin ardından %1,5’lik hazırlanan BSA’dan 10 mL alınarak 3 µL primer antikör eklenip pipetaj işleminin ardından 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama işlem basamakları tekrar edilmiş, ardından 10 mL TBST’de 2 µL sekonder antikör kullanılmıştır. 1,5 saatlik oda sıcaklığındaki inkübasyon süresinin ardından yıkama işlem basamakları tekrar edilmiş, son olarak 2 kez TBS ile 15’er dk yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan subtrat çözeltisi ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyonun ardından görüntüleme işlemi yapılmıştır.

3.2.1.11. Total antioksidan ve oksidan seviyeleri

Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) testleri, biyolojik bir numunede mevcut tüm antioksidan ve oksidan kapasitesini ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesinde rol oynayan

bileşiklerdir, buna karşın oksidanlar, reaktif moleküller olarak hücresel yapılara zarar vererek hastalık oluşumuna katkı sağlayabilir. Bu çalışma kapsamında TAS ve TOS aktivitelerinin belirlenmesi için Rel Assay Diagnostik tarafından üretilen ticari TAS-TOS Assay kitlerinden yararlanarak deney setinde belirtilen numunelerden ekstrakte edilen ve -80°C'de stoklanmış protein ekstraktaları kullanılmıştır.

TAS Analizleri, kit protokolüne uygun şekilde ve her bir numune için dört tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 96 kuyucuklu mikroplate'de her bir kuyucuğa numune, standart, ultra saf su, L1 ve L2'den 18 µL eklenmiştir.
- Ardından, her bir kuyucuğa 300 µL R1 eklenerek pipetajlanmıştır.
- 30 saniye oda sıcaklığında bekletilen plaka, 660 nm dalga boyunda ELISA cihazı ile okunmuştur.
- Devamında, her bir kuyucuğa 45 µL R2 eklenmiş ve tekrar pipetajlanmıştır.
- Plaka, 37°C' de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 660 nm'de yeniden okunmuştur.

TAS testi, numunedeki antioksidanların koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) radikalini renksiz ABTS formuna indirger. Bu reaksiyon, spektrofotometrik olarak 660 nm dalga boyunda ölçülür. Oluşan renk değişikliğinin yoğunluğu, numunedeki toplam antioksidan miktarı ile orantılıdır. Kalibrasyon için E vitamini analogu olan Trolox kullanılmış olup, sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L cinsinden ifade edilmiştir.

TOS Analizleri, kit protokolüne uygun şekilde ve her bir numune için dört tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 96 kuyucuklu mikroplate'de her bir kuyucuğa numune, standart, ultra saf su, L1 ve L2 olmak üzere 45 µL eklenmiştir.
- Her bir kuyucuğa 150 µL R1 eklenerek pipetleme işlemi uygulanmıştır.
- 30 saniye oda sıcaklığında bekletilen plaka, 530 nm dalga boyunda ELISA cihazı ile okuma yapılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 15 µL R2 eklenmiş ve tekrar pipetleme işlemi uygulanmıştır.

- Plaka, 37°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 530 nm'de yeniden okunmuştur.

TOS testi, numunedeki oksidan moleküllerin ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitleme kapasitesine dayanır. Ferrik iyonlar, asidik ortamda kromojen ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Numunedeki toplam oksidan miktarıyla orantılı olan bu kompleksin renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Kalibrasyon, hidrojen peroksit kullanılarak yapılmış ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L) cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.1.12. Malondialdehit tayini

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun bir ürünü olup oksidatif stres artışıyla birlikte düzeyi yükselen bir biyobelirteçtir. Bu nedenle, MDA düzeyinin ölçülmesi, oksidatif stres seviyesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Malondialdehit düzeyleri, spektrofotometrik analiz yöntemiyle belirlenmiştir (Khalil ve Salem, 1995). Uygulanan bu yöntemde, sıcak ve asidik bir ortamda tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren MDA renkli bir kompleks oluşturmaktadır. TBA-MDA kompleksinin 532 nm dalga boyundaki absorbanası, MDA konsantrasyonunun belirlenmesini sağlar.

Deney Prosedürü:

- %10'luk trikloroasetik asit (TCA) ve %0,675'lik tiobarbitürik asit (TBA) çözeltileri hazırlanmıştır.
- Numuneler ve köre 300 μL ddH₂O eklenmiştir.
- Her bir örnek kapaklı cam tüplere her birine 1500 μL %10'luk TCA eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- Tüpler, 90°C'de 15 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra tüpler buzlu suda soğutulmuş ve 3000 rpm'de 10 dk boyunca +4°C'de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrasında elde edilen süp ernetanttan 300 μL ayrı tüplere aktarılmıştır.
- Her bir tüpe 600 μL TBA çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- Tüpler, 90°C'de 15 dk boyunca su banyosunda inkübasyona bırakılmış ve pembe renk oluşumu gözlemlenmiştir.

- Ardından tüpler buzlu suda soğutularak 532 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür.

3.2.1.13. Demir seviyelerinin ölçümü

Hücre içi demirin homeostazisi, hücrelerdeki normal fizyolojik aktivitelerin sürdürülmesi için özellikle önemlidir. Bu aşamada, her bir hücre grubunda demir seviyelerinin belirlenmesini hedeflenmiştir. Demir ölçümü, Beckman Coulter analiz cihazında, fotometrik renk testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Yöntem ve Prensi:

Bu testte kromojen olarak 2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triazin (TPTZ) kullanılmıştır.

- Asidik ortamda transferine bağlı demir, serbest demir iyonlarına ayrılır ve askorbik asit yardımıyla üç değerlikli demir (Fe^{3+}), iki değerlikli demire (Fe^{2+}) indirgenir.
- Fe^{2+} , TPTZ ile reaksiyona girerek mavi renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 600/800 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek, toplam demir konsantrasyonu hesaplanır.
- Sonraki reaksiyonda askorbik asit verilmeden ortama sadece TPTZ verilerek sadece Fe^{2+} 'lerin Fe kompleksi oluşturulması sağlanarak toplam demir konsantrasyonun sadece Fe^{2+} 'nin oluşturduğu konsantrasyondan çıkarılarak Fe^{3+} miktarı elde edilmiştir.

Kullanılan Materyaller:

- Reaktifler:
 - R1: Glisin tampon (pH 1.7), 215 mmol/L
 - R2: L-askorbik asit, 4,7 mmol/L
 - TPTZ, 0,5 mmol/L

Test Prosedürü:

- Reaktifler, oda sıcaklığında kararlılığını koruyacak şekilde hazırlanmıştır.
- Analiz cihazında kalibrasyon, System Calibrator (Kat. No. 66300) kullanılarak yapılmıştır.
- Beckman Coulter analiz cihazı aracılığıyla numunelerin demir konsantrasyonları ölçülerek hesaplanmıştır.

3.2.1.14. GPx4 aktivite tayini

Yaklaşık 2×10^6 hücre her grup için (-K, +K ve 0,06, 0,12 ve 0,24 μM J2 uygulanan SH-SY5Y hücreleri) 24 saat inkübasyonun ardından tripsinizasyon yapıp kaldırılarak 10 dk, 1000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Tüm hücreler üç kez soğuk DPBS ile yıkanarak son santrifüjün ardından her biri 300 μL GPx4 analiz tamponunda (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,5 mM EDTA) resüspanse edilmiştir. Hücreler buz içerisinde sonikasyon ile homojenize edilerek ve 14000 $\times g$ 'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Numunelerden alınan süpernetantlar; GPx4 analiz tamponu içerisinde son konsantrasyonları, 0,25 mM NADPH ve 0,5 U/mL glutatyon redüktaz olacak şekilde hazırlanmış ve en son 30 mM tert-bütildihidroperoksit eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımındaki NADPH miktarı, 5 dk boyunca her 10 saniyede bir, 340 nm dalga boyunda absorbans ölçümüyle kinetik olarak belirlenmiştir (Yang vd., 2014; Friedmann Angeli vd., 2014).

3.2.1.15. Plazmid Transformasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

Transformasyon işlemlerinde, CaCl_2 metodu ile kimyasal transformasyona yetenekli hale getirilmiş *E.coli* BL21(DE3) kullanılmıştır. Buz üzerinde gerçekleştirilen kimyasal transformasyon işlemlerinde HSP27 genini içeren plazmid, BL21(DE3)'e aktarılmıştır. Buz üzerinde devam edilen işlemlerde kompetent hücrelere plazmit çözeltisinden 5 μL ilave edilmiş ve 30 dk süre ile inkübe edilmiştir. Hücreler 42°C 'ye ayarlanmış ısı bloğunda 60 saniye tutulmuş tekrar buz üzerinde 5 dk inkübe edilerek hücrelere ısı şoku uygulanarak plazmidlerin hücre içine girmeleri sağlanmıştır. Daha sonra 200 μL sıvı Luria-Bertani (LB) Miller (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L NaCl, 10 g/L pepton) besiyerine ilave edilen hücreler, 1 saat 37°C 'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücreler 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin içeren LB Miller agar petrilere yayma yöntemi ile farklı miktarlarda ekilmiştir. Petrilere 15 saat boyunca 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Seçilen farklı kolonilerden 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin içeren LB miller besiyerine ekim yapılarak 18 saat 37°C 225 *rpm*'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin ardından plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Plazmid izolasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Her bir kültür 13.000 $\times g$ 'de 1 dk santrifüjlenmiştir.

- Her peletin üzerine 200 µL resüspanسیون solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir.
- Elde edilen karışımın üzerine 200 µL lizis tamponu eklenerek 6-8 kez nazik bir şekilde alt üst edilmiştir. (Numuneler 5 dk dan fazla bekletilmemeye özen gösterildi).
- Her bir örneğin üzerine 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklenerek tekrar nazik bir şekilde 6-8 kez alt üst edilmiştir.
- Her bir örnek daha sonrasında 5 dk 13.000 *xg*'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernetant örnekleri JetSpin kolonlarına aktararak 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Sonraki basamakta 500 µL wash solüsyon eklenerek 1 dk santrifüj yapılarak süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- Tekrar 500 µL wash solüsyon ile yıkama yapılarak süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- 1 dk boş santrifüj yapılarak kolon solüsyondan uzaklaştırılmıştır.
- Yeni collection tüpler kullanılarak kolonlar yerleştirilmiştir.
- Her bir kolona 50 µL elüsyon solüsyonu eklenerek plazmit kolondan alınmıştır.

İzole edilen plazmidlerin her bir *ApaI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Elde edilen restriksiyon fragmanları, agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. Agaroz jel hazırlanırken, %1 oranında agaroz, (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) 1x TAE tampon çözeltisinde (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) çözündürülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiye 2µL/100 mL etidiyum bromür çözeltisi ilave edilmiştir. Marker olarak (M) GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

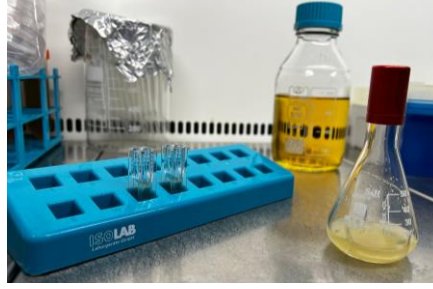
Bir sonra ki basamakta üreticinin protokolüne göre Qubit™ dsDNA Kantifikasyon Testi Kit kullanılarak Invitrogen Qubit Florometre ile DNA konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.2.1.16. HSP27 plazmitinin dondurularak stoklanması

Saflaştırılan rekombinant HSP27 plazmidi, ilgili genin klonlanmasından ve doğrulama aşamalarından sonra tekrar kullanılmak üzere %50 gliserol içeren bir kriyoprotektan solüsyonda -80°C'de dondurularak stoklanmıştır.

3.2.1.17. HSP27'nin üretimi ve saflaştırılması

Daha önceden -80°C'de saklanmış olan plazmit stoklarından bir miktar alınarak 100 µg/mL ampisilin içeren LB Miller sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim işlemi sonrasında 37°C'de, 18 saat boyunca, çalkalamalı inkübatör kullanılarak 225 rpm'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen bakteri kültüründen optik yoğunluk (OD) ölçümü yapılmış ve OD₆₀₀ değeri 0,1 olacak şekilde 2 L'lik erlenmayerlere inoküle edilmiştir.



Şekil 3. 5. Ekim işlemi sonrası OD₆₀₀ ölçümü

Transferden sonra, bakterilerin logaritmik faza ulaşmasını izlemek için kültürler 37°C'de 225 rpm'de inkübe edilmiş ve yaklaşık 45 dakika sonra OD₆₀₀ değeri yeniden ölçülmüştür. Bakteri yoğunluğunun OD₆₀₀ üzerinden 0,5-0,6 arasında bir değere ulaşmasıyla, hedef proteinin ekspresyonunu indüke etmek üzere izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozit (IPTG) eklenmiştir. IPTG indüksiyonunun etkinliğini ve en uygun indüksiyon zamanını belirlemek için, indüksiyon sonrası 0., 1., 2., 3. ve 4. saatlerde numuneler alınmıştır.

Her bir numune, santrifüj işlemi ile pelet haline getirilmiş ve elde edilen peletlere uygun miktarda lizis solüsyonu (1 M PBS, 2 M NaCl, 0,372 g KCl, %50 gliserol, 250 µL Triton X-100, 2 M İmidazol) eklenerek bakteriyel hücrelerin etkili bir şekilde parçalanması sağlanmıştır. Lizis işlemi sürdürülürken, homojenizasyon için sonikasyon uygulanmış ve bu işlem sonucunda protein içeriği analize uygun hale getirilmiştir.

Elde edilen numunelerin protein analizleri, SDS-PAGE yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve indüksiyon sürecinin hedef protein ekspresyonuna etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu analiz, protein bant yoğunluğuna dayalı olarak optimum indüksiyon zaman aralığının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

Belirlenen en uygun indüksiyon zaman aralığı sonrasında, proteinin yeterli miktarda üretimini sağlamak için daha büyük hacimli flasklar kullanılarak bakteriyel büyümeye devam edilmiştir. Protein saflaştırma sürecinin başlatılabilmesi için lizis solüsyonu ile muamele edilen hücre peletine uygun miktarda proteaz inhibitör kokteyli eklenmiştir. Bu işlem sonrasında, hücreler sonikatör kullanılarak buz üzerinde homojenize edilmiş, elde edilen lizat +4°C'de 10 dk boyunca 10.000 xg'de santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice steril bir falkona aktarılmıştır.

Rekombinant HSP27'nin saflaştırılması Ni-NTA kolon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, proteinin N-terminaline eklenen altı tane His Histidin amino asidinin eklenmesi ile Ni⁺⁺ iyonuna afinitisinin kullanılması esasına dayanmaktadır. İlk olarak hücre ekstraktları 1:1 oranında dengeleme solüsyonu (10x PBS, 2 M imidazol) ile karıştırılarak kromatografi kolonu üzerine yüklenmiştir. Öncesinde, yüklenen örnekten SDS-PAGE analizi için uygun miktarda numune ayrılmış ve ayrıca flow-through fraksiyonları toplanarak kolon üzerinden iki kez daha geçirilmiştir.

Kolon yıkama aşamasında, 20 mM ve 100 mM imidazol içeren farklı konsantrasyonlarda yıkama solüsyonları (wash buffer) uygulanmış ve non-spesifik proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından, proteinin saf olarak elde edilmesini sağlamak için 100 mM, 200 mM, 400 mM imidazol içeren farklı konsantrasyonlarda elüyon solüsyonları kullanılmış ve bu süreçte hedef proteinin hangi elüyon fraksiyonlarında yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir. Toplanan elüyon fraksiyonlarının protein konsantrasyonları ve SDS-PAGE ile analizi gerçekleştirilerek saf protein verimi ve kalitesi değerlendirilmiştir.

3.2.1.18. Lüsiferaz konformasyonel değişim tayini

Lüsiferaz enziminin lüminesans sinyal yoğunluğu, doğru katlanmış konformasyon ve agregasyon durumlarındaki değişiklikleri temel alan bir yöntemle incelenmiştir (Mymrikov vd., 2017). Bu çalışmada, lüsiferaz 6 M üre çözeltisi (25 mM HEPES, pH 7.4), oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Ardından, uygun miktarda alınan denatüre lüsiferaz üzerine 50 µM Lüsiferin, 50 mM KCl, 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT ve 2 mM ATP ilave edilerek aktivite tayin çözeltisi hazırlanmıştır.

Deney kapsamında, örneklerdeki HSP27 aktivitesinin ölçüm aralığının altında kalmasından dolayı eşik değerinin üzerine çıkması için, her deney grubuna ait protein ekstraktlarına 1 µM olacak şekilde HSP27 ilave edilerek örnek çözeltisi hazırlanmıştır (Karademir ve Özgür, 2023).

Hazırlanan örnekler aktivite tayin çözeltisi ilave edilerek; lüsiferaz eklenmemiş negatif kontrol ve denatüre edilmemiş lüsiferaz ilave edilerek hazırlanmış pozitif kontrole göre lüsiferinin oksilüsiferine dönüşme miktarı belirlenerek yüzdece şperon kabiliyeti lüminometre yardımıyla test edilmiştir.

3.2.1.19. İstatistiksel hesaplamalar

Gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, hedef genin ekspresyon düzeylerini referans (housekeeping) gene göre normalize ederek, iki farklı örnek arasındaki göreceli gen ekspresyon farkını belirlemek için kullanılmıştır. Bu çalışmada, ikincil normalizasyon işlemi *GADPH* geninin referans gen olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiş ve bu yöntemle *BAX*, *BCL-2* ve *CASP3* genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

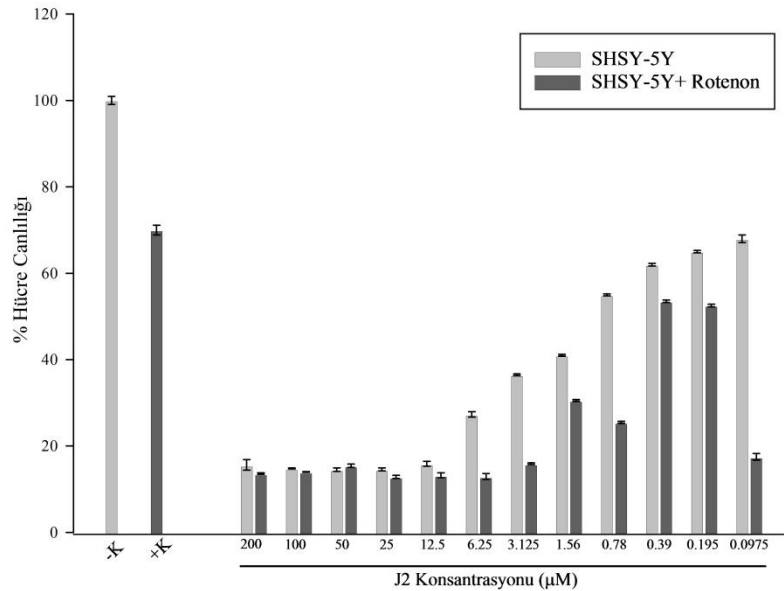
İstatistiksel analizler, SPSS 22.0 yazılımı aracılığıyla yapılmıştır. Verilerin ortalama ve standart sapma değerleri tanımlayıcı istatistikler kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) testi uygulanmıştır. Analiz sonuçlarında anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez kapsamında HSP27 inhibitörü olarak bilinen J2 molekülü, SH-SY5Y hücre hattında ve bu hattan oluşturulan Parkinson modeli hücrelerde farklı konsantrasyonlar da denenerek bu gruplar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Aynı zaman da HSP27 rekombinant olarak *E.coli* BL21(DE3) de üretilmiş ve saflaştırılarak aktivite ölçümünde kullanılmıştır.

4.1. MTT Canlılık Testi

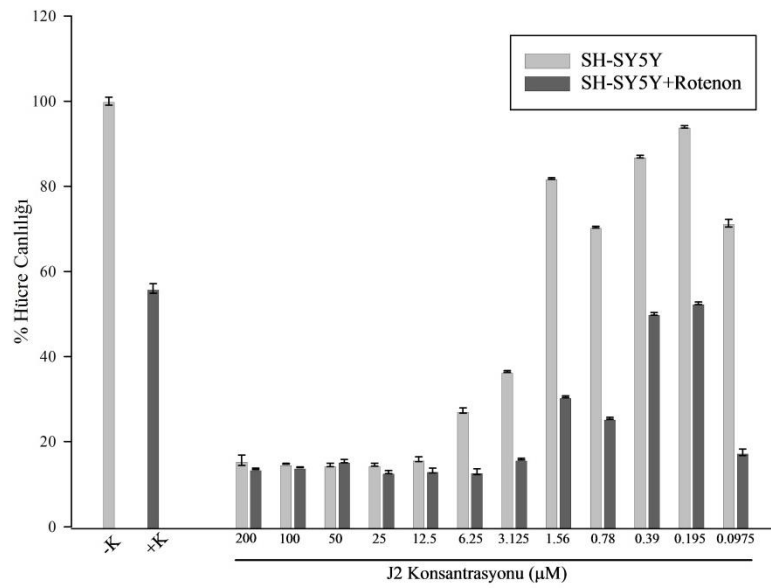
SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri (negatif kontrol) ve bu hücrelerden oluşturulan Parkinson hastalığı modeli hücreler (pozitif kontrol) üzerinde J2 molekülünün farklı konsantrasyonlardaki etkilerini incelemek üzere MTT testi uygulanmıştır. Bu test ile J2 molekülünün zaman ve konsantrasyona bağlı olarak ortaya koyduğu sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Deneyler, 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca 200-100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,78-0,39-0,19-0,0975 μM konsantrasyonlarında J2 molekülü uygulanarak yürütülmüş ve her bir grup için üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımla, J2 molekülünün hücre canlılık üzerindeki etkileri kantitatif olarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.1., 4.2., 4.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.1. J2 molekülünün deney grupları üzerindeki 12. saat MTT canlılık testi sonuçları

Şekiller incelendiğinde, SH-SY5Y hücre hattında J2 molekülünün 25 µM ve üzeri konsantrasyonlarında hücre canlılığını ciddi şekilde azalttığını ve diğer dozlarda ise canlılık oranlarında anlamlı artışlar gözlemlendiğini göstermektedir. Özellikle 0,195 µM ve 0,0975 µM dozlarında canlılık oranlarının %110,08 ve %121,76 seviyelerine ulaşmıştır.

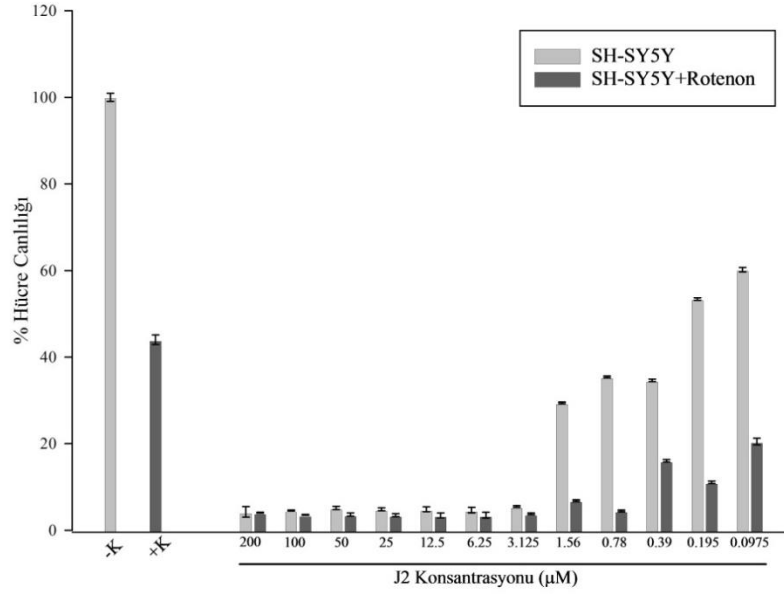
J2 molekülünün Parkinson modeli oluşturulmuş hücrelerde de 6,25 µM ve üzeri dozlarında da canlılık oranlarını düşürdüğü görülmektedir. Diğer dozlarda canlılık oranlarında artışlar gözlenmiş olup, özellikle 0,39 µM ve 0,195 µM dozlarında canlılık oranlarını anlamlı bir şekilde arttırmaktadır.



Şekil 4.2. J2 molekülünün deney grupları üzerindeki 24. saat MTT canlılık testi sonuçları

24. saat diliminde SH-SY5Y hücre hattında J2 molekülü 200, 100, 50 ve 25 µM gibi yüksek konsantrasyonlarında hücre canlılığını daha da azalttığı görülmektedir. Bu konsantrasyonlarda canlılık oranları %10 ve altına düşerken, orta ve düşük dozlarda canlılık oranlarında artışlar gözlenmiştir.

24. saat diliminde J2 molekülünün Parkinson modeli oluşturulmuş hücrelerde yüksek dozlarda (200, 100, 50, 25, 12,50 ve 6,25 µM) hücre canlılığını ciddi şekilde azalttığını göstermektedir. Orta ve düşük dozlarda (3,125 µM ve altı) canlılık oranlarında artışlar kaydedilmiş olup, özellikle 0,195 µM ve 0,0975 µM dozlarında letal etkisi kısıtlı olmuştur.



Şekil 4.3. J2 molekülünün deney grupları üzerindeki 48. saat MTT canlılık testi

SH-SY5Y hücre hattında ve Parkinson modeli oluşturulmuş hücrelerde de 48 saatlik inkübasyon süresinde ise J2 molekülünün 200, 100, 50, 25, 12,50, 6,25 ve 3,125 µM dozlarında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığını göstermektedir. 1,56 µM ve üstü dozlarda canlılık oranlarında artışlar gözlenmiş olup, özellikle en düşük dozda hücre canlılık seviyelerinin arttığı görülmektedir.

4.2. Apoptotik Gen ve Protein Düzeylerinin RT-qPCR ve ELISA ile Belirlenmesi

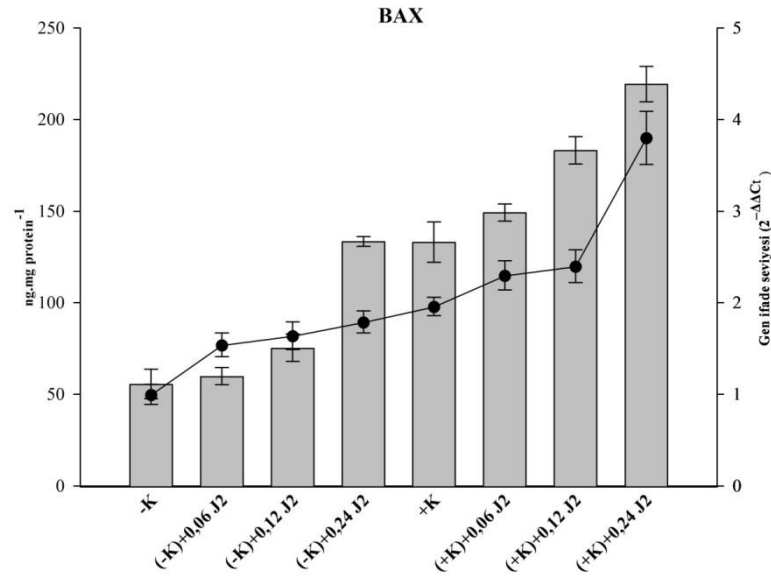
HSP27 inhibitörü J2 molekülünün apoptotik ve anti-apoptotik gen ve protein ifade düzeyleri üzerindeki etkisi *BAX*, *BCL-2* ve *CASP3* düzeylerinin RT-qPCR ve ELISA yöntemi aracılığıyla ölçülerek değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, negatif kontrol (-K), pozitif kontrol (+K) ve farklı konsantrasyonlardaki J2 uygulamaları için Şekil 4.4., 4.5., 4.6.'da gösterilmektedir.

BAX, apoptotik yolda görev alan pro-apoptotik bir proteindir. ELISA sonuçlarına göre:

- BAX düzeyleri (-K) grubunda 55,69 ng.mg⁻¹ protein ölçülürken, J2'nin artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla birlikte BAX düzeylerindeki artış konsantrasyon sırasına göre %7,74, %35,43 ve %139,77 olarak kaydedilmiştir. Özellikle en yüksek konsantrasyon olan 0,24 µM J2 konsantrasyonunda anlamlı bir

yükselme gözlemlenmiştir. 133,18 ng.mg⁻¹ protein ölçülen (+K) grubunda ise BAX seviyesinin (-K)'ya kıyasla oldukça yüksek olduğu ve J2'nin artan konsantrasyonlarda uygulanması ile doz bağımlı olarak sırayla %12,12, %37,61 ve %64,72 oranlarında artış kaydedilmiştir.

- RT-qPCR verileri incelendiğinde ELISA sonuçlarını destekler nitelikte olduğu görülmektedir. BAX gen ifade düzeyleri (-K) grubu referans olarak alındığında, J2'nin artan konsantrasyonlar da uygulanmasıyla birlikte ifade düzeylerinde artış sırasıyla %54, %64 ve %79 olarak kaydedilmiştir. (+K) grubunda ise 1,96 birim ölçülürken, J2'nin artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla doza bağımlı olarak gruplarda BAX gen ifade düzeylerinin %17,35, %22,45 ve %93,88 oranında artışlar kaydedildiği görülmektedir.



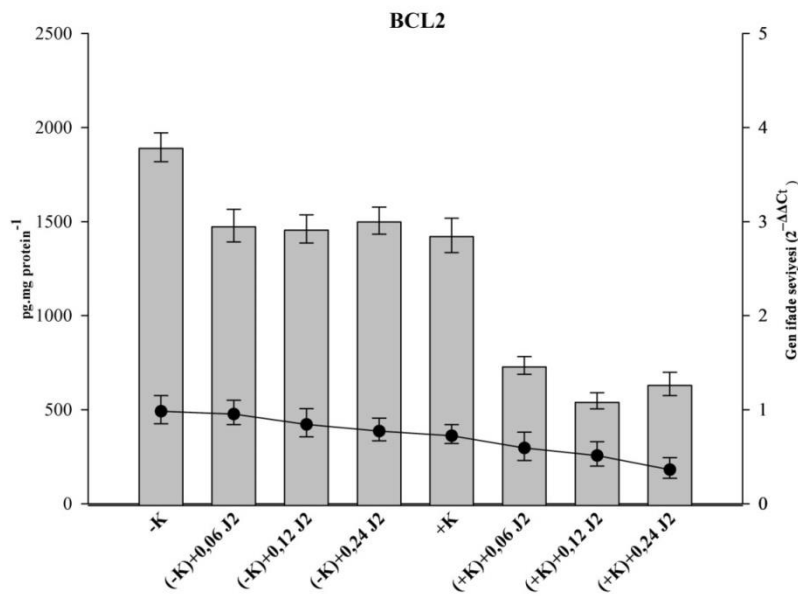
Şekil 4.4. Deney gruplarının BAX protein seviyeleri

BCL-2, anti-apoptotik özelliklere sahip bir proteindir. ELISA sonuçlarına göre:

- BCL-2 protein düzeyleri (-K) grubunda 1895,95 ng.mg⁻¹ protein kaydedilirken J2'nin artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla birlikte sırasıyla %21,99, %22,90 ve %20,60 oranında azalmalar meydana geldiği fakat anlamlı farklılıklar içermediği görülmektedir. (+K) grubunda ise BCL-2 protein ifade düzeyi 1427,06 ng.mg⁻¹ protein ölçülmüştür. (+K) grubu, J2 uygulanan (-K) grubuyla eş değer bir seviyede olup

J2'nin artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla birlikte belirgin bir şekilde sırasıyla %48,50, %61,67 ve %55,36 oranında azalmalar kaydedilmiştir.

- RT-qPCR verileri ELISA sonuçlarını destekler niteliktedir. *BCL-2* gen ifade düzeyleri, ELISA sonuçlarına paralel şekilde, (-K) grubu referans olarak alındığında J2 uygulamasıyla artan konsantrasyonlarda sırasıyla %3, %14 ve %21 oranında azalma eğiliminde olduğu, (+K) grubunda normalize değerden daha düşük bir değer kaydedildiği ve J2'nin uygulanması ile %17, %28,38 ve %48,65 oranlarında azalma eğilimi göstermektedir.

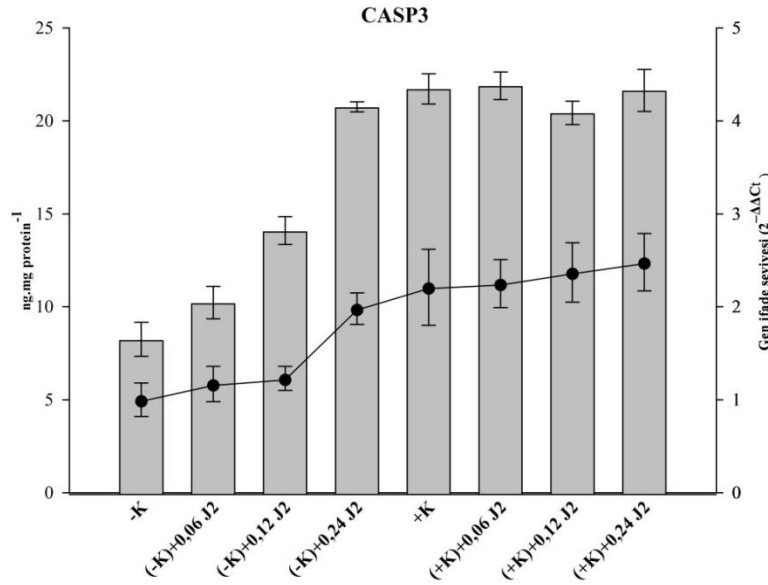


Şekil 4.5. Deney gruplarının BCL-2 protein seviyeleri

CASP3, apoptotik hücre ölümünde rol oynayan bir efektör kaspazdır. ELISA sonuçlarına bakıldığında;

- CAPS3 protein düzeyleri (-K) grubunda 8,25 ng.mg⁻¹ protein seviyelerde ifade edilirken, J2'nin artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla birlikte CASP3 düzeylerinde yüzdece artış sırasıyla şöyledir; %23,99, %70,96 ve %151,63. (+K) grubunda bu seviye 21,73 ng.mg⁻¹ protein olarak ölçülürken J2 molekülünün uygulanması ile birlikte sırasıyla %0,76 artma, %5,95 ve %0,38 azalmalar şekilde olduğu fakat anlamlı farklılıklar göstermediği ve genel olarak yüksek seviyelerde ifade edildiği gözlemlenmektedir.

- RT-qPCR verileri, *CASP3* gen ifade düzeylerine paralel şekilde ELISA sonuçlarını destekler niteliktedir. (-K) gen ifade düzeyi referans olarak alındığında bu gruba artan konsantrasyonlarda uygulanan J2'nin yüzde artışları şu şekildedir; %17, %23 ve %98. (+K) grubunda bu seviye 2,21 birim ölçülürken, (+K) grubuna J2'nin uygulanmasıyla *CASP3* gen ifade düzeyleri %1,81, %7,24 ve %12,22 oranlarında artış meydana geldiği kaydedilmiştir.



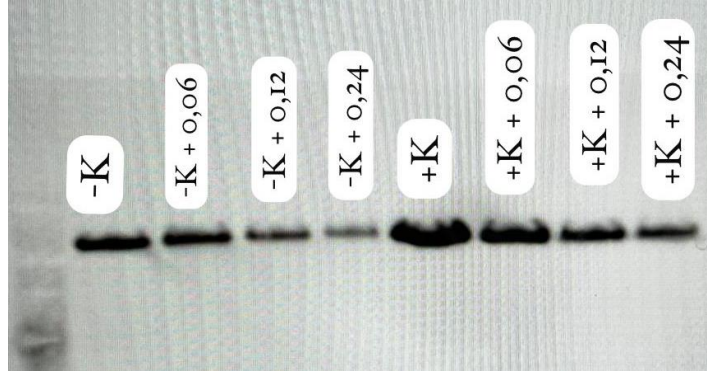
Şekil 4.6. Deney gruplarının CASP3 protein seviyeleri

Bu sonuçlar, J2 uygulamasının *CASP3* gen seviyelerini özellikle negatif kontrol koşullarında doza bağlı olarak artırdığını göstermektedir. Pozitif kontrol grubunda *CASP3* gen seviyelerinin zaten yüksek olduğu ve 0,06 ve 0,12 μ M dozunda uygulanan J2 konsantrasyonlarında bu seviyenin anlamlı bir şekilde değişmediği görülmektedir. Bu durum, J2'nin apoptotik hücre ölümü sürecinde etkili olduğunu göstermektedir.

4.3. HSP27 Seviyelerinin Western-blot ile Belirlenmesi

SH-SY5Y hücre hattı ve bu hücre hattından oluşturulan Parkinson modeli üzerinde denenen J2 maddesinin her bir konsantrasyonu *HSP27* genindeki etkisini protein ifade düzeyinde belirleyebilmek için her bir hücre grubundan eşit miktarda protein ekstratları alınarak kullanılmıştır.

(-K)'da ki bant yoğunluğu referans olarak alındığında (-K)'ya uygulanan J2'nin farklı konsantrasyonlarındaki artışın giderek bant yoğunluklarında azalmalara neden olduğu gözlemlenmektedir. Aynı şekilde pozitif kontrol değerlendirildiğinde (+K)'da ki bant yoğunluğu (-K)'ya göre oldukça kalın ve yoğun olduğu ayrıca J2'nin artan konsantrasyonlar uygulanması ile bant yoğunluklarının giderek azaldığı görülmektedir.

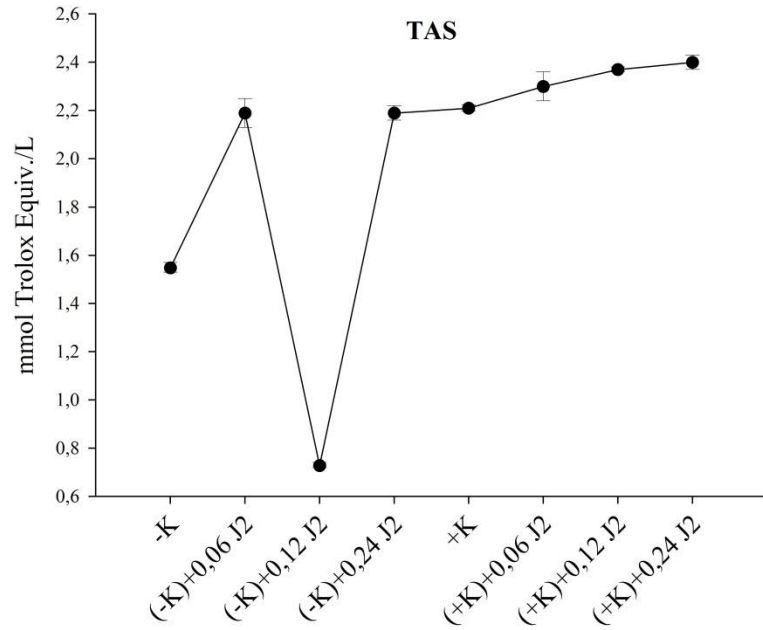


Şekil 4.7. Deney gruplarında HSP27'nin Western-blot analizi

4.4. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Hücrelerde oluşan oksidan-antioksidan dengesi, TAS ve TOS ELISA kitleri aracılığıyla hücre homojenatları üzerinde uygulanarak aşağıdaki grafiklerde de sonuçlar değerlendirilmiştir. İlk aşamada (-K) ve (+K) gruplarına farklı konsantrasyonlarda (0,06; 0,12 ve 0,24 μM) HSP27 inhibitörü J2 molekülünün uygulanarak toplam antioksidan kapasitesi (TAS) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Negatif kontrol grubunda TAS değeri 1,55 mmol Trolox Equiv/L olarak kaydedilmiştir. Aynı gruba 0,06 μM J2'de %41,29 artış, 0,12 μM J2'de %52,84 azalma ve 0,24 μM J2'de %41,29 artış gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubunda TAS değeri mmol Trolox Equiv/L olarak ölçülmüştür. Bu grupta J2 uygulamasının doz artışına bağlı olarak TAS değerlerinde kademeli bir artış gözlenmiştir: 0,06 μM J2'de 2,3 mmol Trolox Equiv/L (%4,07), 0,12 μM J2'de 2,37 (%7,24) ve 0,24 μM J2 uygulamasında 2,4 mmol Trolox Equiv/L (%8,60) düzeyine ulaşmıştır. Bu sonuçlar, pozitif kontrol koşulları altında J2 molekülünün antioksidan kapasiteyi doza bağlı olarak arttırdığına işaret etmektedir.

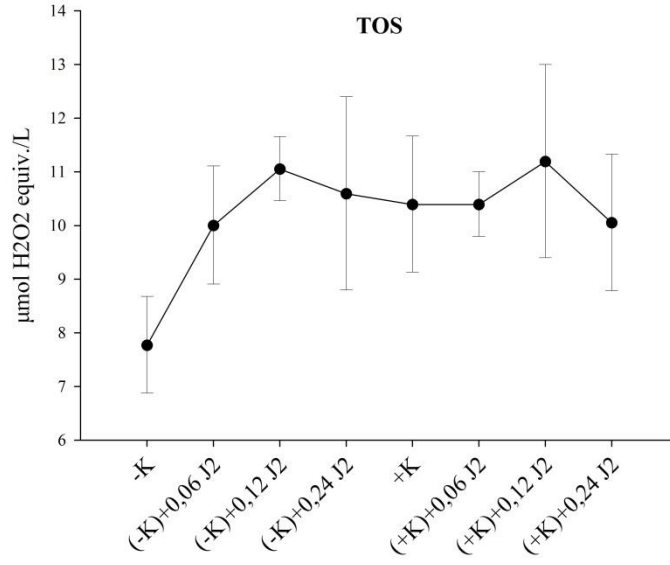


Şekil 4.8. Deney gruplarında ki toplam antioksidan seviyeleri

TOS verileri dikkate alındığında, (-K) ve (+K) gruplarına farklı konsantrasyonlarda (0,06; 0,12 ve 0,24 μ M) HSP27 inhibitörü J2 molekülü uygulanarak toplam oksidan seviyeleri incelenmiştir.

Negatif kontrol grubu hücrelerinde ölçülen değer 7,78 mmol Trolox Equiv/L iken, 0,06 μ M J2 uygulandığında bu değer %28,66 artışla 10,01 birime ve 0,12 μ M J2'de ölçülen oksidan seviyesi %42,16 artışla 11,06 mmol Trolox Equiv/L değerine yükselmektedir. 0,24 μ M J2 uygulanmasında 10,60 mmol Trolox Equiv/L düzeyine gerilediği ve %36,25 bir düşüş kaydedilmiştir. Bu gözlem, (-K) grubunda J2 dozunun artışıyla genel olarak yükselen bir oksidan profili oluşturmasının yanı sıra 0,12 μ M dozunda zirve değere ulaştığı ve son dozda kısmen gerileme yaşandığını göstermektedir.

Pozitif kontrol grubunda toplam oksidan seviyesi 10,40 mmol Trolox Equiv/L olarak ölçülmektedir. 0,06 μ M J2 uygulandığında değişim göstermeyerek yine 10,40 mmol Trolox Equiv/L olarak saptanmıştır. Buna karşılık 0,12 μ M J2 uygulamasında oksidan seviyesi %7,69'luk bir değerle 11,20 mmol Trolox Equiv/L düzeyine yükselirken, 0,24 μ M J2'de %3,27'lik bir düşüşle tekrar 10,06 mmol Trolox Equiv/L gerilemiştir. Dolayısıyla pozitif kontrol koşullarında da J2, belli bir doza kadar oksidan seviyelerini arttırırken en yüksek doza ulaşıldığında toplam oksidan düzeyinin bir miktar düştüğü gözlemlenmektedir.



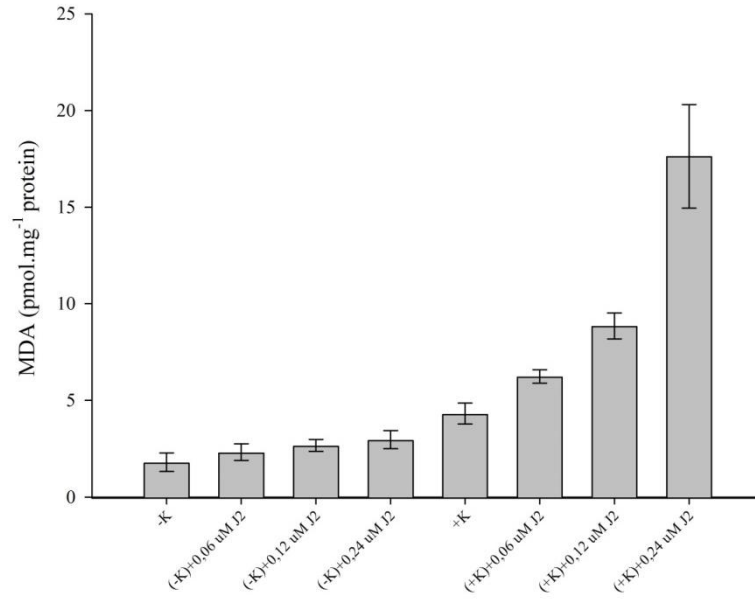
Şekil 4.9. Deney gruplarında ki toplam oksidan seviyeleri

4.5. MDA Tayini

Negatif ve pozitif kontrol gruplarına farklı konsantrasyonlarda (0,06, 0,12 ve 0,24 µM) HSP27 inhibitörü J2 molekülü 24 saat boyunca uygulanarak lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA seviyeleri incelenmiştir.

Negatif kontrol grubu hücrelerinde MDA miktarı 1,8 pmol/mg protein düzeyinde iken, 0,06 µM J2'de bu değer %29,17'lik bir artışla 2,325'e, 0,12 µM J2'de %48,5'lik bir artışla 2,673'e ve 0,24 µM J2 dozunda ise %65'lik bir artışla 2,970 pmol/mg seviyelerine yükselmiştir.

Öte yandan, pozitif kontrol grubundaki hücrelerde 4,316 pmol/mg protein olarak ölçülen MDA seviyesi, 0,06 µM J2 dozunda 6,24 nmol/mg ile % 44,58'lik bir artış, 0,12 µM'da 8,85 pmol/mg ile % 105,05 ve 0,24 µM J2 dozunda ise 17,632 pmol/mg ile %308'lik bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar, J2 konsantrasyonundaki artışla birlikte hücrelerde lipid peroksidasyonunun belirgin şekilde yükseldiğini göstermektedir.

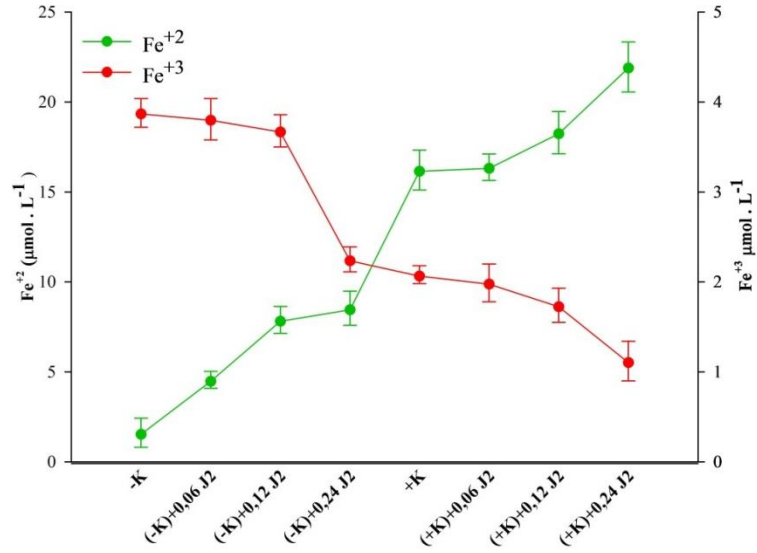


Şekil 4.10. Deney gruplarında belirlenen MDA miktarları

4.6. Demir Seviyelerinin Ölçümü

J2 molekülünün demir bağımlı ferroptozis üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücre gruplarındaki demir seviyeleri ölçülmüştür.

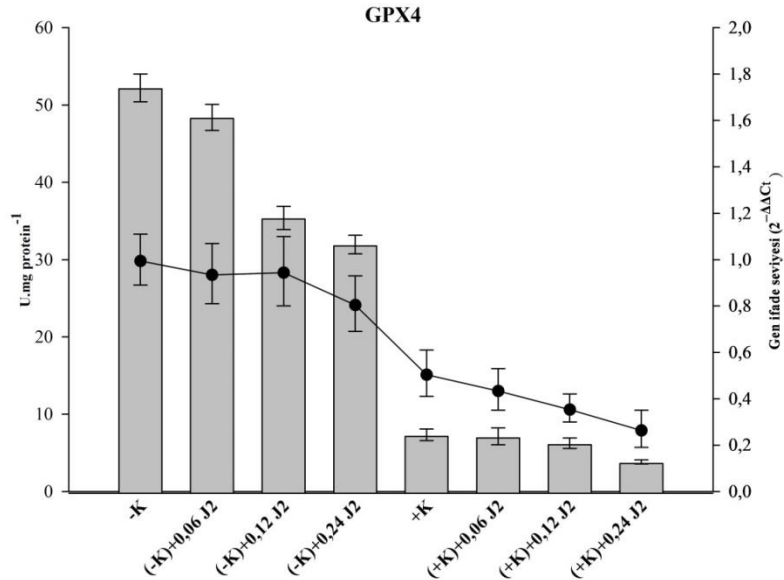
Veriler incelendiğinde; Fe⁺² seviyeleri (-K)'da 1,62 µmol/L iken, J2 uygulanması ile artan doz miktarına bağımlı olarak sırasıyla 4,56 µmol/L, 7,89 µmol/L, 8,53 µmol/L birimlik artışlar göstermiştir. Parkinson modeli (+K)'da 16,22 µmol/L Fe⁺² seviyesi ölçülürken, J2'nin uygulanmasıyla elde edilen veriler sırasıyla şöyledir; 16,38 µmol/L, 18,3 µmol/L, 21,95 µmol/L. Buna karşılık, Fe⁺³ seviyeleri (-K) grubunda 3,88 µmol/L olarak ölçülürken, artan konsantrasyonlarda J2 uygulanması ile sonuçlarda %1,8, %5,15, %42,01'lik azalmalar kaydedilmiştir. Parkinson modeli gruplarında ise Fe⁺³ seviyeleri SH-SY5Y gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. (+K) grubunda bu değer 2,08 µmol/L olarak ölçülürken, J2 molekülünün artan dozlarda uygulanması ile %4,33, %16,35, %46,15'lik düşüşler de artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. Deney gruplarında belirlenen demir miktarları

4.7. GPx4'ün Gen ve Spesifik Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

Ferroptozun biyobelirteçlerinden biri olan GPx4 miktarlarının analizleri SH-SY5Y hücre gruplarında ve Parkinson modeli oluşturulmuş gruplarda RT-qPCR ve ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. (-K) ve (+K) grupları karşılaştırıldığında GPx4 seviyelerinde belirgin bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12.).

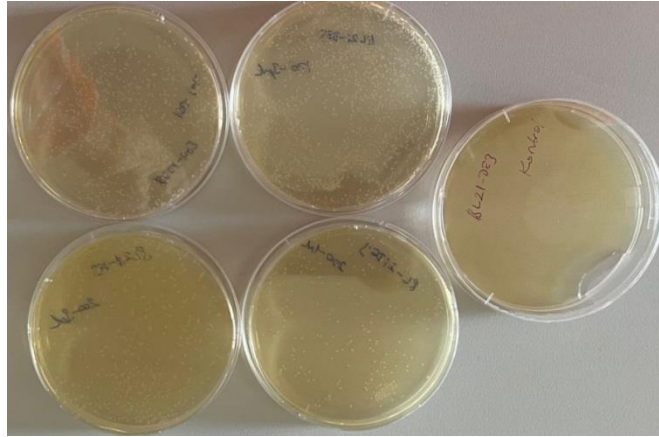


Şekil 4.12. Deney gruplarında belirlenen GPx4'ün gen ve protein ifade düzeyleri

GPx4 spesifik aktivitesinin J2 molekülü uygulanan gruplarda doza bağımlı olarak azaldığı gözlemlenmektedir. (-K) gruplarında sırasıyla 52,21 U/mg protein, 48,39 U/mg protein, 35,4 ng/mL, 31,95 U/mg protein olarak kaydedilirken; (+K) gruplarında bu değerler sırasıyla 7,33 U/mg protein, 7,14 U/mg protein, 6,26 U/mg protein, 3,83 U/mg protein olarak kaydedilmiştir. Özellikle (-K)+0,24 μ M J2 ve (+K)+0,24 μ M J2 gruplarında GPx4ün spesifik aktivitesien düşük seviyeye ulaşmıştır. Aktivite düzeylerine paralel olan *GPx4* gen ifade düzeyleri de bu verileri destekler niteliktedir. Bu sonuçlar, J2'nin *GPx4* gen ifade düzeyleri üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.

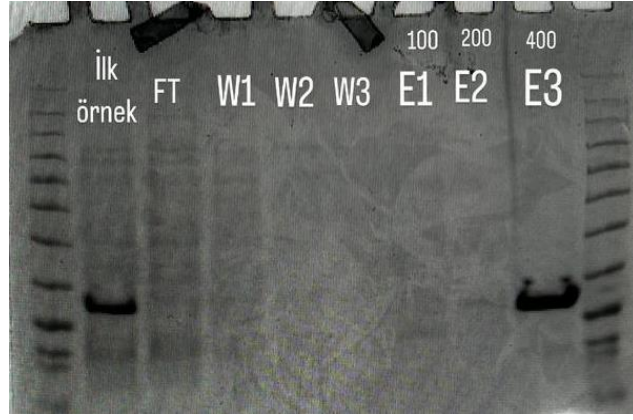
4.8. Rekombinant HSP27'nin Üretimi ve Saflaştırılması

Plazmid, CaCl₂ metodu ile kimyasal transformasyona yetenekli hale getirilmiş *E.coli* BL21(DE3) suşuna başarıyla aktarıldıktan sonra uygulanan protokoldeki gibi uygun şartlarda hücrelerin büyümesi sağlanmıştır.



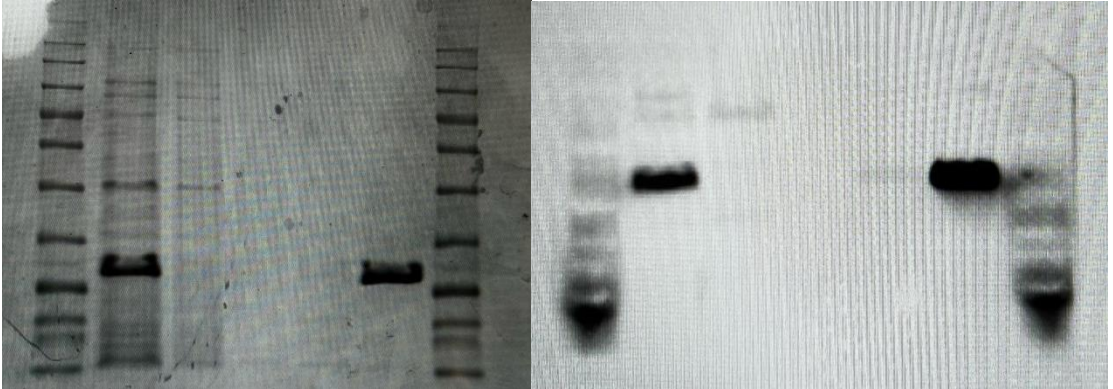
Şekil 4.13. Ampisilin içeren LB agar besiyerinde *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin gelişimi

E.coli BL21(DE3) suşunda 1 mM IPTG ile 1 saat indüklenecek elde edilen hücreler toplanarak lizis işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma basamağında en iyi fraksiyonu belirleyebilmek adına 100-200-400 mM imidazol içeren farklı konsantrasyonlarda elüsyon solüsyonları kullanılmıştır.



Şekil 4.14. HSP27'nin saflaştırma adımlarının SDS-PAGE analizi (FT: flowthrough, W1-W2-W3: Yıkama, E1-E2-E3; Elüsyon).

Saflaştırma işleminin etkinliğini ve proteinin saflığını değerlendirmek amacıyla, elüe edilen fraksiyonlar SDS-PAGE analiziyle incelenmiştir. Analiz sonuçları, 400 mM imidazol içeren elüsyon solüsyonundan elde edilen rekombinant HSP27'nin moleküler ağırlığına uygun tek bir bantın varlığını göstererek, saflaştırma işleminin başarılı olduğunu teyit etmiştir.

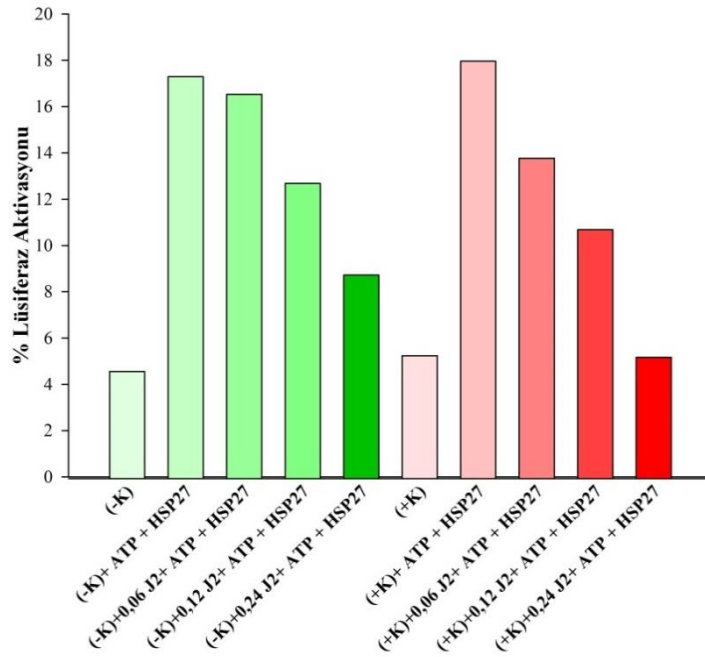


Şekil 4.15. Rekombinant olarak üretilen HSP27'nin SDS-PAGE ve Western-blot görüntüleri

HSP27'nin SDS-PAGE analizine göre, induksiyon sonrası toplam protein ekstraktında yaklaşık 27 kDa moleküler ağırlığa sahip bir bant gözlemlenmiştir. Bu bant, HSP27 proteini ile uyumlu bulunmuştur. Western-blot analizlerinde de His-Tag'a özgü antikor kullanılarak proteinin başarılı bir şekilde eksprese edildiği doğrulanmıştır.

4.9. Lüsiferaz Aktivite Tayini

Deneyleerde, (-K) ve (+K) gruplarında ATP varlığında HSP27'nin lüsiferaz aktivitesinin arttığı fakat J2'nin artan konsantrasyonlar da uygulanmasıyla lüsiferaz aktivitesinde doza bağımlı (-K) grubunda %4,41, %26,56, %49,39; (+K) grubunda ise %23,24, %40,35, %70,95 oranında düşüşlerin görüldüğü kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar, J2'nin HSP27 ile ilişkili hücrel mekanizmalar üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olabileceğini doğrular niteliktedir.



Şekil 4.16. Dene gruplarında lüsiferaz aktivite tayini

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

HSP27 inhibitörü olan J2 molekülünün dopaminerjik SH-SY5Y ve rotenon uygulanarak Parkinson modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücreleri üzerindeki doz-zaman ilişkili etkileri tez kapsamında ortaya koyulmaktadır.

Negatif ve pozitif kontrol üzerinde farklı konsantrasyonlarda denenen J2 molekülünden elde edilen MTT hücre canlılık analizi bulgularına göre bu molekülün metabolik etkileri, ferroptozis ve apoptoz yolları üzerinden irdelenmiştir.

MTT verilerine göre hücre grupları üzerinde IC₅₀ değerleri 0,12 µM olarak belirlenmiş olup çalışma boyunca anlamlı bir kıyaslama yapabilmek için bu değerin alt ve üst konsantrasyon dozları da (0,06, 0,12, 0,24 µM) dahil edilerek aynı parametreler ile çalışılmıştır. Her bir hücre grubuna belirlenen dozlarda uygulamalar yapılmış ve bu uygulamalar sonucunda hücrenin membran izolasyonu, protein ekstraksiyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

BAX ve *BCL-2* gen ve protein seviyelerine dair bulgulara bakıldığında, J2'nin apoptotik yolağı doza bağımlı olarak aktive ettiği gözlemlenmektedir. *BAX* seviyelerinde gözlenen artış, J2'nin hem negatif hem de pozitif kontrol gruplarında apoptotik mekanizmaları desteklediğine işaret etmektedir. Anti-apoptotik bir protein olan *BCL-2*'nin seviyelerindeki belirgin düşüş, apoptotik mekanizmaların aktivasyonuna yol açarak J2'nin intrinsek yolağı etkilediğini doğrulamaktadır ki yapılan çalışmalarda *BAX*'in anormal seviyelerdeki artışı ve bunu takiben *BCL-2* seviyelerindeki azalmaların nöronal ölüme yol açtığı bildirilmektedir (Adams ve Cory, 1998, Blandini vd., 2003; Tatton, 2000). J2 molekülünün artan konsantrasyonlarda *CASP3* aktivasyonunu up-regüle etmesi ve bu molekülün neden olduğu reaktif oksijen türlerinin hücrel apoptoz mekanizmalarını tetikleyerek aktive ettiğini destekler niteliktedir (Higuch vd., 1998; Porter ve Jänicke, 1999). Yüksek dozlarda görülen apoptotik etkilerin daha belirgin hale gelmesi, J2'nin nörodejeneratif hastalıklarda ya da bu hastalığa yatkınlığı olan bireylerde tedavide kullanımının kontrollü bir şekilde planlanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Western-blot analizi görüntüleri, J2 molekülünün HSP27 üzerindeki baskılayıcı etkilerini net bir şekilde göstermektedir. Negatif kontrol grubunda, HSP27'nin referans alınarak

değerlendirilmesi göz önüne alındığında, J2 molekülünün artan konsantrasyonlarının uygulanmasıyla birlikte bu ekspresyonun anlamlı şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu azalma, J2'nin HSP27 ekspresyonunu transkripsiyonel veya post-translasyonel seviyede baskıladığını veya proteinin yıkımını hızlandırdığını göstermektedir (Hwang vd., 2017; Karademir ve Özgür, 2023). Pozitif kontrol gruplarında rotenonun neden olduğu hücrel stresin HSP27 seviyelerinde artışa yol açması beklenirken, J2'nin bu artışı baskılaması, molekülün strese aracılık eden yollar üzerindeki inhibitör etkisini destekler niteliktedir. Rotenonun, oksidatif stres aracılığıyla mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu ve bu stres yanıtının HSP27 ekspresyonunda artışı tetiklediği literatürde yaygın olarak bildirilmektedir (Sherer vd., 2002; Xiong vd., 2012; Rajesh vd., 2014). Ancak, J2 molekülünün rotenon etkisi altındaki hücrelerde HSP27 seviyelerini belirgin şekilde azaltması, J2'nin HSP27'nin koruyucu etkilerini baskılayarak hücreleri daha savunmasız hale getirebileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, nörodejeneratif hastalıklarda J2 molekülünün apoptoz ya da ferroptosis gibi hücrel ölüm mekanizmalarını aktive edebileceğine dair önemli kanıtlar sunmaktadır.

TAS ve TOS verilerine göre hücre grupları arasındaki dalgalı seyir, J2 molekülünün farklı dozlarının hücrelerin oksidan-antioksidan yanıtını lineer bir biçimde etkileyebileceğini göstermektedir. Dozlarda kaydedilen bu farklılıklar, hücrelerin J2'ye karşı verdiği yanıtın kompleks ve doza bağlı bir dinamik izlediğini göstermektedir. TAS verileri dikkate alındığında pozitif kontrol grubundaki istikrarlı artış hücrelerin hâlihazırda içinde bulunduğu stres durumunun, J2 molekülünün de etkisiyle daha öngörülebilir bir şekilde artırabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular göz önüne alındığında bu molekülün doz seviyelerine bağlı olarak oksidatif stresle ilişkili hücrel ölüm mekanizmalarını etkileme potansiyeline sahip olabileceği fikri ortaya çıkmaktadır.

Lipid peroksidasyonuna dair bulgular incelendiğinde, J2 molekülünün MDA seviyelerini doza bağımlı olarak anlamlı şekilde artırdığını ve hücrel membran hasarına yol açabileceğini göstermektedir. Özellikle ek bir stres etkeni olan pozitif kontrol koşulunda bu artış, ferroptosisin temel belirteçlerinden biri olan lipid peroksidasyonunun, J2'nin etkisiyle şiddetlenebileceğine işaret etmektedir (Dixon vd., 2012; Stockwell vd., 2017).

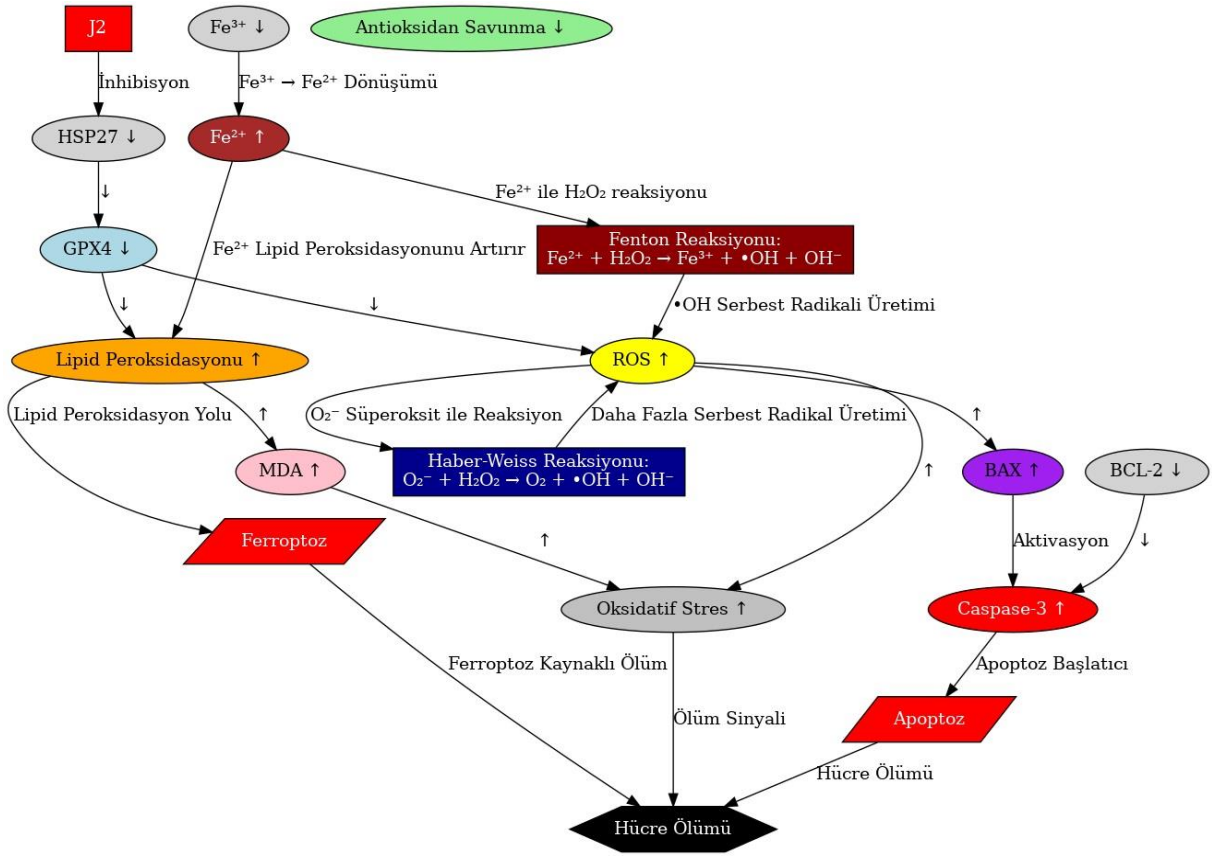
Demir seviyeleri, ferroptozis sürecinde kritik bir rol oynayan ve lipid peroksidasyonunu artırarak hücre ölümüne yol açabilen önemli bir mekanizmadır. Fe^{+2} ve Fe^{+3} seviyeleri incelendiğinde, (-K) grubunda Fe^{+3} seviyelerinin J2 uygulanması ile doza bağımlı olarak azaldığı, J2 molekülünün yarattığı stresin Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyerek ferroptozis mekanizmasını tetikleyebileceğini ve hücre ölümüne yol açabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Fe^{+2} seviyelerinin Parkinson hastalığı modelinde başlangıçta yüksek olduğu ve J2 uygulanmasıyla yüksek artışlar kaydedildiği görülmektedir. Bu veriler J2'nin ferroptozis üzerinden Parkinson hastalığında hücre ölümü hızlandırıcı bir etkisi olabileceğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Demire bağımlı bir hücre ölümü yolu ferroptozisin biyobelirteçlerinden biri olan GPx4, lipid peroksitleri detoksifiye ederek hücreleri ferroptozise karşı koruyan antioksidan bir enzimdir (Dixon vd., 2012; Stockwell vd., 2017). Elde edilen bulgular incelendiğinde GPx4'nin spesifik aktivitesinin (-K) grubunda özellikle J2'nin artan konsantrasyonlarındaki düşüşü dikkat çekmektedir. Bu durum J2'nin ferroptozisi tetikleyebileceği veya antioksidan savunmayı baskılayarak hücre oksidatif stresi artırabileceğini düşündürmektedir. (+K) grubundaki GPx4 spesifik aktivitesinin düşük olması Parkinson modellemesi yapılan hücrelerde ferroptozis ihtimalinin giderek güçlendiğine veya hücrelerin ferroptozise daha duyarlı hale geldiğine işaret ediyor olabilir.

HSP27 inhibitörü olan J2 molekülünün GPx4 ve ferroptozis üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar sınırlıdır ancak benzer bileşiklerin oksidatif stres ve hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri literatürde bildirilmiştir (Li vd., 2020; Seibt vd., 2019). Bulgularımız, J2 molekülünün hücre içine Fe^{+3} alımını artırarak Fe^{++} indirgenmesini hızlandırdığını ve antioksidan savunmayı zayıflatarak ferroptozis gibi hücre ölüm yollarının tetiklenebileceğini ortaya koymaktadır (Dixon vd., 2012; Stockwell vd., 2017).

J2 molekülünün HSP27 üzerindeki etkisini inceleyebilmek için lüsiferaz aktivite tayini yapılmıştır. (-K) ve (+K) gruplarında ATP varlığında HSP27 lüsiferaz aktivitesini gösterebiliyorken, bu gruplara J2 uygulanmasının ardından bu aktivitenin doza bağımlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçların J2'nin HSP27'nin yeniden katlanma ile ilişkili mekanizmaları üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olabileceğini doğrulamaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda J2 molekülünün HSP27 üzerindeki inhibe edici etkisi nörodejeneratif

hastalıklarda nöronal sağkalımı ve rejenerasyonu destekleyen, nöroprotektif etki gösteren HSP27 için negatif bir etki yaratmaktadır. (Navarro-Zaragoza, vd.,2021; Ousman vd., 2017; Stetler vd., 2009).



Şekil 5.1. J2 molekülünün apoptoz ve ferroptozis üzerindeki etkileri

Genel olarak, HSP27 inhibitörü olan J2 molekülü, hem bazal hem de stres koşullarında hücrel metabolizmayı etkileyerek apoptotik ve ferroptotik mekanizmaları aktive edebilecek bir potansiyele sahiptir. Kanser hastalığı tedavilerinde ümit verici yanıtlar elde edilsede bu ilacın olası yan etkileri sayılabilecek olan nörodejeneratif hastalıklarda ortaya çıkarabileceği negatif dönütlerde mevcuttur. 2005'te yayınlanan Latchman'ın bir makalesine göre, HSP'lerin koruyucu etkisi üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğu, ana uyarılabilir ısı şoku proteini HSP70 üzerinde yoğunlaşmış olsa da, çeşitli kanıtlar, HSP27'nin sinir sisteminde daha güçlü bir koruyucu etkiye sahip olabileceğini öne sürmektedir. HSP27'nin nöronal koruma mekanizmalarında daha aktif olduğu, HSP70'in bazı stres uyaranlarına maruz kalmaya karşı koruma sağlayamazken, HSP27'nin aşırı ekspresyonunun çeşitli streslere karşı koruma sağladığı bildirilmektedir (Latchman, 2005). Bu bulgular, nörodejeneratif hastalıklarda J2'nin

HSP27'nin hücrel koruma fonksiyonlarını zayıflatmasına neden olarak, hücreleri oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Literatüre uygun olarak, bu mekanizmaları daha iyi anlamak için *in vivo* modellerde yapılacak daha fazla deneysel çalışma gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır. J2 molekülünün kullanım alanlarının değerlendirilmesi, özellikle Parkinson hastalığı gibi stres kaynaklı nörodejeneratif hastalıklarda dikkat çekici yeni önlemler sunabilir.

KAYNAKÇA

- Adams J.M, Cory S. (2007). The BCL-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337.
- Adams, J.M., Cory, S. (1998). The BCL-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
- Alexander, C.C., Munkácsy, E., Tillmon, H., Fraker, T., Scheirer, J., Holstein, D., Rodriguez, K. A. (2022). HSPB1 overexpression improves life span and stress resistance in an invertebrate model. *The Journals of Gerontology: Series A*, 77(2), 268-275.
- Aridon, P., Geraci, F., Turturici, G., D’Amelio, M., Savettieri, G., Sconzo, G. (2011). Protective role of heat shock proteins in Parkinson’s disease. *Neurodegenerative diseases*, 8(4), 155-168.
- Au, N. P. B., Fang, Y., Xi, N., Lai, K. W. C., & Ma, C. H. E. (2014). Probing for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in live dorsal root ganglion neurons with atomic force microscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(6), 1323-1333.
- Ayala A, Muñoz M.F, Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of cellular damage. *Ageing Research Reviews*, 12, 31–44.
- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., Lutsch, G. (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20780-20784.
- Berbusse, G. W., Woods, L. C., Vohra, B. P., & Naylor, K. (2016). Mitochondrial dynamics decrease prior to axon degeneration induced by vincristine and are partially rescued by overexpressed cytochrome c. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 179.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F.1. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the neurological sciences*, 20(4), 415-455.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Canta, A., Pozzi, E., Carozzi, V. A. (2015). Mitochondrial dysfunction in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Toxics*, 3(2), 198-223.
- Cashman, C. R., Höke, A. (2015). Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. *Neuroscience letters*, 596, 33-50.
- Chine, V. B., Au, N. P. B., & Ma, C. H. E. (2019). Therapeutic benefits of maintaining mitochondrial integrity and calcium homeostasis by forced expression of HSP27 in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neurobiology of disease*, 130, 104492.
- Choi, S.K., Kam, H., Kim, K.Y., Park, S.I., Lee, Y.S. (2019). Targeting heat shock protein 27 in cancer: a druggable target for cancer treatment?. *Cancers*, 11(8), 1195.
- Cools, R., Barker, R.A., Sahakian, B.J., Robbins, T.W. (2003). L-Dopa medication remediates cognitive inflexibility, but increases impulsivity in patients with Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 41(11), 1431-1441.
- Costa, I., Barbosa, D.J., Benfeito, S., Silva, V., Chavarria, D., Borges, F., Silva, R. (2023). Molecular mechanisms of ferroptosis and their involvement in brain diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 244, 108373.
- Cox, D., Ecroyd, H. (2017). The small heat shock proteins α B-crystallin (HSPB5) and HSP27 (HSPB1) inhibit the intracellular aggregation of α -synuclein. *Cell Stress and Chaperones*, 22(4), 589-600.
- Cox, D., Selig, E., Griffin, M.D., Carver, J.A., Ecroyd, H. (2016). Small heat-shock proteins prevent α -synuclein aggregation via transient interactions and their efficacy is affected by the rate of aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22618-22629.
- Csermely, P., Schnaider, T., So, C., Prohászka, Z., Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*, 79(2), 129-168.
- D Westerheide, S., Raynes, R., Powell, C., Xue, B., N Uversky, V. (2012). HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. *Current Protein and Peptide Science*, 13(1), 86-103.
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*, 130(6), 1005-1018.
- Daturpalli, S., Waudby, C.A., Meehan, S., Jackson, S.E. (2013). HSP90 inhibits α -synuclein aggregation by interacting with soluble oligomers. *Journal of molecular biology*, 425(22), 4614-4628.

- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11(1), 1-12.
- Dixon S.J, Lemberg K.M, Lamprecht M.R, vd. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Stockwell, B.R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.
- Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gelé, P., Pétrault, M., Devedjian, J.C. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiology of disease*, 94, 169-178.
- Dorsey, E.A., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Tanner, C.M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384-386.
- Draper H.H, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 421–431.
- Duffy, S. M., & Boucher, J. D. (2015). The protective effects of small heat shock proteins in neurodegeneration and cardiovascular disease. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1), 1–14.
- Elbaz, A., Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E., Rocca, W.A. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *Journal of clinical epidemiology*, 55(1), 25-31.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Fan, C.Y., Lee, S., Cyr, D.M. (2003). Mechanisms for regulation of HSP70 function by HSP40. *Cell stress & chaperones*, 8(4), 309.
- Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator GPx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature cell biology*, 16(12), 1180-1191.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.

- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*, 5(22), 2592-2601.
- Gidalevitz, T., Kikis, E.A., Morimoto, R.I. (2010). A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Current opinion in structural biology*, 20(1), 23-32.
- Gillies, G.E., Pienaar, I.S., Vohra, S., Qamhawi, Z. (2014). Sex differences in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), 370-384.
- Green, D.R. (2019). The coming decade of cell death research: five riddles. *Cell*, 177(5), 1094-1107.
- Han, C., Liu, Y., Dai, R., Ismail, N., Su, W., Li, B. (2020). Ferroptosis and its potential role in human diseases. *Frontiers in pharmacology*, 11, 239.
- Hochberg, G.K., Ecroyd, H., Liu, C., Cox, D., Cascio, D., Sawaya, M.R., Laganowsky, A. (2014). The structured core domain of α B-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), E1562-E1570.
- Holguin, B.A., Hildenbrand, Z.L., Bernal, R.A. (2022). Insights into the role of heat shock protein 27 in the development of neurodegeneration. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 868089.
- Holz, S.C. (2016). Diagnosing and Managing Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Am Society of Clinic Oncol*, 10(6), 1-4.
- Hwang, S.Y., Kwak, S.Y., vd. (2017). Synthesis and biological effect of chrom-4-one derivatives as functional inhibitors of heat shock protein 27. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 892-900.
- Jaggi, A. S., & Singh, N. (2012). Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*, 291(1-3), 1-9.
- Jamebozorgi, K., Taghizadeh, E., Rostami, D., Pormasoumi, H., Barreto, G.E., Hayat, SM. G., Sahebkar, A. (2019). Cellular and molecular aspects of Parkinson treatment: future therapeutic perspectives. *Molecular Neurobiology*, 56, 4799-4811.
- Jiang, X., Stockwell, B.R., Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 22(4), 266-282.

- Johnston, C.L., Marzano, N.R., Van Oijen, A.M., Ecroyd, H. (2018). Using single-molecule approaches to understand the molecular mechanisms of heat-shock protein chaperone function. *Journal of molecular biology*, 430(22), 4525-4546.
- Kannarkata, G. (2008). Kemoterapi ajanlarının nörolojik komplikasyonları. *Current Opinion in Neurology*, 2(1), 52-60.
- Karademir, D., Özgür, A. (2023). Small molecule heat shock protein 27 inhibitor J2 decreases ovarian cancer cell proliferation via induction of apoptotic pathways. *Medical Oncology*, 40(9), 250.
- Karademir, D., Özgür, A. (2023). Small molecule heat shock protein 27 inhibitor J2 decreases ovarian cancer cell proliferation via induction of apoptotic pathways. *Medical Oncology*, 40(9), 250.
- Khalil, M.M., Salem, A. (1995). Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clinical chemistry*, 41(9), 1314-1315.
- Lang A.E, Lozano A.M (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339: 1044–53.
- Latchman, D.S. (2005). HSP27 and cell survival in neurones. *International journal of hyperthermia*, 21(5), 393-402.
- Luo, G.R., Chen, S., Le, W.D. (2007). Are heat shock proteins therapeutic target for Parkinson's disease?. *International journal of biological sciences*, 3(1), 20.
- Luoqian, J., Yang, W., Ding, X., Tuo, Q. Z., Xiang, Z., Zheng, Z., Lei, P. (2022). Ferroptosis promotes T-cell activation-induced neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cellular & molecular immunology*, 19(8), 913-924.
- Ma, Q.L., Chan, P., Yoshii, M., Uéda, K. (2003). α -synuclein aggregation and neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease*, 5(2), 139-148.
- Mapa, K., Sikor, M., Kudryavtsev, V., Waagemann, K., Kalinin, S., Seidel, C. A., Mokranjac, D., vd. (2010). The conformational dynamics of the mitochondrial HSP70 chaperone. *Molecular cell*, 38(1), 89-100.
- Martínez-Laorden, E., Navarro-Zaragoza, J., Milanés, M.V., Laorden, M.L., Almela, P. (2020). Cardiac protective role of heat shock protein 27 in the stress induced by drugs of abuse. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3623.
- Mastrangelo, L. (2017). The genetics of Parkinson disease. *Advances in Genetics*, 98, 43-62.

- McLean, P.J., Kawamata, H., Shariff, S., Hewett, J., Sharma, N., Ueda, K., Hyman, B.T. (2002). TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of α -synuclein aggregation. *Journal of neurochemistry*, 83(4), 846-854.
- Mori, F., Nishie, M., Kakita, A., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2006). Relationship among α -synuclein accumulation, dopamine synthesis, and neurodegeneration in Parkinson disease substantia nigra. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(8), 808-815.
- Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (HSP70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, 43(3), 229-237.
- Nakamura, T., Lipton, S.A. (2009). Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 14, 455-468.
- Neef, D.W., Jaeger, A.M., Thiele, D.J. (2011). Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 10(12), 930-944.
- Pearl, L.H., Prodromou, C., Workman, P. (2008). The HSP90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochemical Journal*, 410(3), 439-453.
- Peschanski, M., Defer, G., N'guyen, J.P., Ricolfi, F., Monfort, J.C., Remy, P., Cesaro, P. (1994). Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain*, 117(3), 487-499.
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 1640-1648.
- Pinna, A., Bonaventura, J., Farré, D., Sánchez, M., Simola, N., Mallol, J., Franco, R. (2014). L-DOPA disrupts adenosine A2A–cannabinoid CB1–dopamine D2 receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies. *Experimental neurology*, 253, 180-191.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-21.
- Pratt, W.B., Morishima, Y., Osawa, Y. (2008). The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 22885-22889.
- Rabey, J.M., Hefti, F. (1990). Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *Journal of Neural Transmission-Parkinson's Disease and Dementia Section*, 2, 1-14.

- Rajesh, K., Suneetha, M. (2014). Rotenone-induced oxidative stress leads to HSP27-mediated cytoprotective effects in SH-SY5Y cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, 14-23.
- Reichert, C.O., de Freitas, F.A., Sampaio-Silva, J., Rokita-Rosa, L., Barros, P.D.L., Levy, D., Bydlowski, S.P. (2020). Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8765.
- Reichmann, H. (2016). Modern treatment in Parkinson's disease, a personal approach. *Journal of neural transmission*, 123, 73-80.
- Scherz-Shouval, R., Santagata, S., Mendillo, M.L., Sholl, L.M., Ben-Aharon, I., Beck, AH., Lindquist, S. (2014). The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell*, 158(3), 564-578.
- Schweichel, J.U., Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), 253-266.
- Seretny, M., Currie, G. L., Sena, E. S., Ramnarine, S., Grant, R., MacLeod, M. R., ... & Fallon, M. (2014). Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Pain®*, 155(12), 2461-2470.
- Shah, A., Hoffman, E.M., Mauermann, M.L., Loprinzi, C.L., Windebank, A.J., Klein, C.J., Staff, N.P. (2018). Incidence and disease burden of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a population-based cohort. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 89(6), 636-641.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Greenamyre, J.T. (2002). Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *The Neuroscientist*, 8(3), 192-197.
- Siau, C., Xiao, W., & Bennett, G. J. (2006). Paclitaxel-and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Experimental neurology*, 201(2), 507-514.
- Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1332-1340.
- Söti, C., Csermely, P. (2002). Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochemistry international*, 41(6), 383-389.
- Stefani, M. (2004). Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein World. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Molecular basis of disease*, 1739(1), 5-25.

- Stefani, M., Dobson, C.M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution . *Journal of molecular medicine*, 81, 678-699.
- Stockwell B.R, Friedmann Angeli J.P, Bayir H, vd. (2017). Ferroptosis: A regulated cell death nexus in cancer, metabolism, and immunity. *Nature Reviews Cancer*, 17, 567–580.
- Treweek, T.M., Meehan, S., Ecroyd, H., Carver, J.A. (2015). Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis. *Cellular and molecular life sciences*, 72, 429-451.
- Turturici, G., Sconzo, G., Geraci, F. (2011). HSP70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochemistry research international*, 2011(1), 618127.
- Tutar, Y., Özgür, A., Tutar, L., Tutar, Y., Özgür, A., Tutar, L. (2013). Role of protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Neurodegenerative Diseases*, 55-76.
- Vihervaara, A., Sistonen, L. (2014). HSF1 at a glance. *Journal of cell science*, 127(2), 261-266.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.F., Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular cell*, 54(1), 133-146.
- Wang, T., Tomas, D., Perera, N.D., Cuic, B., Luikinga, S., Viden, A., Turner, B.J. (2022). Ferroptosis mediates selective motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death & Differentiation*, 29(6), 1187-1198.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International journal of pharmaceutics*, 289(1-2), 1-30.
- Wen, S., Aki, T., Unuma, K., Uemura, K. (2020). Chemically induced models of Parkinson's disease: history and perspectives for the involvement of ferroptosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 581191.
- Wolf, S., Barton, D., Kottschade, L., Grothey, A., & Loprinzi, C. (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *European journal of cancer*, 44(11), 1507-1515.
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Wang, T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Critical reviews in toxicology*, 42(7), 613-632.
- Yan, H.F., Zou, T., Tuo, Q. Z., Xu, S., Li, H., Belaidi, A.A., Lei, P. (2021). Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 49.

- Yang, S., Xiao, H., Cao, L. (2021). Recent advances in heat shock proteins in cancer diagnosis, prognosis, metabolism and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112074.
- Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPx4. *Cell*, 156(1), 317-331.
- Yoo, M. H., Gu, X., Xu, X. M., Kim, J. Y., Carlson, B.A., Patterson, A. D., Hatfield, D. L. (2010). Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease. *Antioxidants & redox signaling*, 12(7), 819-827.
- Youle R.J, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59(1).
- Yuan, F., Sun, Q., Zhang, S., Ye, L., Xu, Y., Xu, Z., Chen, Q. (2022). HSP27 protects against ferroptosis of glioblastoma cells. *Human Cell*, 1-12.
- Zhou, Y., Gu, G., Goodlett, D.R., Zhang, T., Pan, C., Montine, T.J., Zhang, J. (2004). Analysis of α -Synuclein-associated Proteins by Quantitative Proteomics*[boxs]. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 39155-39164.