



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HUNTINGTON HASTALIĞI BEYİN PROTEOM
DEĞİŞİMLERİNİN YAC128 TRANSGENİK FARE MODELİNDE
MALDI-MS GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

MERVE KARAYEL BAŞAR
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HUNTINGTON HASTALIĞI BEYİN PROTEOM
DEĞİŞİMLERİNİN YAC128 TRANSGENİK FARE MODELİNDE
MALDI-MS GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

MERVE KARAYEL BAŞAR
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

26.12.2022

Merve Karayel Başar

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hayata geçmesine vesile olan tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a ve doktora eğitimimde emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, beni daima motive edip güç veren ekip arkadaşlarım; İrep Uras, Sebile Koca, Betül Şahin ve Büşra Gürel'e,

Bu yola birlikte çıktığım, iyi ve kötü zamanlarımda hep yanımda olup desteğini hiç esirgemeyen yol arkadaşım İrem Kırış'a,

Aldığım kararlara saygı duyup daima yanımda olan ve koşulsuz desteklerini her zaman yanımda hissettiğim canım aileme,

Gece gündüz demeden, en az benim kadar yaptığı fedakarlıklarla doktora eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyip, çalışmalarımı tamamlamamda büyük emeği olan, varlığını her an hissettiğim sevgili eşim Muhammet Emin Başar'a gönülden teşekkür ederim.

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenen 114S906 numaralı (Tübitak Uluslararası COST Projesi) — 'Nörodejeneratif Beyin Dokusundaki Protein Değişikliklerinin MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Belirlenmesi' başlıklı proje kapsamında yapılmıştır. TÜBİTAK'a projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Huntington Hastalığı.....	7
2.2 Tarihçe ve Epidemiyoloji.....	7
2.3 Klinik Özellikler	8
2.4 Genetik Özellikler	10
2.5 Hastalığın Moleküler Genetiği ve Patolojisi	12
2.5.1 Mutant protein agregasyonu.....	14
2.5.2 Transkripsiyonel disregülasyon ve epigenetik regülasyon.....	15
2.5.3 Mitokondri hasarı ve enerji metabolizmasındaki bozulma	16
2.5.4 Hasarlı aksonal transport ve hücre iskeleti	17
2.5.5 Oksidatif stres ve glutamat eksitotoksitesine karşı nöronal hassasiyet	17
2.5.6 İmmün sistem, mikrogliya aktivasyonu ve enflamasyon.....	18
2.6 Normal <i>htt</i> Proteininin Hücreki Fonksiyonu	19
2.7 Tedavi.....	19
2.8 Huntington Hastalığı'nı Araştırmada Kullanılan Fare Modelleri	19
2.8.1 N-terminal transgenik model	20
2.8.2 Knock-in model	20
2.8.3 Full-length transgenik model	20
2.8.3.1 YAC128	20
2.9 Proteomik Çalışmalar	21
2.9.1 Kütle spektrometresi (MS)	22
2.9.1.1 LC-MS/MS çalışmaları.....	24
2.9.1.2 MALDI-MS görüntüleme çalışmaları	25
3 GEREÇ VE YÖNTEM	27

3.1	Çalışma Planı.....	27
3.2	Gereçler	28
3.3	Yöntem	31
3.3.1	Deney hayvanları.....	31
3.3.2	Genotipleme	32
3.3.3	Açık alan (open-field) davranış testi.....	33
3.3.4	MALDI kütle spektrometresi görüntüleme	34
3.3.4.1	Beyin dokularının eksizyonu ve saklanması	34
3.3.4.2	Beyin doku kesitlerinin alınması	35
3.3.4.2.1	12 aylık fare beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analizi öncesi yıkanması	35
3.3.4.2.2	3, 6 ve 12 aylık fare beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analizi öncesi yıkanması (iyileştirilmiş protokol)	35
3.3.4.3	Tripsinizasyon	36
3.3.4.3.1	12 aylık fare beyin doku kesitleri üzerine tripsin enzimi uygulanması	36
3.3.4.3.2	3, 6 ve 12 aylık fare beyin doku kesitleri üzerine tripsin enzimi uygulanması (iyileştirilmiş protokol)	37
3.3.4.4	Matriks uygulaması	38
3.3.4.5	MALDI kütle spektrometresi görüntüleme (MSI) analizi	39
3.3.4.6	MALDI-MSI analiz datalarının işlenmesi	40
3.3.4.6.1	SCiLS 2D yazılımı ile dokuların segmentasyon analizleri	42
3.3.4.6.2	m/z değerlerinin internal kalibrasyon ile düzeltilmesi	42
3.3.4.6.3	İntensite verilerinin normalize edilmesi	43
3.3.4.6.4	Verilerin gruplandırılması (data binning)	43
3.3.4.7	İstatistiksel analizler	45
3.3.4.8	LC-MS/MS analizleri ile protein tanımlama	45
3.3.4.8.1	Doku kesitlerinden LC-MS/MS analizi için örnek hazırlanması	45
3.3.4.8.2	LC-MS/MS analizi	46
3.3.4.9	MALDI-MSI analiz sonuçları ile protein belirleme.....	46
3.3.5	İmmunohistokimya analizi.....	47
3.3.6	Western blot yöntemi ile elde edilen sonuçların validasyonu	49
3.3.6.1	Protein örneklerinin hazırlanması	49
3.3.6.2	Western blot yöntemi.....	49
3.3.6.3	Western blot yöntemi ile elde edilen dataların işlenmesi	51
3.3.7	Farklı ekspresyona sahip proteinlerin biyoinformatik analizleri.....	51
4	BULGULAR	53
4.1	Genotipleme ile Transgenik Hayvanların Belirlenmesi.....	53
4.2	Açık Alan (Open-Field) Davranış Testi Sonuçları	53
4.2.1	12 aylık farelerin davranış testi sonuçları.....	53
4.2.2	3, 6 ve 12 aylık farelerin davranış testi sonuçları.....	55
4.3	LC-MS/MS ve MALDI-MSI Analizlerinin Sonuçları	57
4.3.1	LC-MS/MS analizi	57
4.3.2	MALDI-MSI analizi.....	57
4.3.2.1	12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI sonuçları... 57	

4.3.2.2	3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI sonuçları (iyileştirilmiş protokol)	61
4.4	İmmünohistokimya Analiz Sonuçları.....	64
4.4.1	EM48 antikoruna özgü immünohistokimyasal boyama	64
4.4.2	12 aylık farelere ait beyin dokularının MALDI-MSI verilerinin immünohistokimyasal boyama validasyon sonuçları	65
4.5	3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin dokularının MALDI-MSI verilerinin western blot validasyon sonuçları.....	67
4.6	Biyoinformatik Analizler	69
5	TARTIŞMA	71
5.1	12 Aylık YAC128 ve LM farelerine Ait Beyin Doku Kesitlerinin MALDI-MSI Analizleri	73
5.2	3, 6 ve 12 Aylık YAC128 ve LM Farelerine Ait Beyin Doku Kesitlerinin MALDI-MSI Analizleri	76
6	SONUÇ.....	83
7	KAYNAKLAR	84
8	EKLER.....	93
EK 1	Etik Kurul İzni	93
EK 2	12 Aylık YAC128 ve LM Grupları Arasında Değişim Gösteren m/z Değerleri.....	94
EK 3	12 Aylık YAC128 ve LM Grupları Arasında Değişim Gösteren Proteinler	95
EK 4	3, 6 ve 12 Aylık YAC128 ve LM Grupları Arasında Değişim Gösteren Proteinler	97
9	ÖZGEÇMİŞ.....	104

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
APS	Ammonium Persulfate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BDNF	Brain derived Neurotrophic Factor
BME	β -mercaptoethanol
BSA	Bovine Serum Albumin
CREBP	c-AMP Responsive Element Binding Protein
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
ECL	Enhanced chemiluminescence
ESI	Electrospray Ionization
FASP	Filter Aided Sample Preparation
FDR	False Discovery Range
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GO	Gene Ontology
HH	Huntington Hastalığı
HPLC	High Liquid Pressure Chromatography
IAA	Iodoacetamide
ITO	Indium Tin Oxide
IVC	Individually Ventilated Cages
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LM	Littermate
M	Mean
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MAP1A	Microtubule-associated protein 1A
MBP	Myelin Basic Protein
Mdn	Median
MSI	Mass Spectrometry Imaging

MSN	Medium Spiny Nöron
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline with Tween 20
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
PGC-1α	Reseptör- γ Koaktivatör 1 α
PH	Parkinson Hastalığı
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PLL	Poly-L-Lysine
PP2B	Serine/threonine-protein phosphatase 2B
REST	RE1-silencing transcription factor
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SEM	Standart Error of Mean
SEM	Standart Error of the Mean
TEMED	Tetrametiletildiamin
TIC	Total Ion Count
TOF	Time-of-Flight
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UPX	Universal Protein Extraction Kit
YAC	Yeast Artificial Chromosome

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Huntington Hastalığı'nın evreleri (19)	9
Şekil 2. <i>huntingtin</i> geninin ekspresyon basamakları (19)	11
Şekil 3. <i>huntingtin</i> proteini üretiminin şematik gösterimi	12
Şekil 4. HH'de nörotoksisiteyi, patolojik süreçleri ve protein agregasyonunu gösteren şematik diyagram (23).....	13
Şekil 5. HH'deki patogenetik hücresel mekanizmalar (19)	14
Şekil 6. HH'de transkripsiyonel düzensizliğin mekanizmaları (31).....	15
Şekil 7. REST aracılı gen regülasyonu (32).....	16
Şekil 8. MS tabanlı proteomik çalışmanın temel basamakları.....	22
Şekil 9. Temel kütle spektrometresi bileşenleri	22
Şekil 10. İş akış planı..	28
Şekil 11. Tripsinizasyon boyunca SunDigest cihazında değişen parametreler.....	37
Şekil 12. Temsili BSA kromatogram görüntüleri	40
Şekil 13. MALDI-MSI analizinin toplam iş akışı.....	41
Şekil 14. MALDI-MSI analiz datalarının işlenmesindeki toplam iş akışı.....	41
Şekil 15. mMass yazılımı ile internal kalibrasyonun temsili görüntüsü	42
Şekil 16. mMass yazılımı ile yapılan internal kalibrasyon sonrası eşleşme hata oranlarının temsili tablosu ve grafikleri	44
Şekil 17. MALDI-MSI ve LC-MS/MS datalarının eşleştirilmesi.....	47
Şekil 18. 12 aylık farelerin açık alan testi sonuçları	54
Şekil 19. 3, 6 ve 12 aylık farelerin açık alan testi sonuçları.....	56
Şekil 20. 12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin temsili segmentasyon haritası, R1, R2, R3 ve R4 bölgelerine ait görüntüler ve triptik peptit profilleri.....	57
Şekil 21. GFAP'ın 12 aylık YAC128 ve LM beyin doku kesitleri üzerindeki dağılımı ve intensite grafikleri.....	59

Şekil 22. Sirtuin-2 ve sitrat sentaz proteinlerinin 12 aylık YAC128 ve LM fare beyin doku kesitleri üzerindeki dağılımları ve intensite grafikleri	60
Şekil 23. 3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin dokularının segmentasyon analizi ile belirlenen R1, R2, R3 ve R4 bölgelerine ait görüntüler ve temsili triptik peptit profilleri.....	62
Şekil 24. m/z değerleri ve tanımlanan proteinlerin sayısı	63
Şekil 25. LM ve YAC128 fare beyin dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren m/z değerlerinin temsili görüntüleri ve intensite değerlerinden elde edilen bar grafikler	64
Şekil 26. 12 aylık LM ve YAC128 farelerinin beyin dokularında mEM48 antikorunun immüno-histokimyasal boyama yöntemiyle gösterimi	65
Şekil 27. 12 aylık LM ve YAC128 beyin dokularındaki GFAP immunohistokimyasal boyanmasının görüntüleri.	66
Şekil 28. Kortikal NeuN yoğunluğunun gösterimi ve ölçümü.....	66
Şekil 29. Gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilen Tau, EF2, Hsp70 ve NogoA proteinlerinin dokular üzerindeki dağılımlarını gösteren temsili görüntüler ve bunların western blot validasyonları..	68
Şekil 30. Anlamlı farklılık gösteren proteinlerin katıldıkları biyolojik süreçler ve zenginleştikleri KEGG yollarının baloncuk grafiği ile gösterimi	70

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Açık alan (Open field) testi düzeneği	34
Resim 2. 12 aylık fare beyin doku kesitleri için temsili ITO lam görüntüsü.	36
Resim 3. 3, 6 ve 12 aylık fare beyin doku kesitlerinin her biri için temsili ITO lam görüntüsü.....	37
Resim 4. Peptit kalibrasyon standart II içeriği.	39
Resim 5. Huntington Hastalığı fare modeli dokularının agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin analizi.....	53



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	29
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alınan firmalar	30
Tablo 3. Fare Üretim Tablosu	32
Tablo 4. Deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan primer dizileri.....	32
Tablo 5. Deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan PCR bileşenleri.....	33
Tablo 6. Total intensite normalizasyon hesaplaması örneği	43
Tablo 7. İmmünohistokimya analizlerinde kullanılan antikorlar, markaları ve dilüsyon oranları.....	49
Tablo 8. Western Blot validasyonlarında kullanılan antikorlar, markaları ve dilüsyon oranları	51
Tablo 9. 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinden elde edilen istatistiksel anlamlı m/z değerleri	94
Tablo 10. 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler	95
Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler.....	97

ÖZET

Huntington Hastalığı Beyin Proteom Değişimlerinin YAC128 Transgenik Fare Modelinde MALDI-MS Görüntüleme Tekniği ile Araştırılması

İlerleyici nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Huntington Hastalığı (HH), otozomal dominant kalıtım gösteren ölümcül genetik bir hastalıktır. 4. kromozom üzerinde yer alan ve değişken uzunluktaki poliglutamin tekrarlarıyla huntingtin proteinini kodlayan *huntingtin* geninin N-terminalindeki CAG trinükleotit tekrarlarının anormal şekilde genişlemesiyle ortaya çıkar. İyi karakterize edilmiş ve sıklıkla kullanılan HH transgenik fare modellerinden biri olan YAC128, tam uzunlukta bir insan mutant *huntingtin* genini eksprese eder. Proteomik, yapılarını, fizyolojik işlevlerini, dinamiklerini veya diğer rollerini belirlemek için proteinleri büyük ölçekte sistematik olarak inceleyen güçlü bir alandır. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi görüntüleme (MALDI-MSI), bir doku kesitinden proteinleri homojenize etmeden doku üzerindeki mekansal konumlarıyla birlikte doğrudan belirlemeyi sağlayan en son teknolojilerden birisidir. Bu çalışmada HH'de gözlenen nörodejenerasyon süreci ve patolojisini proteomik açıdan incelemek amacıyla, iki temel ve birbirini tamamlayan MALDI-MSI ve LC-MS/MS teknolojileri kullanılarak motor disfonksiyonları açık alan davranış testiyle tespit edilen 3, 6 ve 12 aylık farelerin beyin dokuları analiz edildi. Her iki teknikten elde edilen veriler bir araya getirilerek değerlendirildi ve hastalığın ilgili zaman dilimlerinde meydana gelen protein ekspresyon değişimleri belirlenerek her grup özelinde, farklı yoğunluklara sahip olduğu tespit edilen proteinlerin doğrulaması yapıldı. Ayrıca ekspresyonel farklılık gösterdiği tespit edilen proteinlerin yolak analizleri gerçekleştirildi ve hastalık nedeniyle 3, 6 ve 12 aylık dönemlerde gruplar arasında değişiklik gösteren en belirgin biyolojik süreçler ve moleküler yollar sunularak sonuçlar anlaşıldı.

Anahtar Sözcükler: Huntington hastalığı, nörodejenerasyon, proteomik, MALDI-MSI, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Detection of Huntington's disease Brain Proteome Alterations in YAC128 Transgenic Mouse Model via MALDI-MS Imaging

Huntington's disease (HD), one of the progressive neurodegenerative diseases, is a fatal genetic disease with autosomal dominant inheritance. It is caused by abnormal expansion of CAG trinucleotide repeats at the N-terminus of the *huntingtin* gene, which is located on chromosome 4 and encodes the huntingtin protein with variable length polyglutamine repeats. YAC128, one of the well-characterized and frequently used, expresses a full-length human mutant *huntingtin* gene. Proteomics is a powerful field that systematically studies proteins at a large scale to determine their structure, physiological function, dynamics or other roles. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) is one of the latest technologies that allows to directly identify proteins from a tissue section without homogenization, along with their spatial information on the tissue. In this study, motor dysfunctions detected with open field behavioral test. The brain tissues of 3-, 6- and 12-month-old YAC128 and their control mice motor were analyzed using two basic and complementary technologies, MALDI-MSI and LC-MS/MS, to evaluate the neurodegeneration process and the pathology observed in HD with a proteomics perspective. The data obtained from both techniques were combined and evaluated, and the protein expression changes occurring in the relevant time periods of the disease were determined, and the proteins found to have different intensities for each group were confirmed. In addition, pathway analyzes of the proteins that were found to show expression differences were performed and the results were interpreted by presenting the most prominent biological processes and molecular pathways that showed difference between the groups at 3, 6 and 12 months due to the disease.

Keywords: Huntington's disease, neurodegeneration, proteomics, MALDI-MSI, LC-MS/MS.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar, nörodejenerasyon olarak bilinen süreçte nöronların ilerleyici yapı veya işlev kaybı sonucu oluşur. Bu tür nöronal hasar, hücrelerin normal fonksiyon gösterememesine ve nihayetinde hücre ölümüne sebep olur. Nörodejenerasyon, beyinde nöronal sistemin pekçok farklı seviyesinde meydana gelebilir. Nöronların ilerleyici dejenerasyonunu tersine çevirmenin bilinen bir yolu olmadığı için, bu hastalıkların tedavi edilemez olduğu düşünülmektedir. Mevcut tedavi yaklaşımları nörodejeneratif hastalıkların semptomlarını azaltmaya ve seyrini yavaşlatmaya yöneliktir. Nörodejeneratif hastalıkların farklı bakış açılarıyla araştırılıp moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar, geliştirilecek terapötik yaklaşımlar için yeni fırsatlar sunar (1).

İlerleyici nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Huntington Hastalığı (HH), otozomal dominant kalıtım gösteren ölümcül genetik bir hastalıktır. Karakteristik özellikleri arasında hareket bozuklukları, psikiyatrik ve davranışsal değişiklikler yer alır. 4. kromozom üzerinde yer alan ve değişken uzunluktaki poliglutamin tekrarlarıyla huntingtin proteinini kodlayan *huntingtin* (*htt*) geninin N-terminalindeki CAG trinükleotit tekrarlarının anormal şekilde genişlemesiyle ortaya çıkar (2). HH'nin en belirgin nöropatolojik bulgusu striyatumdaki selektif nöron kaybıdır (3). Bazal gangliyanın striyatal kısmı dışında, kortikal tabakalar, globus pallidus, hipokampus, amigdala, talamus, substantia nigra, subtalamik nükleus, serebellum ve parietal lobdaki angular gyrus bölgesi de hastalığın evrelerine bağlı olarak çeşitli derecelerde etkilenen diğer beyin bölgeleridir (4). Beyinde bulunan nöronal intranükleer inklüzyonlar (NII) HH'nin nöropatolojik belirteci olarak kabul edilir. Huntington inklüzyonları transgenik HH modelinin ve ölüm sonrası (post-mortem) HH beyinlerinin striatum ve korteksinde gösterilmiştir (5,6). Hastalığın semptomları, eksitotoksosite, transkripsiyonel değişiklikler, agregasyon ve proteinin normal işlevinin kaybı ile ilişkilendirilmiş olsa da, hastalık için tam olarak uygulanabilir bir tedavi henüz keşfedilmemiştir ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilmesi için altta yatan moleküler ve patojenik mekanizmaları ortaya çıkarmaya yönelik daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (7).

Fare modelleri, küçük boyut, genetik manipölasyonlara açık olma, kısa jenerasyon süresine ve insan genomuyla oldukça benzer bir genoma sahip olmalarından dolayı deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılırlar. İyi karakterize edilmiş ve deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan HH transgenik fare modellerinden biri olan YAC128, 128 kalıntı uzunluğunda bir poliglutamin zinciri içeren tam uzunlukta bir insan mutant *htt*'sini ifade eder (8). Bu model, striatal nöron kaybı ile ilişkili olan yaşa bağılı beyin atrofisi ve motor anormallikler sergiler. İnsan HH'de görülen motor disfonksiyon ve nöropatoloji, YAC128 transgenik farelerde taklit edilmektedir (9). Bu açıdan, HH ile ilgili yapılacak deneysel çalışmalarda YAC128 transgenik fare modelinin kullanılması, hastalığın doğasını ve ilerlemesini anlamak için ideal bir araçtır. YAC128 transgenik fareleri ilk 3 ayda aşırı hareketlilik, 6. aydan itibaren motor işlevselliklerde bozulma ve 9. ayda nörodejenerasyon sürecine başlayıp, 12. ayda hareketlerde yavaşlama sergilemesinin yanında, patolojik olarak beyin ağırlığında azalma ve striatal ve kortikal hacimlerinde küçülme gösterir (10,11).

Açık alan davranış testi (open field), kaygı benzeri davranışları ve spontan lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir davranış testidir ve HH fare modellerinin motor disfonksiyonunu tespit etmek için sıklıkla tercih edilir (11,12). HH transgenik fareleri açık alanda korkuya kapılma eğiliminde oldukları için merkez alandan ziyade düzeneğin kenarlarında vakit geçirirler. Kaygı benzeri davranışların değerlendirilmesi için merkez ve kenarlarda geçirilen süreler dikkate alınırken, lokomotor aktivitenin ölçülmesinde test süresi boyunca farenin hareketliliği değerlendirilir (13).

Proteomiks, proteinlerin yapılarını, fizyolojik işlevlerini, dinamiklerini veya hücre içindeki rollerini sistematik olarak incelemek için kullanılan güçlü bir alandır. Herhangi bir biyolojik süreçte hangi proteinlerin yer aldığı, belirli bir proteinin diğerleri ile nasıl etkileşime girdiği ve hücre içinde nerede ve nasıl lokalize olduğu gibi önemli biyolojik bilgiler proteomik araştırmalar ile sağlanabilir. Proteinlerin dokudaki mekansal dağılımlarının analizi, onların patolojik süreçlerdeki işlevini anlamamıza yardımcı olabilir ve HH gibi kompleks hastalıkların ilerlemesi sırasında proteinlerin moleküler değişiklikler üzerindeki etkilerini aydınlatılabilir (14). Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi görüntüleme (MALDI-

MSI), örnek homojenizasyonu olmaksızın proteinleri doku üzerindeki mekansal konumlarıyla birlikte doğrudan belirlemeyi sağlayan en son teknolojilerden biridir. Doku homojenizasyonu ile mekansal bilginin kaybolması sorunu, dokunun kimyasal ve mekansal bütünlüğünü koruduğu için bu proteomik teknik ile aşılmıştır (15). MALDI-MSI yoluyla doğrudan protein analizinin en büyük dezavantajı, elde edilen sinyallerin tanımlanamaması ve bu nedenle yalnızca m/z değerleri olarak rapor edilebilmesidir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için proteinler, düşük moleküler ağırlıkları nedeniyle tespit edilmesi ve tanımlanması daha kolay olan peptitlerini elde etmek için enzimatik olarak sindirilir ve ardından MS tabanlı tekniklerle analiz edilir ve tanımlanır. LC-MS/MS tabanlı tanımlama, MALDI-MSI analizinden elde edilen peptitleri belirlemek için en sık kullanılan yaklaşımlardan birisidir (16). Bu yaklaşımda, bir doku kesiti MALDI-MSI tarafından incelenirken, aynı zamanda ardışık kesitten sağlanan örnek lizati, protein tanımlaması için LC-MS/MS ile analiz edilir. Farklı profiller (kanserli, travmatize vb.) içeren tek bir dokunun MALDI-MSI analizinden elde edilen verilerinin işlenmesi, SCiLS Lab gibi sınırlı sayıda programla mümkündür. Öte yandan, biyolojik örnek setlerinde veri işleme ve örnekler arasında doğru bir karşılaştırma yapabilmek için birkaç yazılım paketinin yardımıyla bir dizi veri yeniden düzeltilmesi (data recorection) önemli ve gereklidir.

Literatürde, hastalık hakkında daha fazla bilgi edinmek için HH transgenik fare modelleri, hücre dizileri ve klinik veya ölüm sonrası örneklerin kullanıldığı birçok proteomik temelli araştırma vardır. Diğer yandan, çeşitli nörodejeneratif bozuklukları araştırmak için MALDI-MSI tekniğini kullanan çalışmalar da mevcuttur. Bu tekniği kullanan güncel çalışmalar, proteinler, peptidler, lipidler, fosfolipidler ve glikanlar gibi biyolojik moleküllerin tanımlanması ve bunların hastalık patolojisi ile ilişkilerinin belirlenmesi veya nörodejeneratif dokularda hastalığa özgü biyobelirteçlerin araştırılmasını içermektedir. Yapılan ayrıntılı literatür araştırmasına göre, bugüne kadar farklı zaman noktalarındaki YAC128 farelerinden alınan beyin dokusu örneklerinde bölgesel proteom değişikliklerini MALDI-MSI tekniğini kullanarak araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, MALDI-MSI teknolojisini kullanarak, 3, 6 ve 12 aylık YAC128 transgenik farelerden ve bunların transgenik olmayan kontrollerinden alınan beyin dokusu örneklerinde mekansal proteomik değişiklikleri göstermektir. Bu amaçla, açık alan davranış testi kullanılarak lokomotor aktivite ve anksiyete değişiklikleri belirlenen 3, 6 ve 12 aylık farelerin beyin dokuları MALDI-MSI tekniği ile analiz edildi. Veriler, SCiLS Lab ve mMass yazılımlarının bir kombinasyonu kullanılarak işlendi. Her grup özelinde, farklı yoğunluklara sahip olduğu MALDI-MSI analizleri ile tespit edilen bazı proteinlerin doğrulaması yapıldı. Ayrıca, hastalığın daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmak için MALDI-MSI analizleri sonucu ekspresyonel farklılık gösterdiği tespit edilen proteinlerin yolak analizleri gerçekleştirildi ve HH nedeniyle 3, 6 ve 12 aylık dönemlerde gruplar arasında değişiklik gösteren en belirgin biyolojik süreçler ve moleküler yollar sunuldu.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Huntington Hastalığı

Huntington Hastalığı (HH), 4. kromozomdaki *htt* geninde CAG trinükleotit tekrarlarının genişlemesi sonucu çok işlevli *htt* proteininin mutant form kazanmasıyla oluşan, otozomal dominant kalıtım gösteren, motor ve davranış kombinasyonların bozulmasıyla birlikte nöronal disfonksiyon ve nöron ölümünün gözlemlendiği ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (17). Mutant *htt*, CAG genişlemesinden dolayı anormal derecede uzun bir poliglutamin (polyQ) dizisi içerir ve bu da proteinin, nöronların işlev bozukluğuna ve ölümüne neden olan toksik özellikler kazanmasına sebep olur. Striatumdaki orta spiny nöronlar, mutant *htt*'nin neden olduğu hasara karşı özellikle savunmasızdır, ancak HH, giderek tüm beyin ve vücudu saran bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bilinen genetik nedeni, hastalık için öngörüşel ve tanısal genetik testlere izin verir. Genellikle 30-40'lı yaşlarda ortaya çıkmasıyla birlikte, başlangıçta hastalarda çoğunlukla duygusal dalgalanmalar, sözlerin ağızda gevelenmesi, sakarlık, depresyon ve sinirlilik gözlenirken hastalığın ilerlemesiyle yutma zorluğu, düzensiz yürüme, denge kaybı, muhakeme gücünün bozulması ve bellek problemleri gözlemlenmektedir.

2.2 Tarihçe ve Epidemiyoloji

Hastalığın ismi, hastalığın kalıtsal olduğunu 1872 yılında ilk kez gözlemleyen Dr. George Huntington'un soyadından gelmektedir. Kore (Chorea) hastalığı olarak da bilinmektedir. Kore sözcüğü, Yunanca'da "dans etmek" anlamına gelir. Hastalıktan müzdarip kişiler, istemsiz olarak kol ve bacaklarını aşırı miktarda hareket ettirdikleri için, çok eskiden bu şekilde isimlendirilmiştir (18). Fakat sözcüğün küçük düşürücü olabileceği düşünüldüğü için bu şekilde anılmamakta, "Huntington Hastalığı" olarak bilinmektedir.

CAG tekrar genişlemesinin genetik açıdan doğrulaması, HH'nin modern epidemiyolojik ölçümlerinin ayırt edici özelliğidir. Doğru prevalans tahminleri, hastalık başlangıcının nörolojik değerlendirmesiyle birlikte kapsamlı genetik testlere

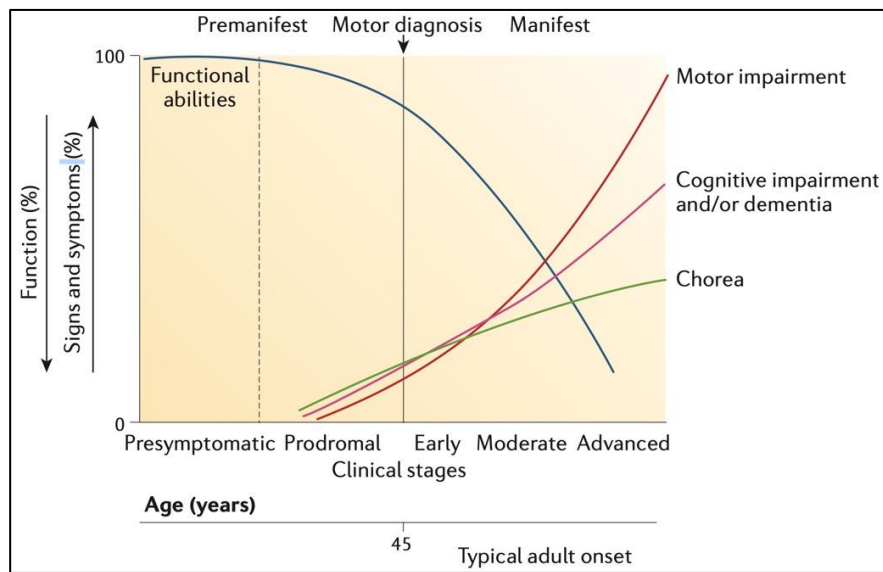
bağlıdır. Hem genetik hem de klinik teşhis standartlarını içeren prevelans çalışmaları, Batı popülasyonlarında 100.000'de 10.6-13.7 kişinin veya 7.300'de 1'inin etkilendiğini göstermektedir (19).

Genetik tanılardan yararlanan prevelans çalışmaları, tek başına klinik ölçümleri kullanan çalışmalara göre daha yüksek hastalık oranları bildirmektedir. Geniş çaplı analizler, son yirmi yılda HH'nin prevalansında tutarlı bir artış olduğunu göstermektedir ve bu, genetik testin daha geniş kullanılabilirliğiyle aynı zamana denk gelmektedir. Genetik testler özellikle, yaşlı popülasyonda aile öyküsünün genellikle eksik olduğu ve bu popülasyondaki bunama ve diğer nörodejeneratif bozuklukların daha yüksek oranları nedeniyle nörolojik tanının daha zor olabileceği geç başlangıçlı HH'nin tespit edilmesini sağlamıştır. Hastalığın insidansı göz önüne alındığında, Batı popülasyonlarında yılda bir milyonda 4,7-6,9 yeni vaka olduğu tahmin edilmektedir. HH tüm popülasyonlar için endemiktir, ancak Avrupa kökenli bireyler arasında çok daha yüksek frekanslarda görülür. Japonya, Hong Kong ve Tayvan'da, HH milyonda 1-7 kişide teşhis edilmektedir ki bu, Avrupa ve Kuzey Amerika'dakinin yaklaşık onda biri oranında daha sıktır. Güney Afrika'da siyahilerde, beyaz ve karışık soydan gelen alt popülasyonlardan daha düşük oranlarla hastalık gözlenmektedir. Afrika ve Asya'daki diğer popülasyonlardan elde edilen epidemiyolojik veriler, vaka çalışmaları veya yerel klinik incelemelerle sınırlıdır ve dünya çapındaki HH'nin genel prevalansı veya insidansı belirsizliğini korumaktadır (19).

2.3 Klinik Özellikler

Hastalığın en belirgin klinik özellikleri, motor, psikiyatrik ve kognitif bozukluklardır. En dikkat çekici motor bozukluk koreidir. Kore formundaki istemsiz hareketler hastalığın başlangıcında, kafa, kol ve bacaklarda düzensiz şekilde gözlenirken, hastalık ilerledikçe vücudun geneline yayılarak istemsiz ve sürekli kasılmalara dönüşür. Ortalama tanı yaşı yaklaşık 40'tır. 20 yaşından önce veya 65 yaşından sonra başlangıç nadir görülür. Semptomlar başladıktan sonra yaşam süresi genellikle 15-20 yıl kadardır (20).

Hastalığın evreleri semptomların gözlenmesine göre 3 ana başlık altında değerlendirilmektedir. Bunlar premanifest, motor tanı ve manifest dönemleridir (Şekil 1). Premanifest dönem, hastalığın teşhis edilebilir belirti ve semptomlarının ortaya çıkmasından önceki dönemini ifade eder. Premanifest dönemin öncesi presemptomatik evre olarak adlandırılır ve hastalarda herhangi bir belirti veya semptom gözlenmez. Değişken bir premanifest döneminden sonra, hafif motor, bilişsel ve davranışsal değişikliklerle karakterize olan prodromal evre, genellikle 15 yıla kadar motor başlangıcın resmi klinik tanısından önce gelir. Motor tanı dönemi, hastalığın tanısının artık koyulduğu dönemdir. Manifest dönem ise motor bozuklukların ilerlediği ve bilişsel bozuklukların gözlemlendiği dönemdir. Manifest dönem de çeşitli evreleri içerir. Erken evrede (early stage), kişiye HH teşhisi konulur ve hem evde hem de işte tam olarak çalışabilir. Erken orta derece evresinde (early intermediate stage), kişi istihdam edilebilir durumdadır ancak kapasitesi azalmıştır. Bazı zorluklara rağmen hala günlük işleri yönetebilmektedir. Geç orta derece evresinde (late intermediate stage), kişi artık çalışamaz veya ev sorumluluklarını yönetemez. Günlük mali işleri halletmek için önemli ölçüde yardıma ve gözetime ihtiyacı vardır. Diğer günlük aktivitelerde hafif zorluklar yaşayabilir, ancak genellikle çok az yardıma ihtiyacı vardır. Erken ileri evrede (early advanced stage), kişi artık günlük aktivitelerde bağımsız değildir, bakıma ihtiyacı vardır. İleri evrede (advanced stage), kişi günlük aktivitelerde tam desteğe ihtiyaç duyar ve genellikle profesyonel hemşirelik bakımı gereklidir (19).



Şekil 1. Huntington Hastalığı'nın evreleri (19).

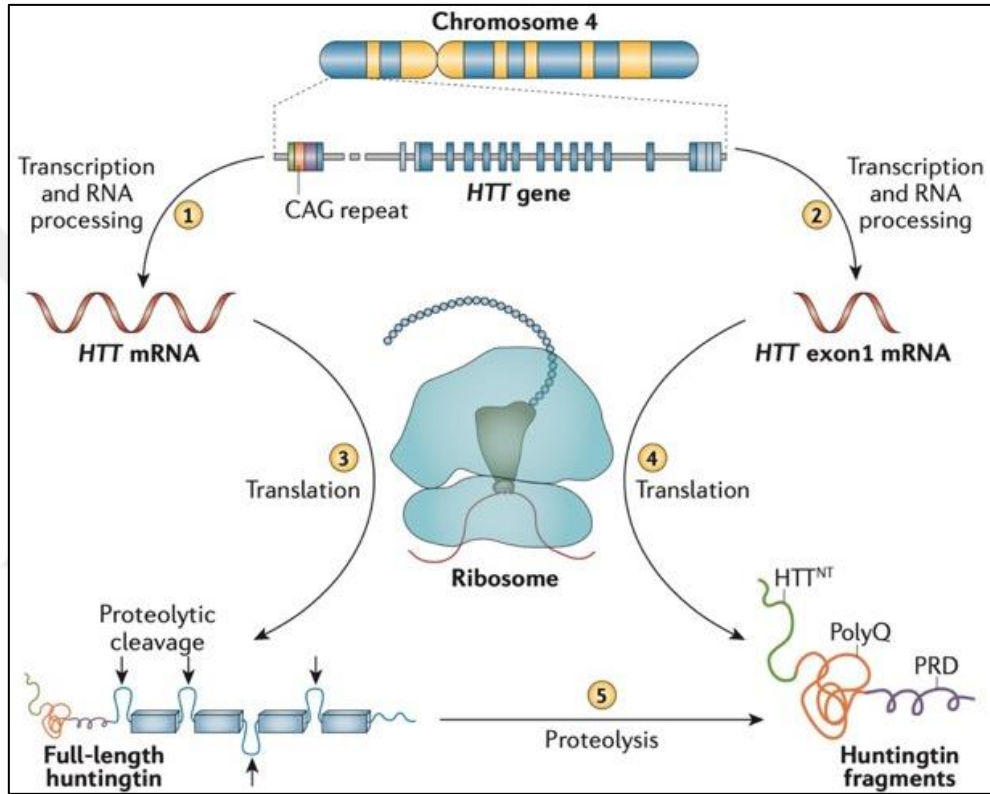
HH'nin erken evrelerinde, motor anormallikler hafif olabilir ve hastanın uyarılma durumuna bağlı olarak değişebilir. Psikiyatrik semptomların şiddeti HH'li kişilerde büyük farklılıklar gösterir. Son bulgular psikiyatrik sorunların özellikle çocukluk çağındaki vakalarda problemli olduğunu öne sürmektedir. Hastalıkta gözlenen depresyon genellikle tedaviye çok iyi yanıt verir, seçici serotonin geri alım inhibitörü olan antidepresanlar genellikle denenilen ilk ajanlardır (21).

Tanı anında, HH'li bireylerin çoğu nöropsikolojik testlerle kolayca ölçülebilen önemli bilişsel bozukluklara sahiptir. Bu ilk işaretler günlük yaşam faaliyetlerinin çoğunu engellemez. Her ne kadar epizodik hafıza bozulsun da, genel olarak hafıza, Alzheimer Hastalığı'na (AH) göre iyi korunmuştur. AH'deki demansın aksine HH'de, düşünce süreçlerinin başlatılmasında yavaşlık, yürüme işlevinde zorluklar, dikkat ve sıralama görevlerinde problemler ile karakterize büyük ölçüde subkortikal demans gözlenir. HH'deki bilişsel bozulmanın ilginç bir özelliği, kişilerin kendi semptomları ile ilgili olan farkındalık eksikliğidir. Açıkça HH belirtileri olan bazı kişiler, herhangi bir motor veya bilişsel zorluk yaşadıklarını inkar ederler. Farkındalık eksikliği, bozulmuş ön lob fonksiyonunun tipik bir belirtisidir ve spesifik frontal lob uyarılarını alan striatal nöronların erken işlev bozukluğunun bir göstergesidir (22).

2.4 Genetik Özellikler

4. kromozomun 4p16.3 bölgesinde *htt* geninin 1. eksonundaki CAG tekrarlarının genişlemesi hastalığın sebebidir. *htt*'nin ekspresyon basamakları Şekil 2'de gösterilmiştir. Normalde tam uzunluktaki *htt* proteinini üretmek için tam uzunluktaki *htt* geni transkribe edilerek *HTT* mRNA transkripti oluşturulur (Şekil 2.1). Eğer gen genişletilmiş bir CAG tekrarı içeriyorsa, sadece ekson1 kısmı transkribe edilerek *HTT* ekson1 mRNA transkripti oluşturulur (Şekil 2.2). Translasyonla tam uzunluktaki *HTT* proteini (Şekil 2.3) veya *HTT* ekson1 proteini (Şekil 2.4) üretilir. *HTT* ekson1 fragmenti (*HTT* ekson1 mRNA'sından transkribe edilmiş), 17-amino asitlik karışık bir *HTT*^{NT} dizisinden, CAG tekrarı tarafından kodlanan poliglutamin (polyQ) dizisinden ve prolin bakımından zengin bir alandan (proline-rich domain, PRD) oluşur. Tam uzunluktaki *HTT* proteini (*HTT* mRNA'sından transkribe edilmiş) ise, bu ekson1 dizisi ve bu diziyi takip eden bir dizi sıralı (Şekil 2'deki kutular) ve düzensiz (Şekil 2'deki

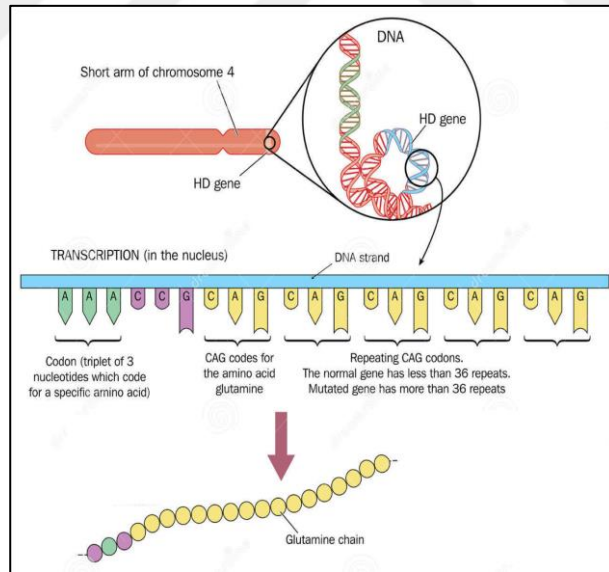
döngüler) protein segmentinden oluşur. Düzensiz bölümlerde (Şekil 2'deki döngüler) bulunan tanıma dizilerinin aracılık ettiği bölgelerden proteolitik bölünme (yaygın bir post transkripsiyonel modifikasyonlardan birisidir) sonucunda *HTT* ekson1 benzeri fragmentler dahil olmak üzere bir dizi ürün üretilir (Şekil 2.5). Genişletilmiş polyQ segmentleri içeren bu tür fragmentler, henüz aydınlatılamayan moleküler mekanizmalar tarafından hastalığın tetiklenmesinde önemli rollere sahiptir (19).



Şekil 2. *huntingtin* geninin ekspresyon basamakları (19).

Mutasyona uğramış genin transkripsiyonu, genellikle 7-36 CAG tekrarı arasında değişen normal polimorfizm uzunluğunun ötesinde *htt* proteininin N terminali de glutamin zincirinin (PolyQ) uzamasına neden olur (Şekil 3). Spesifik primerlerle basit PCR yapılarak CAG tekrarlarının uzunluğu her bireyde tespit edilebilir. 6-35 arasındaki CAG tekrarı; normal popülasyonda polimorfiktir. 36-39 CAG tekrarına sahip bireyler, klinik olarak tanımlanmaksızın normal yaşam sürerler. >40 CAG tekrarı ise motor belirtilerin başlamasıyla hastalığıdaki tüm semptomların gözlenmesinin sebebidir (19).

CAG tekrar uzunluğu, HH semptomlarının başlama yaşı ile ters orantılıdır. Daha erken ve geç başlangıçlı hastalık biçimleri tipik olarak farklı motor semptomlar gösterdiğinden, tekrar uzunluğundaki farklılıklar kısmende olsa heterojen fenotipi açıklar. 50 yaşın üzerindeki artan yaşla birlikte tekrar uzunluğunun başlangıç yaşı üzerindeki etkisi azalmaktadır. Genişletilmiş tekrar uzunluğu, başlangıç yaşındaki değişkenliğin yaklaşık %50'sini oluşturur. Tekrarlama uzunluğu ile güçlü bir şekilde ilişkili olan başlangıç yaşının aksine, hastalık ilerlemesi oranı tekrar uzunluğu ile ikna edici bir şekilde ilişkili değildir. Ortalama CAG tekrar uzunlukları, Avrupa kökenli insanlarda 18.4-18.7 tekrarlardan, Doğu Asya'da sadece 17.5-17.7'ye ve Afrika popülasyonlarında 16.9-17.4'e kadar uzundur. Prevalansı düşük olan popülasyonlarda, genişletilmiş CAG tekrarları nadirdir ve daha düşük bir de-novo mutasyon oranını düşündüren yerel haplotiplerin bir karışımı üzerinde meydana gelir. Avrupa kökenli bireylerde daha uzun CAG tekrarlarının sebebinin, CAG tekrar genişlemesi ve de-novo *htt* mutasyonunun daha yüksek oranlarda gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (22).

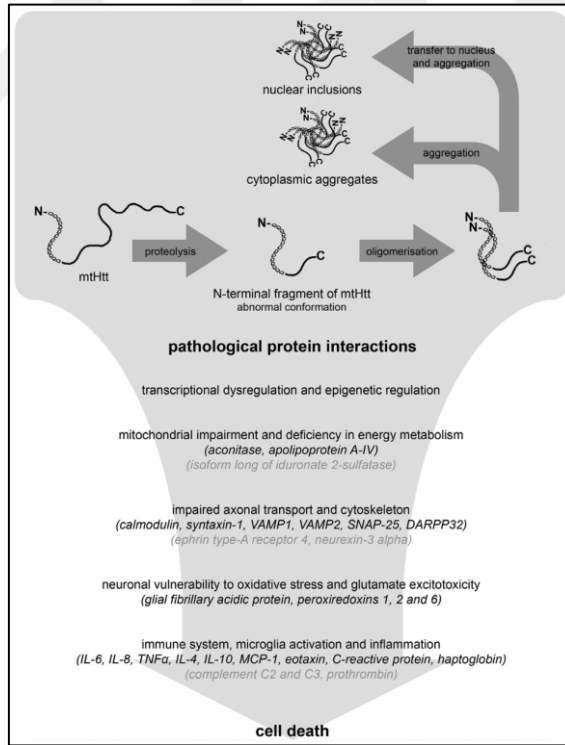


Şekil 3. *huntingtin* proteini üretiminin şematik gösterimi.

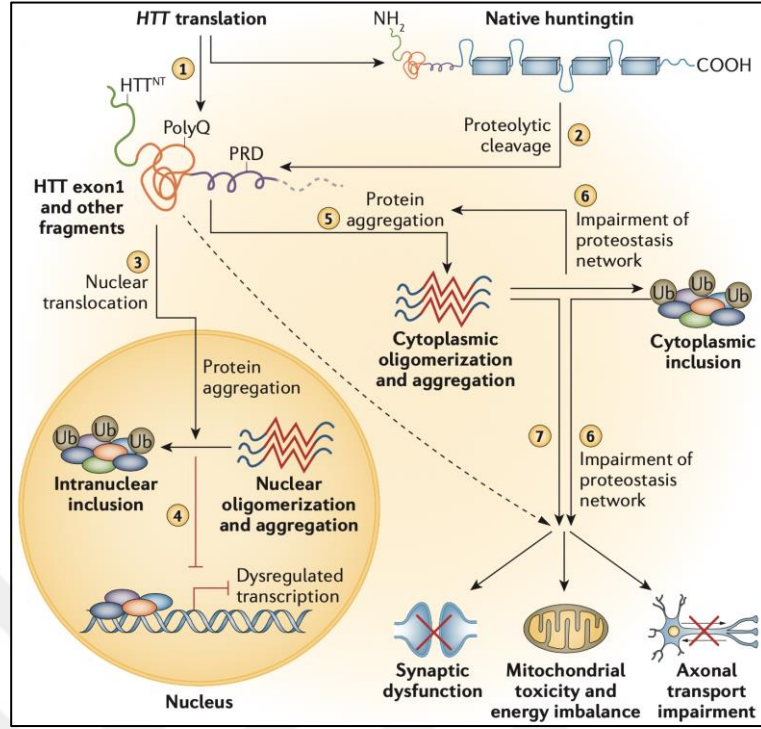
2.5 Hastalığın Moleküler Genetiği ve Patolojisi

htt proteininin yanlış katlanması ve agregat oluşumuna bağlı nörotoksikolojik süreçlerin yanı sıra HH için kritik olan patolojik süreçler Şekil 4'te gösterilmiştir (23).

Ayrıca HH'deki patojenetik hücresel mekanizmalar Şekil 5'te özetlenmiştir (19). *HTT*, tam uzunluktaki *htt* proteininin (native huntingtin) yanı sıra bir amino-terminal *HTT* ekzon1 fragmentini (hatalı splicing sonucu) üretmek üzere transle edilir (Şekil 5.1). Bu proteinlerdeki poliglutamin (polyQ) uzunluğu, somatik kararsızlığın derecesine bağlıdır. Tam uzunluktaki normal *htt*, ek protein fragmentleri oluşturmak için proteolitik olarak parçalanır (Şekil 5.2). Protein fragmentleri çekirdeğe girer (Şekil 5.3). Fragmentler, kendi kendine birleşme, oligomerizasyon ve agregasyon yoluyla çekirdekte tutulur. Bu da inklüzyonların oluşumuna yol açar (Şekil 5.4). *htt* fragmentleri, sitoplazmada oligomerize olur ve agregat oluşturur (Şekil 5.5). *htt*'nin agregasyonu, proteostaz ağının (proteomun dinamik düzenlenmesi) hastalık kaynaklı bozulmasından dolayı şiddetlenir ve bu da global hücresel bozukluklara yol açar (Şekil 5.6). *htt*'nin anormal formları, sinaptik işlev bozukluğu, mitokondriyal toksisite ve hasarlı aksonal taşıma dahil olmak üzere ek hücresel bozukluklara neden olur (Şekil 5.7).



Şekil 4. HH'de nörotoksisiteyi, patolojik süreçleri ve protein agregasyonunu gösteren şematik diyagram (23). Süreçler içerisinde HH'den etkilendiği belirlenen bazı proteinler (sırasıyla siyah ve gri ile yazılmış olanlar, bağımsız tekniklerle doğrulanmış ve doğrulanmamış olanlar) de mevcuttur.



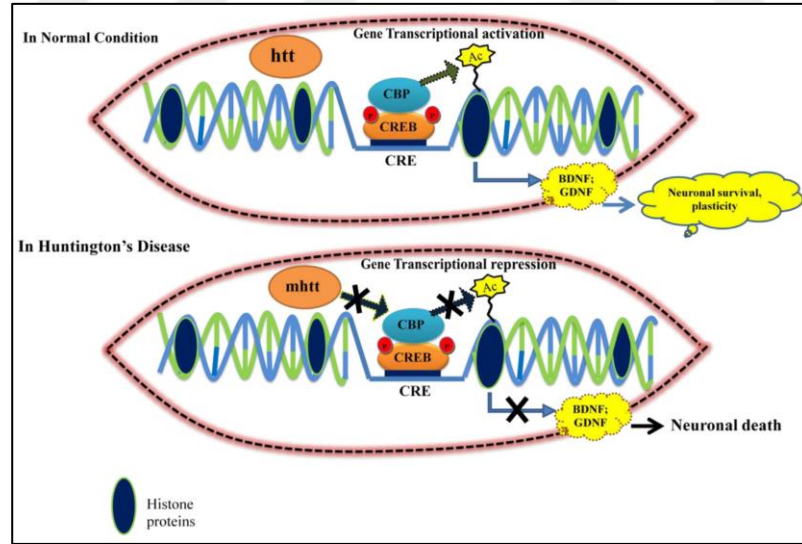
Şekil 5. HH'deki patojenetik hücresel mekanizmalar (19).

2.5.1 Mutant protein agregasyonu

Mutant protein fragment agregasyonu, moleküler şaperonlar veya ubiquitin-proteazom sisteminin bileşenleri ile etkileşime girip koruyucu veya telafi edici olmasının yanı sıra toksik te olabilir. Agregatlar, PolyQ proteinlerinin diğer hücre bileşenleriyle etkileşimini engelleyebileceği için bir başa çıkma mekanizması olarak koruyucu, etkileşime girdiği proteinler kendi işlevlerini yapamayacakları için toksik olabilirler. Bu sistemlerle yanlış katlanmış proteinin yok edilme işlemi yeterince etkili olmayabilir. Bu durum nöronal disfonksiyonu etkileyebilecek otofajiye neden olabilir. Agregasyon-toksisite arasındaki ilişki çözülemese de; agregatların patolojik markerlar olduğu netleştirilmiştir (24). 1997'de HH ile çalışan gruplar, HH hastalarının ve fare modellerinin nöron nükleuslarında agregatlar (nöronal inklüzyon cisimleri=NIIs) gözlemlemişlerdir. Geç başlangıçlı olgularda daha az nükleus içi ve daha çok sitoplazmik agregatların gözlenmesi nöronal inklüzyon cisimlerinin yanı sıra sitoplazmik agregatların da nöronal disfonksiyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (25). Nöron uzantılarında konumlanmış agregatlar aksonal taşımaya engel olarak dejenerasyona yol açabilir (26).

2.5.2 Transkripsiyonel disregülasyon ve epigenetik regülasyon

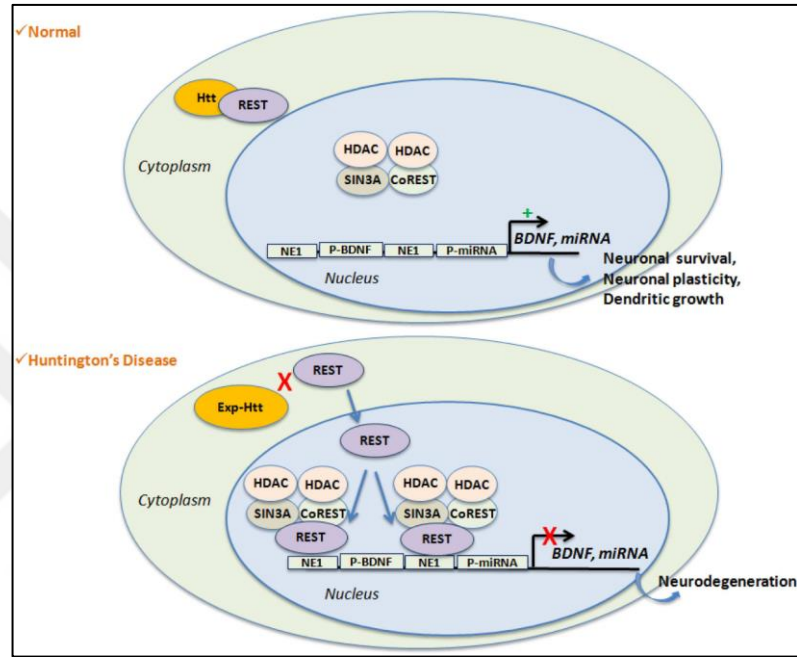
Çekirdekte akümüle olan mutant *htt* ve N-terminal PolyQ fragmentleri, c-AMP Responsive Element Binding Protein (CREBP), p53, Specifity Protein 1 (SP1) ve Transcription Initiation Factor TFIID subunit 4 (TAFII130) gibi çoklu genlerin düzenlenmesinde yer alan transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girebilir (26–30). Bu etkileşimler transkripsiyonel düzensizliğe yol açar (31). CREB bağlayıcı protein (CBP), histon asetiltransferaz aktivitesine sahiptir. Bu aktiviteyle kromatin yeniden yapılanması ve epigenetik düzenleme üzerinde etkilidir. Normal fizyolojik koşullar altında, normal *htt* proteini, CBP'nin asetiltransferaz aktivitesine müdahale etmez ve bu nedenle histonların asetilasyonu, transkripsiyonel aktivasyona ve ardından nöronal büyüme ve hayatta kalma için gerekli olan BDNF (Brain derived neurotrophic factor), GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) gibi nöroprotektif genlerin ekspresyonuna neden olur. Ancak HH'de mutant *htt*, CBP'nin asetiltransferaz aktivitesini inhibe eder. Bu durum, nöroprotektif genlerin transkripsiyonun baskılanmasına yol açar ve nöronal ölümle sonuçlanır (Şekil 6).



Şekil 6. HH'de transkripsiyonel düzensizliğin mekanizmaları (31).

Mutant *htt*, kodlanmayan miRNA'ların ekspresyon ve regülasyonunu da etkiler (Şekil 7). Birçok nöronal miRNA, BDNF gibi nöronal sağ kalım faktörlerinin sitoplazma içindeki transkripsiyonel baskılayıcısı olan REST (RE1-silencing

transcription factor) ile kontrol edilir. Normal *htt*, sitoplazma içindeki transkripsiyonel bir baskılayıcı olan REST ile etkileşime girer ve BDNF'in transkripsiyonuna izin verir. *htt*'nin genişlemesi, REST ile olan bağımlı bozar ve RE1 sitesindeki repressör kompleksinin oluşumu ile birlikte REST'in nükleer girişini kolaylaştırır. mutant *htt* REST'i çekirdek içinde tutarak BDNF transkripsiyonunu engeller ve RE1 sitesinin aktivasyonu, hedef gen susturma ile sonuçlanır ve nörodejenerasyona sebep olur (32).



Şekil 7. REST aracılı gen regülasyonu (32).

2.5.3 Mitokondri hasarı ve enerji metabolizmasındaki bozulma

HH hasta örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar, striatumdaki akonitaz enziminde ve oksidatif fosforilasyon komplekslerinin enzimatik aktivitelerinde önemli bir düşüş olduğunu göstermiştir (33). Bu da HH hastalarındaki hasarlı enerji metabolizmasını açıklamaktadır. Ayrıca, polyQ'nun aracılık ettiği mitokondriyal kalsiyum hasarlarının bir sonucu da mitokondriyal membran depolarizasyonudur. Ki bu kaspazları aktive eder ve *htt* yıkımıyla sonuçlanır. Bu nedenle, bu işlem, *htt* aracılı nörotoksisitenin başlatılmasına katkıda bulunabilir (34). HH hastalarının pozitron emisyon tomografi taramaları, aynı zamanda, korteksin belli bölgelerinde ve striatum boyunca serebral glukoz metabolizması oranlarında belirgin bir azalma olduğu için, hatalı enerji

metabolizması hipotezini kuvvetle desteklemektedir (35). Beyinde yüksek oranda eksprese edilen peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör- γ koaktivatör 1 α (PGC-1 α)'nın önemli mitokondriyal genlerin ekspresyonunu düzenleyebildiğinin gösterilmesi, mitokondriyal hasar ile transkripsiyonel işlev bozukluğu arasında bir bağlantı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca PGC-1 α nakavt fareler, striatal nörodejenerasyonun kanıtını sağlamıştır (36).

2.5.4 Hasarlı aksonal transport ve hücre iskeleti

Nöronal hücre gövdesi gen transkripsiyonunu ve protein translasyonunu sağlarken, uzun aksonlar elektriksel sinyalleri aktarır ve sinapslar için gerekli birçok protein ve diğer bileşenlerin anterograd (hücre gövdesine doğru taşıma) veya retrograd (hücre gövdesinden uzağa doğru taşıma) aksonal taşınmasına aracılık eder. Bu taşıma işlemleri hücre iskeleti proteinleriyle desteklenir (kinesin anterograd, dynein retrograd). Anterograd taşınmanın bozulması, genellikle kargo birikimi, nöronal işlev bozukluğu ve dejenerasyon ile sonuçlanır (37). *huntingtin*-ilişkili protein 1'in BDNF veziküllerine bağlanması, vezikülün akson boyunca taşınmasını kolaylaştırır. Mutant *htt* varlığında ve normal *htt* seviyesinin azaldığı durumlarda BDNF taşınması azalmaktadır. Bozulmuş aksonal taşınımın alternatif açıklaması, birikmiş otofagozomlar nedeniyle aksonal taşınımın yapısal kısıtlaması olabilir (38).

htt proteini direkt olarak dynein motor protein kompleksi ile etkileşime girebilir, bu da poliglutamin ile genişletilmiş *htt* proteininin bu aksonal taşıma yolunun normal çalışmasına müdahale edebileceğini düşündürür. Alternatif olarak, yanlış katlanmış *htt* proteini agregatlar oluşturabilir ve yolda tıkanmalar yaratabilir (39).

2.5.5 Oksidatif stres ve glutamat eksitotoksitesine karşı nöronal hassasiyet

HH beyindeki dejenerasyon bölgelerinde oksidatif hasar ürünlerinin önemli ölçüde arttığına dair kanıtlar ve hayvan modellerindeki artan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin varlığı, bu tür faktörlerin HH patogeneze katkısını açıkça göstermektedir (40). HH post-mortem doku ve transgenik fare modellerinde yapılan çalışmalar, mutant *htt* ekspresyonu ile değişmiş glutamaterjik nörotransmisyon arasında bir

korelasyon olduğunu öne sürmüştür. Korteksten glutamat sinyallerini ve substantia nigradan dopamin sinyallerini alan MSN'ler (medium spiny nöron), glutamatın toksisitesine (eksitotoksosite) seçici olarak hassastır ve HH ile ilişkili nörodejenerasyonun nedensel bir kanıtı olarak kabul edilmiştir. Buna göre dopamin taşınımının nakavt edilmesi dopamin seviyesinin yanısıra MSN kaybını artırır iken glutamat aktivitesinin azalması MSN aktivitesini restore eder (41).

2.5.6 İmmün sistem, mikroglia aktivasyonu ve enflamasyon

Mutant *htt* aynı anda pekçok yerde bağışıklık aktivasyonunu uyarır. Merkezi sinir sisteminde, periferde ve moleküler seviyede enflamasyona neden olabilir. Merkezi sinir sisteminde mutant *htt*, hücrelerin göçünü etkiler ve mikroglia aktivasyonuna neden olur. Aktif mikroglia, kendi yüzey proteinlerini daha fazla eksprese eder, proteazlar salgılar, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini ve IL-6, IL-1 β , IL-8 ve TNF α gibi pro-enflamatuar sitokinleri serbest bırakır (42–44). Post-mortem HH beyinlerinde yapılan bir çalışma, reaktif mikroglia varlığının, striatum ve kortekste önemli olduğunu göstermiştir (45). Ayrıca, in vivo görüntüleme ile, presemptomatik HH beyinlerinde mikroglia aktivasyonunun varlığı ve mikroglial reaktivitenin hastalık şiddeti ile tutarlı şekilde arttığı gösterilmiştir (46,47).

Mikroglial anormalliklerin, insan HH'si kompleman (complement) sisteminin aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (48). Bu sistem, doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir parçası olarak bilinir ve birçok nörodejeneratif hastalıkta hiperaktif edilir. HH'de kompleman sistem, mutant *htt* tarafından aktive edilebilir ve RT-PCR tekniğinin kullanıldığı bir çalışmada, klasik kompleman yolağı bileşenlerinin yanı sıra kompleman inhibitörleri ve membran inhibitörlerinin, kontrollere kıyasla HH beyinlerinde çok daha yüksek seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir (49). Reaktif mikroglia tarafından salınan nörotoksik veya nöroprotektif moleküller, karmaşık etkileşimleri başlatan nöronları ve glial hücreleri etkiler.

2.6 Normal *htt* Proteininin Hücreki Fonksiyonu

Normal *htt* proteini; 348kDa boyutunda ve 3144 aminoasitten oluşur. Protein formları çekirdekte ve sitoplazmada bulunabilir ve *htt* bu bölmeler arasında yer değiştirir. Hücre tipine bağlı olarak farklı seviyelerde eksprese edilir. Hücre içinde nükleer eksport-inport, ubiquitin aracılı proteolizis, apoptoz, sinir sistemi gelişimi, BDNF üretimi ve transportu gibi işlevlere katılır. Bu işlevlerde proteinin spesifik biyokimyasal fonksiyonları ve bu biyokimyasal fonksiyonların yapısal temeli büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu işlevler genellikle mutasyona uğramış *htt*'nin varlığından etkilenir. *htt* proteini hücrede toplamda 233 protein ile direkt etkileşim halindedir (23).

2.7 Tedavi

Günümüzde, HH'nin ilerlemesini yavaşlatmak veya tersine çevirmek için uygulanan hiçbir tedavi yoktur. FDA onaylı tetrabenazine diskinezia; istemsiz hareketleri azaltmak için kullanılmaktadır. İlacın yan etkileri depresyon ve sedasyondur. *htt* geninin baskılanması, agregasyonun inhibisyonu, *htt* agregatlarının çözülmesi nörotoksisiteyi önemli ölçüde iyileştirebilir. Nöroprotektif stratejilerin klinik semptomlar gözlenmeden önce uygulanması için gelişmesi gerekir. Muhtemelen beyindeki nörodejeneratif sürecin başladığı zamandan önce, hatta HH'nin ilerlemesini geciktirmek ve ilerlemesini yavaşlatmak için uygulanmalıdır. Proteotoksisite (agregasyonun inhibisyonu) veya transkripsiyonel disregülasyon (HDAC inhibisyonu) gibi mutant *htt* patogenezinin daha proksimal ve tipik mekanizmalarını hedefleyerek genel antioksidan ve antiexcitotoxic ilaç stratejilerini tamamlayacak yeni bir ilacın geliştirilmesi, mutant *htt* nörotoksisitesini önemli ölçüde iyileştirebilir (23).

2.8 Huntington Hastalığı'nı Araştırmada Kullanılan Fare Modelleri

Fare, insan nörodejeneratif hastalık modeli için ideal memeli organizmadır. Küçük boyut, kısa jenerasyon süresine sahip olmaları, genetik manipülasyonlara açık olmaları ve insan genomuyla oldukça benzer bir genoma sahip olmalarından dolayı

deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılırlar. Basit nöronal devrelere ve nöronal hücre tiplerine sahiptir. Bu hücre tipleri HH için seçici hedeflerdir.

2.8.1 N-terminal transgenik model

Pronükleer mikroenjeksiyon yoluyla oluşturulmuş olan bu fareler, insan *htt* geninin CAG tekrarlarını içeren 5' kısmını içerirler. Fenotipi çok erken gösterirler ve yaşam süreleri kısadır. R6/1, R6/2, N171-82Q modelleri örnek olarak verilebilir.

2.8.2 Knock-in model

Fare embriyonik kök hücreleri kullanılarak homolog rekombinasyon teknikleriyle oluşturulur. CAG tekrarlarının belli sayısı gen içine direkt aktarılır. Bu yüzden CAG boyutunun etkisini araştırmada kullanılır. İyi kontrol edilmiş gen dozajı içerdiklerinden ve orantılı ekspresyon düzeyleri açısından avantajlıdır. HdhQ111, HdhQ150 modelleri örnek olarak verilebilir.

2.8.3 Full-length transgenik model

BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ya da YAC (Yeast Artificial Chromosome) vektörleri taşırlar. Tam uzunluktaki insan *htt* genini içerirler. Hastalık fenotipini aylar içerisinde yavaş yavaş gösterirler. Hayatta kalma süreleri normaldir. İnsan *htt* geninde direkt olarak hedeflenmiş deneysel terapilerde kullanılır. YAC128, BAC-HD modelleri örnek olarak verilebilir.

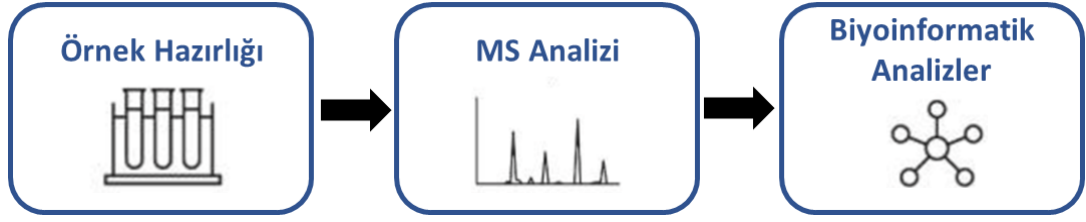
2.8.3.1 YAC128

Patolojik olarak beyin ağırlığında azalma ve striatal ve kortikal hacimlerinde küçülme olması nedeniyle HH çalışmalarında kullanım için uygun bir modeldir. 3. ayda aşırı hareketlilik, 6. ayda motor işlevselliklerde bozulma ve 12. ayda hareketlerde yavaşlama gösterirler. YAC128 fareleri, serinin en yenisidir ve tüm YAC modelleri arasında bugüne kadarki en sağlam fenotipleri sergiler; bu nedenle YAC128, HH'de prelinik bir model olarak kullanılır (11).

2.9 Proteomik Çalışmalar

Proteom, bir organizma veya sistem tarafından üretilen veya değiştirilen tüm protein setidir. Proteomik, proteinleri tanımlamak ve ölçmek için güçlü bir yaklaşımdır ve aynı zamanda biyolojik sistemlerin karmaşık mekanizmalarını anlamamızı ve yorumlamamızı sağlayan bir alandır. Proteomik, proteinlerin hangi biyolojik süreçlerde yer aldığı, diğer proteinlerle nasıl etkileşime girdiği ve hücre içinde nerede ve nasıl lokalize olduğu gibi önemli biyolojik bilgiler sağlar. Literatürde, hastalık hakkında daha fazla bilgi edinmek için HH transgenik fare modelleri, hücre hatları ve klinik veya post-mortem örneklerin kullanıldığı proteomik temelli çalışmalar mevcuttur (50). HH ile ilgili proteinler ayrıca birkaç farklı proteomik yaklaşım kullanılarak tanımlanmıştır (51,52). Kütle spektrometresi (mass spectrometry, MS), bir asrı aşkın süredir var olan bir kimya tekniğidir ve bununla birlikte Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ve Matriks Destekli Desorpsiyon/İyonizasyon (MALDI) gibi daha modern iyonizasyon yöntemleri kullanıma sunulana kadar proteinler yaygın olarak analiz edilmemiştir. Bu yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması ilk olarak John Fenn (ESI) ve Koichi Tanaka (MALDI) tarafından gerçekleştirilmiştir. Her ikisi de yenilikçi teknolojiler olduğu için araştırmacılara 2002 yılında Nobel kimya ödülü verilmiştir (50).

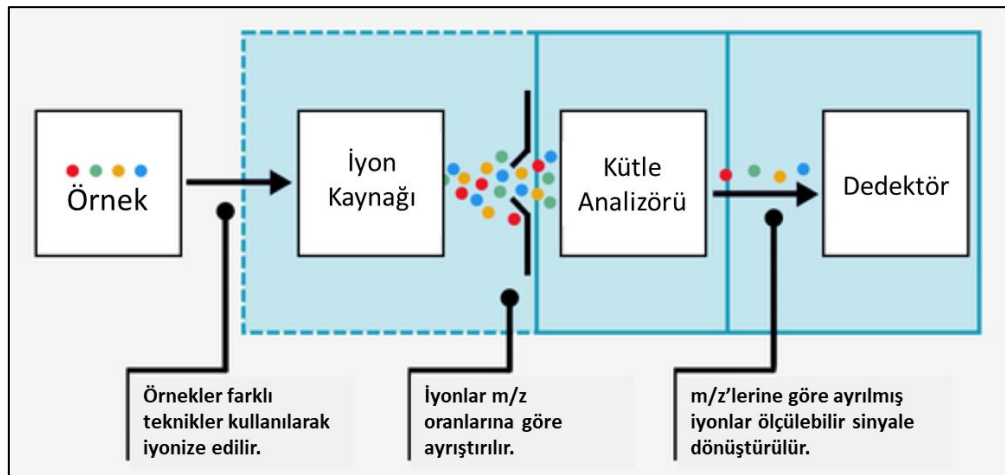
MS tabanlı proteomiks, karmaşık biyolojik numunelerdeki proteinlerin tanımlanması, miktarının belirlenmesi ve karakterizasyonu için güçlü bir araçtır (53). MS tabanlı proteomikte proteinlerin enzimatik proteolizinden sonra MS tarafından tanımlandığı aşağıdan yukarıya (bottom-up) stratejisi sıklıkla kullanılmıştır (54). Bu strateji yüksek proteom kapsamı sunması ve hızlı tarama oranı sağlaması gibi avantajlara sahiptir. Planlanan bir MS tabanlı proteomik çalışma temel olarak 3 basamakta gerçekleştirilir (Şekil 8). Bu basamaklar örnek hazırlığı, MS analizi ve analiz sonrası biyoinformatik analizlerin yapılmasıdır ve her bir basamak için çok çeşitli uygulamalar mevcuttur (55).



Şekil 8. MS tabanlı proteomik çalışmanın temel basamakları.

2.9.1 Kütle spektrometresi (MS)

MS, moleküllerin kütle-yük (m/z) oranlarını ölçmek için kullanılan analitik bir araçtır. Tüm kütle spektrometreleri iyonlaşma kaynağı, kütle analizörü ve iyon detektörü olmak üzere üç ana bileşenden oluşur (Şekil 9). İyonizasyon kaynağı, peptit örneklerini iyonlara dönüştürmek için kullanılır. Farklı örnek türleri için kullanılabilen çeşitli iyonizasyon teknikleri vardır. İyonlar daha sonra kütle analizörü tarafından kütlelerine göre sıralanır ve ayrılır. Bu sinyal genellikle, molekül dedektörle etkileşirken üretilen indüklenmiş bir yük veya akım olarak ölçülür. Sonuçlar, x ekseninde gösterilen m/z değerleri ve y ekseninde gösterilen yoğunluk (intensite) /göreceli bolluk (relative abundance) olarak ifade edilir. Kütleler, daha çok Dalton (da) olarak bilinen birleşik kütle birimleri cinsinden ölçülür. Kütle/yük (m/z) oranları, spektral piklerin her birine kimlik sağlamak amacıyla bilinen değerlerin bir veritabanıyla karşılaştırılabilir (50).



Şekil 9. Temel kütle spektrometresi bileşenleri.

MS temelli araştırmalar, belirli soruları yanıtlamak için metodolojide büyük farklılıklar gösterir. MS'te örneklerin iyonizasyonu için yaygın olarak kullanılan iki teknik, proteinlerin analizini iyileştirmiştir. Bunlar ESI ve MALDI' dir. ESI'de peptidleri içeren sıvı, küçük damlacıklar üretmek için bir kapillerden elektrostatik olarak püskürtölür. Bu damlacıklar, buharlaşma ve ardından birbirini takip eden Coulomb patlamaları ile daha da küçölür ve damlacıklar tek bir makromolekül içerece kadar bu gerçekteşir (Coulomb patlamaları, ayrışmaya izin veren bir damlacığın yüzey gerilimi kuvvetlerinin üstesinden gelen coulomb itme kuvveti nedeniyle meydana gelir.). MALDI' de örnekler, agregasyonu azaltmak için işlev gören organik bir matriks ile çalışılır. Kullanılan laser kaynağının enerjisi matriks tarafından absorbe edilerek örnek lazer gücünden kaynaklanabilecek istenmeyen etkilerden korunmuş olur. Uygulanan laser ile matriks ve içerdğđ analitler buharlaşır ve iyonize olurlar (56).

Kütle analizörünün görevi iyonize kütleleri alıp kütle-yük oranlarına (m/z) göre ayırmaktır. İyonları ayırmak için farklı prensiplerde çalışan analizörler vardır (57) ve proteomikte en yaygın olarak kullanılanları, uçuş süresi (TOF; time-of-flight), dört kutuplu (quadrupole) ve orbitrap ve ya kombinasyon sistemleridir (tandem mass spectrometry). Kütle analizör seçimi, analitin iyonlaşma sonrası özelliklerine ve yapılan deneyin gerekliliklerine bağılıdır. Dört kutuplu kütle analizörleri, birbirinden eşit uzaklıkta ve eşit ve zıt potansiyellere sahip iki çift silindirik metal çubuktan oluşur. Her çubuk çifti, RF bileşeninin gücünün değıştirilebildiğı sabit bir doğru akım (DC) ve alternatif radyo frekansı (RF) bileşeni içerir. Kuadrupole giren herhangi bir iyonun yörüngesi, m/z değıeriyle orantılı bir şekilde potansiyel tarafından saptırılır. Belirli RF değıerlerinde, yalnızca belirli bir m/z değıeri alanla rezonansa girerek dört kutuplunun sonuna kadar ilerleyip algılanabilir. Diğđer m/z değıerlerine sahip iyonlar ise kuadrupol içinde çarpışır, yüklerini kaybeder ve algılanmaz (58). TOF analizörü, elektrik veya manyetik alan kullanmadan iyonları zamana göre ayırır. Kabaca TOF, durağan/hareketli faz olmaması dışında kromatografiye benzer, ve kütleleri ayırma, iyonların kinetik enerjisine ve hızına bağılıdır. Her kütle için uçuş süresi (t) benzersizdir ve bu süre bir iyonun hızlandırıldığı enerji (E), kat etmesi gereken mesafe (d) ve m/z tarafından belirlenir. Denklem, belirli bir kinetik enerji (E) için, daha küçük kütlelerin daha büyük kütlelerden daha yüksek hızlara sahip olacağını ifade eder.

Küçük kütleli iyonlar dedektöre daha erken ulaşır. Bu analizör lineer ve reflektör modlarda kullanılabilir. Daha yüksek kütlelerde, uçuş süresi daha uzun olacağı için rezolüsyon (çözünürlük) problemi ortaya çıkar. Ayrıca yüksek kütlelerde, aynı m/z değerlerine sahip iyonların tümü ideal TOF hızlarına ulaşmaz. Bu sorunu çözmek için genellikle analizöre bir reflektör eklenir. Reflektör, uçuş tüpünün ucuna yerleştirilmiş çok yüksek voltajlı bir dizi halka elektrottan oluşur. Bir iyon reflektöre girdiğinde, yüksek voltaj nedeniyle ters yönde yansıtılır. TOF kütle analizörleri orta düzeyde rezolüsyona sahiptir (10.000–40.000 FWHM) ve sık kalibrasyonla 5–25 ppm aralığında kütle doğruluğu sergiler (59). Orbitrap kütle analizörleri, kütle spektrometresinde neredeyse bir standart haline gelen yüksek çözünürlüklü (15.000–140.000 FWHM), yüksek doğruluklu (0.5–5 ppm) analizörlerdir. İyonlar, iğ şeklindeki elektrostatik hücreye verilir ve eksenel hareketlerinden kaydedilen görüntüleme akımı, değiştirilmeden kaydedilir. Orbitrap kütle analizörü sık sık kalibrasyon gerektirmez, bu da onu yüksek verimli ortamlarda çalıştırılan cihazlar için çok iyi bir seçim yapar (60). Proteomik örnekler, çok benzer analitlerin oldukça karmaşık karışımlarıdır (2000 protein türü–100000 peptit). Bu karmaşıklık içinde kesin ve doğru tanımlama yapabilmek için peptit dizisinin kütle spektrometresi içinde elde edilmesi gerekir. Peptitin diziye özgü degradasyonuna neden olan bir olayla birlikte birden fazla kütle analizörünün (tandem MS) kullanılması tanımlamadaki doğruluğu artırır (61).

İyon kaynağı ile iyonlaştırılıp kütle analizörü sayesinde ayrıştırılan iyonlar son aşama olarak dedektöre ulaşırlar. Elde edilen spektrumlar, öncü iyon (MS1) ve fragment iyon (MS2) spekturumları olarak adlandırılır (62).

2.9.1.1 LC-MS/MS çalışmaları

Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS), sıvı kromatografisinin fiziksel ayırma gücünü kütle spektrometresinin (MS) kütle analiz edebilme gücü ile birleştiren bir analitik kimya tekniğidir. Sıvı kromatografisi, birden fazla bileşen içeren karışımları ayırırken, kütle spektrometresi, ayrılan her bir bileşeni tanımlamaya yardımcı olabilecek spektral bilgiler sağlar (57). Bu ikili teknik, çevresel ve biyolojik kökenli karmaşık numunelerde yaygın olarak bulunan biyokimyasal, organik ve inorganik bileşiklerin analiz edilmesi için kullanılabilir. Bu nedenle sistemin

kullanımı, biyoteknoloji, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrileri dahil olmak üzere çok çeşitli sektörlerde tercih edilir (63).

LC-MS tabanlı proteomikte, karmaşık protein karışımlarının önce enzimatik parçalanmaya tabi tutulduğu, ardından elde edilen peptit ürünlerinin bir kütle spektrometresi kullanılarak analiz edildiği bottom-up stratejisi sıklıkla kullanılmaktadır. Standart bir bottom-up stratejisindeki temel aşamalar: 1) örnekten proteinlerin ekstraksiyonu, 2) kontaminantların ve bol miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması için fraksiyonlama, 3) proteinlerin peptitlere enzimatik sindirimi, 4) peptitlerin daha homojen bir karışımını elde etmek için sindirim sonrası ayırmalar (LC) ve 5) MS ile analizidir. Analiz sonrasında örnekteki proteinlerin tanımlanması ve bolluk seviyelerinin ölçülmesi gerçekleştirilir (64). LC-MS/MS sistemleri genel olarak ESI iyon kaynağı ile eşleştirilmiştir ve TOF, Quadrupole, Orbitrap ve ya bunların kombinasyonlarının (QTOF, TripleQ, TOF-TOF, Q-Orbitrap gibi) olduğu analizörler içerir (65,66).

Literatürde, LC-MS/MS tekniği kullanılarak, HH fare modeli ve insan örneklerinde çeşitli proteinlerin ekspresyonel farklılıklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (67–69).

2.9.1.2 MALDI-MS görüntüleme çalışmaları

MALDI-MS Görüntüleme (MSI) teknolojisi, hücrelerdeki, dokulardaki veya diğer örnek türlerindeki karmaşık moleküler karışımları yüksek kimyasal özgüllüğe sahip olarak değerlendirebilen ve küçük metabolitlerden proteinler gibi büyük makromoleküllere kadar geniş bir kütle aralığında çeşitli moleküler türlerin eşzamanlı analizine olanak tanıyan etkili bir araçtır. Bu teknoloji sayesinde kütle spektrometresinin analitik gücü ve mikroskobik bilginin birleşimi sağlanarak doku kesiti üzerindeki spesifik hücre tiplerinde meydana gelen moleküler değişimlerin gözlenebilmesi mümkün olmuştur. Moleküllerin eşzamanlı lokalizasyonu, translasyon sonrası modifikasyonların saptanması ve nispi niceliksel bilgiler tek bir deneyde elde edilebilir. MS tarafından oluşturulan görüntüler, doğrudan moleküler ölçümlerden elde edildikleri ve antikolar gibi hedefe özgü reaktiflere dayanmadıkları için

benzersizdir. MS tabanlı tanımlama için kütle doğruluğu ve kimyasal özgüllük ile mekansal dağılımları haritalamayı birleştirmesi, MSI'yı etkili bir keşif aracı haline getirir (70).

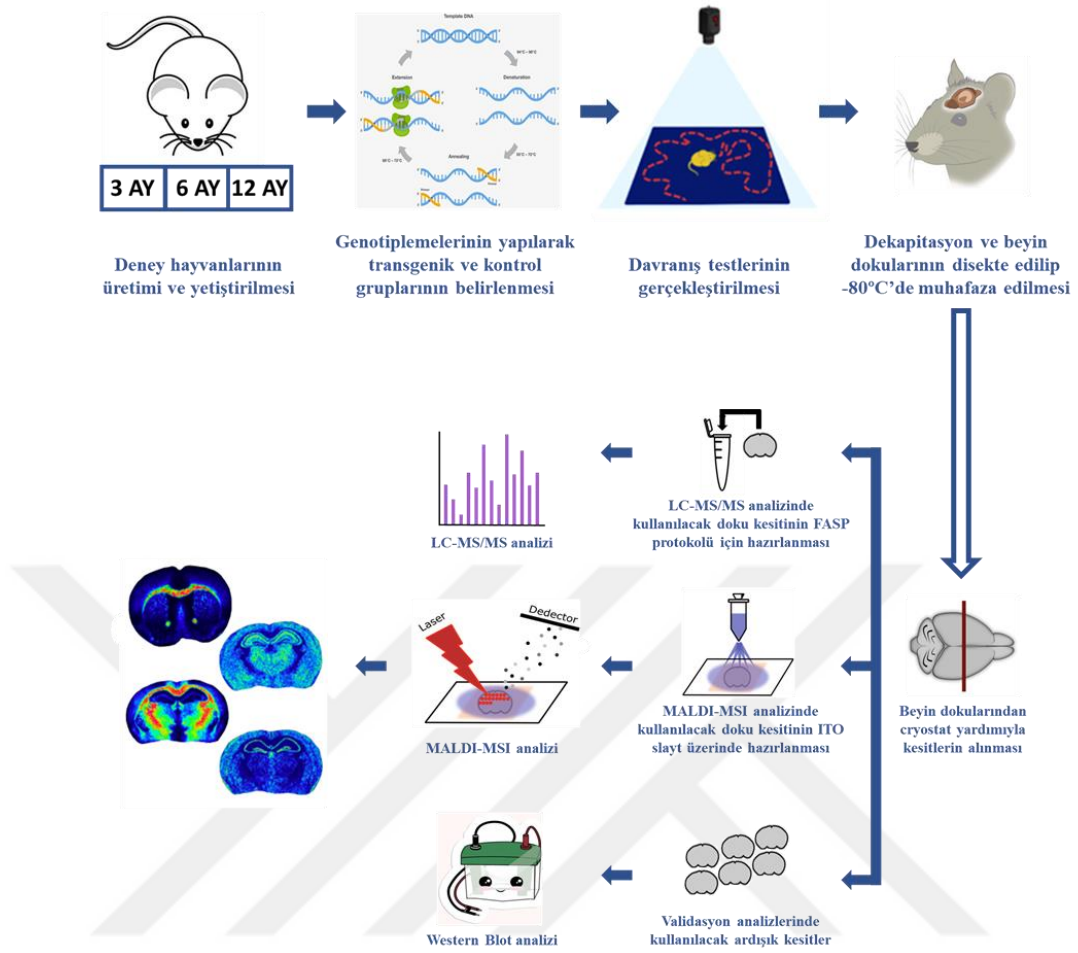
TOF analizörü ile birleştirilmiş MALDI-MSI sistemi kullanılan bir bottom-up analizinde temel aşamalar: 1) analiz edilecek dokudan uygun kalınlıklarda kesitin lam üzerine alınması, 2) kesit yüzeyindeki analizi etkileyecek kontaminantların uzaklaştırılması, 3) kesit yüzeyindeki proteinlerin peptitlere enzimatik sindirimi, 4) doku yüzeyinin lazer enerjisini absorbe edecek ve yüzeydeki analitleri gaz fazına geçirerek iyonlaştıracak uygun matriks ile kaplanması ve 5) MS analizidir (16). Kesit yüzeyine uygulanan lazer atışından sonra iyonlar, bir elektrik alanı tarafından hızlandırılırlar ve uçuş tüpü adı verilen bir serbest alan bölgesinde sürüklenirlerken TOF analizörü onları hızlarına göre ayırır. Ardından iyonlar dedektör tarafından tespit edilir ve m/z ve intensite değerlerini içeren spektral verinin yanısıra her ilgilenilen m/z değerleri için doku üzerindeki mekansal dağılımlarını gösteren görseller elde edilir.

MALDI-MSI yöntemi kullanılarak, proteinler (71), peptitler (72), lipidler (73), fosfolipidler (74) ve glikanlar (75) gibi biyolojik moleküllerin tanımlanması ve bunların hastalık patolojisi ile ilişkilerinin belirlenmesi veya nörodejeneratif dokularda hastalığa özgü biyobelirteçlerin araştırılması üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Literatürde, HH özelinde MALDI-MSI tekniği ile kontrol ve hasta örneklerinin kullanıldığı karşılaştırmalı olarak protein ve ya peptit temelli bir çalışmaya rastlanmaz iken lipid profillerinin karşılaştırıldığı ve lipidomik yapıdaki farklılıkları gösteren çalışmalar mevcuttur (76,77). Ayrıca hastalık için kullanılabilecek potansiyel bir tedavi ajanının kan-beyin-bariyerini geçip geçmediğini göstermek, etkilerini değerlendirmek ve dokudaki mekansal dağılımını incelemek amacıyla MALDI-MSI tekniği kullanılarak yapılmış bir çalışma mevcuttur (78). Bu çalışmalar dışında MALDI-MSI tekniği kullanılarak yapılmış HH'ye özgü bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Planı

Bu tez çalışmasında, Jackson Laboratuvarı'ndan sipariş edilen transgenik ve hibrit fareler DEHAM bünyesinde üretildi. Üretimi sağlanan farelerin genotiplemesi yapılarak transgenik olup olmadıkları değerlendirildikten sonra 3, 6 ve 12 aylık zaman dilimlerine kadar yetiştirilen YAC128 ve onların kontrol farelerine davranış testi uygulanarak motor anormalliklerin gelişimi değerlendirildi. Dekapitasyon ardından farelere ait beyin dokuları dikkatlice disekte edilerek sıvı azot üzerinde hızlıca dondurulduktan sonra analizler gerçekleştirilene kadar -80°C soğutucuda muhafaza edildi. Beyin dokuları ile MALDI-MSI, LC-MS/MS, validasyon analizleri gerçekleştirildi. Çalışmadaki iş akış planı Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. İş akış planı. Üretimi gerçekleştirilip belli zaman noktalarına kadar yetiştirilen farelerin davranış testlerinin yapılması takibinde beyin dokuları disekte edilmiştir. -80°C'de muhafaza edilen taze dondurulmuş dokular MALDI-MSI, LC-MS/MS ve validasyon analizleri için kullanılmıştır.

3.2 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri, malzemeler ve kimyasallar Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme	Marka, Model
0,5, 1,5 ve 5 mL Hacimli Kapaklı Tüpler	Eppendorf
5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler	Isolab
Azot Tankı	Thermo 30 Thermo Scientific
ChemiDoc MP System	Biorad
Cryostat	Thermo Scientific
Çalkalayıcı Isı Bloğu	Witeg Wisd Laboratory Instruments
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0,1-1000 µL)	Eppendorf
Derin dondurucu (-80C)	Haier Biomedical
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4C ve - 20C)	Kirsch Medical
Etüv (37°C - Proteomiks)	Hera Term Oven Thermo Scientific
ITO Kaplı Lam	Bruker
Jel Görüntüleme Cihazı	Chemidoc Imaging System Biorad
Lo-bind tüp	Eppendorf
LoBind Microcentrifuge Tube (1,5 mL)	Eppendorf
MALDI TOF/TOF Kütle Spektrometresi	RapifleX MALDI TissueTyper (Bruker)
Mikroskop	Axio Vert. A1 (Carl Zeiss)
Mini-PROTEON Tetra Cell nanoACQUITY UPLC	Waters
BEH C18 Column	
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	Waters
nLC-MS/MS Kütle Spektrometresi	nanoACQUITY UPLC M Class ile bağlı SYNAPT Xevo G2-XS (Waters)
PCR Cihazı	CFX Connect Real-Time PCR Biorad
PCR tüp (0,2 ve 0,5 µL)	Isolab
pH Metre	Thermo Scientific
Poly-L-lizin Kaplı Lam	Thermo Scientific
Thermo-shaker	Biosan
Trypsin ve Matriks Uygulama İstasyonu	SunCollect (SunChrom GmbH)
Ultrasonik işleyici	VialTweeter, HielScher

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alınan firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka/Kodu
Agaroz	Sigma, 9539
APS	Sigma, A3678
Asetonitril (LC-MS saflığında)	Merck,100030
BSA	Bruker, 8217498
Clarity Western ECL Blotting Substrate	Biorad, 170-5060
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Lab, SK-4100
Fluoromount aqueous mounting medium	Sigma, F4680
Formik Asit	Fluka, 94318
Glisin	Sigma, G8895
Glu1-Fibrinopeptide B Standart	Waters, 700004729
KCl	Sigma, P9333
Laemmlı Örnek Tampon Çözeltisi	Biorad, 1610737
Leu-Enkephalin IAA	Waters; 186006013
NaCl	Sigma, S7653
Paraformaldehit (PFA)	Sigma, 158127
PCR Primerleri	Sentromer DNA Teknolojileri
Peptit Standardı	Bruker, 8222570
Potasyum Fosfat, Monobazik	Merck, 529568
Proteaz inhibitör Kokteyli	Thermo Scientific, 78440
Renkli Protein Markerı	Biorad, 1610374
Renksiz Protein Markerı	Biorad, 1610363
SafeView DNA boyası	ABM, JK7947
SDS	Sigma, L3771
Sodyum Fosfat, Dibazik	Merck, 567547
Su (LC-MS saflığında LiChrosolve)	Merck, 115333
Taq PCR kit	Biolabs, E5000S
TEMED	Sigma, T9281
TGX Stain-Free Fastcast %12 Akrilamit Jel Kiti	Biorad, 161-085
Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit	Biorad, 161-0175
Trypsin	Thermo Scientific, 90057
Trypsin Gold	Promega, V5280
Tris/HCl	Sigma, T5941
Trizma Base Glasiyal Asetik Asit	Millipore, 648310
Tween20	Sigma, P1339
UPX Universal Protein Extraction Kit	Expedeon
Üre	Merck, 818710
Yükleme Boyası	Biolabs, 95502

3.3 Yöntem

3.3.1 Deney hayvanları

Bu çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU - HADYEK) 25.04.2016 tarihli ve 2016/13 sayılı etik kurul izni (Ek 1) çerçevesinde gerçekleştirilmiş olup, enstitü ve ARRIVE hayvan kullanım ve bakım rehberine uyulmuştur.

Çalışmada kullanılan transgenik ve hibrit fare modelleri Jackson Laboratuvarı'ndan (Bar Harbor, USA) temin edilmiştir. Transgenik ve kontrol farelerinin üretimi ve bakımı Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM)'da yapılmıştır. Deney hayvanlarının refahı, ortam parametrelerini kontrol altında tutan ve fareleri bulundukları ortamdan izole eden IVC (Individually Ventilated Cages) kafesler kullanılarak sağlanmıştır.

HH'nin temel özelliklerini taşıyan transgenik YAC128 fareler (FVB-Tg(YAC128)53Hay/J), yeni transgenik farelerin üretilmesi amacıyla hibrid FVB fareleri (FVB/NJ) ile çiftleştirildi (Tablo 3). Her bir YAC128 erkek fare, 3-4 adet dişi FVB fare ile; dişi YAC128 fareler de, erkek FVB fareler ile üretim kafeslerine bırakıldı. Çiftleşme ve gebelik dönemlerinin ardından, tüm farelerden verimli şekilde yavrular elde edildi.

Tablo 3. Fare Üretim Tablosu

Üretim Fareleri		Üretilen Fareler	
Transgenik Fareler	Hibrit Fareler	Transgenik Fareler	Hibrid Fareler
YAC128	FVB/NJ	YAC128	LM
FVB-Tg(YAC128)53Hay/J			

3.3.2 Genotipleme

Deneylerde kullanılacak HH modeli farelerinin üretimi sırasında tek batında hem heterozigot transgenik (YAC128) hem de transgenik olmayan (LM- Littermate) yavruların olması nedeniyle, doğum sonrası 20-21. günde yavruların genotipleme analizleri gerçekleştirildi. Çalışma için gerekli hayvan sayısına ulaşmak için yeterli sayıda üretim kafesi oluşturuldu ve elde edilen yavruların doku örnekleri kullanılarak daha önceden detaylı açıklanmış olan genotipleme protokolü (79) takip edildi ve transgenik ve LM fareler ayırt edildi. Genotipleme analizinin PCR basamağında kullanılmak üzere, YAC128 ve LM farelerde amplifiye olması beklenen internal pozitif kontrol ve mutasyonları taşıyan genlerin amplifikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan primerler Tablo 4'teki gibi hedeflenen genlere göre sentezletirilmiştir (Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti.,İstanbul). Kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları Tablo 5'te verilmiştir. Deney grubunda kullanılacak tüm fareler, PCR sonuçlarına göre transgenik-transgenik olmayan ve dişi-erkek şeklinde farklı kafeslere yerleştirildi ve 3, 6 ve 12 aylık zaman noktalarına ulaşana kadar yetiştirildi.

Tablo 4. Deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Baz Dizisi (5' > 3')	Primer Baz Sayısı	Tm (°C)	Ürün Beklenen Baz Sayısı
<i>Kontrol_Forward</i>	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	24	59,3	324
<i>Kontrol_Reverse</i>	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	25	61,3	324
<i>HTT_Forward</i>	CCG CTC AGG TTC TGC TTT TA	20	57,3	170
<i>HTT_Reverse</i>	TGG AAG GAC TTG AGG GAC TC	20	59,4	170

Tablo 5. Deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan PCR bileşenleri

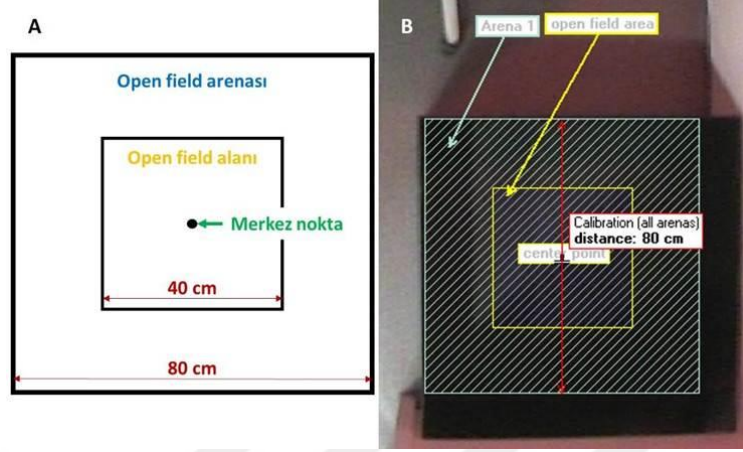
Reaksiyon Bileşeni	Negatif Kontrol (µl)	Test Grubu (1 örnek için) (µl)
ddH ₂ O	12,5	12,4
10x Reaction Buffer	2,4	2,4
dNTP	0,5	0,5
Kontrol-Forward	1,2	1,2
Kontrol-Reverse	1,2	1,2
HTT-Forward	1,6	1,6
HTT-Reverse	1,6	1,6
Template	4	4
Taq DNA polimeraz	-	0,125
	25	25

3.3.3 Açık alan (open-field) davranış testi

Hastalık modelinin, hastalık belirtilerini gösterip göstermediğini kontrol etmek için YAC128 ve LM farelere açık alan testi uygulandı. Açık alan testi, spontan lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranış ölçümünde kullanılan bir test olduğu için HH fare modelinin değerlendirilmesinde kullanıldı. Anksiyete benzeri davranışın değerlendirilmesinde merkez ve kenarlarda geçirilen süreler bu test ile ölçülebilir (80). Yapılan deneylerde, test hayvanının açık alan merkez alanında (40x40) ve düzenek kenarlarında geçirdiği süreler tespit edildi. Ayrıca farelerin hareketliliği ve ortalama hızları gibi parametreler göz önünde bulundurularak lokomotor aktiviteleri değerlendirildi.

Deneye başlamadan önce fare kafesleri, deney düzeneğinin bulunduğu odaya 30 dk önce getirildi ve farelerin davranış testinin yapılacağı ortama uyumları sağlandı. Fareler, gece-gündüz döngüsündeki gece fazının ilk yarısında test edildiler. Düzeneğin bulunduğu oda, motor eksiklikleri ortaya çıkarmaya yardımcı olduğu için kırmızı loş ışık ile aydınlatıldı (81). Açık alan test düzeneği, 80x80x40 cm boyutunda siyah pleksiglastan yapılmıştır. Deney protokolü olarak, platform zemininde bir dış alan (open field arena), bir open field alanı (40x40) ve bir de merkez noktası bilgisayar

yazılımı (EthoVision XT 9, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) kullanılarak oluşturuldu (Resim 1).



Resim 1. Açık alan (Open field) testi düzeneği. Test düzeneği, A'da şematik, B'de ise kamera görüntüsü olarak gösterildi. Sistemin programa tanıtılabilmesi için merkez nokta işaretlenerek, merkez alanın etrafında gerçekte var olmayan 40x40 cm boyutunda open field (açık alan) alanı ve sistemin tüm alanı için de 80x80 cm boyutunda open field arenası çizildi.

Test edilecek fare, kuyruğundan tutularak platformun ortasına yerleştirildi ve farenin hareketleri, platformun 230 cm yukarısında, yazılıma bağlı kamera ile kaydedildi. Her bir fare için, 10 dk takip yapıldı ve belirlenen parametrelere göre fare hareketleri ve hareket süreleri kaydedildi. Fareler arası geçişte platform önce %70 etanol, sonra dH₂O ile silindi ve kurutuldu.

3.3.4 MALDI kütle spektrometresi görüntüleme

3.3.4.1 Beyin dokularının eksizyonu ve saklanması

Davranış deneyleri tamamlanan tüm fareler izofluran kullanılarak anestezi altına alındı ve hızlıca beyinleri çıkartılarak, sıvı nitrojen üzerine yerleştirilmiş alüminyum folyo üzerinde donana kadar (~3-5 dk.) bekletildi. Tüm beyin dokuları, ileriki deneyler için -80°C dolabında muhafaza edildi.

3.3.4.2 Beyin doku kesitlerinin alınması

Beyin dokularından alınacak kesit bölgeleri, Paxinos ve Franklin' in beyin atlası (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates) referans alınarak seçildi. MALDI-MSI deneyleri için dokulardan cryostat (Thermo) yardımıyla Poly-L-Lysine (PLL) kaplanmış Indium Tin Oxide (ITO) lamaların (Bruker, #8237001) üzerine 10 µm'lik koronal kesitler alındı. ITO lamalar, kesit alınmadan önce cryostat içerisine yerleştirilerek soğutuldu. Doku kesitleri fırçalar yardımıyla ITO lam yüzeyine yerleştirildi ve dokunun tamamen lama yapışması sağlandı. Ardından dokuların kurutulması amacıyla lamalar desikatörde yaklaşık 1 saat bekletildi.

3.3.4.2.1 12 aylık fare beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analizi öncesi yıkanması

Desikatörden alınan lamlara tripsinizasyon işleminden önce, hücre lipidlerini ve diğer kalıntıları uzaklaştırabilmek amacıyla %70 etanol (30 sn), %100 etanol (30 sn), Carnoy's solüsyonu (2 dk), %100 etanol (30 sn), %40 etanol (30 sn) yıkama protokolü uygulandı. Yıkama sonrası, tripsinizasyon etkinliğini kontrol etmek amacıyla lam üzerine dokulardan uzak bir bölgeye 1 µl BSA proteini damlatıldı. Lamalar tekrardan desikatöre alınarak 30 dk boyunca kurutuldu.

3.3.4.2.2 3, 6 ve 12 aylık fare beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analizi öncesi yıkanması (iyileştirilmiş protokol)

Desikatörden alınan lamlara tripsinizasyon işleminden önce, hücre lipidlerini ve diğer kalıntıları uzaklaştırabilmek amacıyla +4°C'de soğutulmuş solüsyonlar (%70 etanol (30 sn), %100 etanol (30 sn), Carnoy's solüsyonu (2 dk), %100 etanol (30 sn), %40 etanol (30 sn) ve %100 etanol (5 sn)) ile yıkama protokolü uygulandı. Yıkama sonrası, tripsinizasyon etkinliğini kontrol etmek amacıyla lam üzerine dokulardan uzak bir bölgeye 1 µl BSA proteini damlatıldı.

Lamlar tekrardan desikatöre alınarak 30 dk boyunca kurutuldu. Solüsyonların soğutularak kullanılması doku üzerindeki delokalizasyonda azalmaya sebep olarak daha iyi sonuçlar elde etmemizi sağladı.

3.3.4.3 Tripsinizasyon

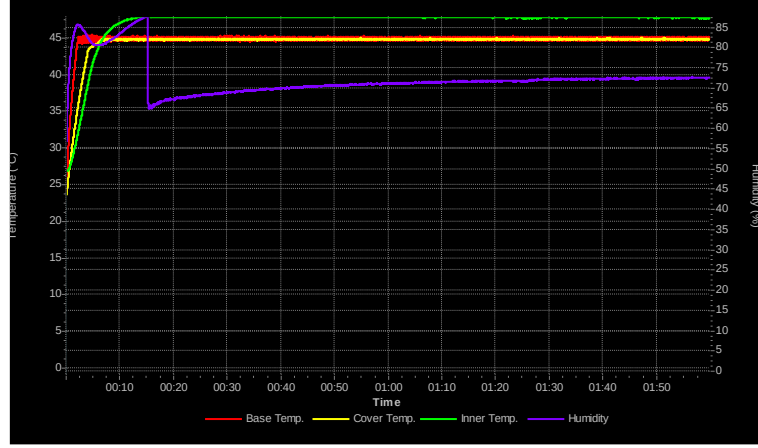
Tripsin enzimi (Trypsin Gold, MS Grade, Promega), 50 µl , 50mM asetik asit ile çözülüp 10 ayrı tüpe (2ug/µl) alikuatlandı. Kesitler üzerine uygulanan tripsin, son konsantrasyonu 100 ng/µl olacak şekilde %5 ACN içeren 50 mM amonyum bikarbonat solüsyonu ile dilüe edildi. Tripsin enzimi çözeltisi, doku kesitlerinin bulunduğu ITO lam üzerine SunCollect Sprayer (SunCrom) yardımı ile püskürtüldü.

3.3.4.3.1 12 aylık fare beyin doku kesitleri üzerine tripsin enzimi uygulanması

12 aylık fare beyin dokuları için kesitlerin ITO lam üzerine alınma şekli Resim 2’de gösterilmiştir. Resim 2 üzerinde işaretlenmiş olan alana (50 mm x 25 mm) tripsin enzimi uygulandı. 10 µm kalınlıktaki beyin kesitlerine, 2 bar basınçta, nuzzle yüksekliği (z) 27 mm, akış hızı 10 µl/dk ve 8 döngü parametrelerine sahip metod kullanıldı. Tripsin uygulamasını takiben, kesitler SunDigest (SunCrom) cihazında 45°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 11). Tripsinizasyon işleminin ardından, kesitler üzerindeki peptitlerin sabitlenmesi için lamlar desikatörde 30 dk kurutuldu.



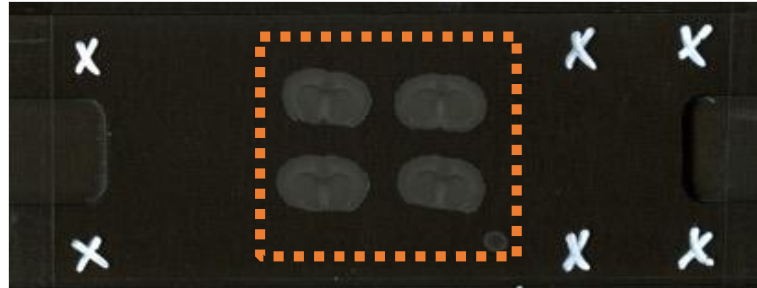
Resim 2. 12 aylık fare beyin doku kesitleri için temsili ITO lam görüntüsü.



Şekil 11. Tripsinizasyon boyunca SunDigest cihazında değişen parametreler.

3.3.4.3.2 3, 6 ve 12 aylık fare beyin doku kesitleri üzerine tripsin enzimi uygulanması (iyileştirilmiş protokol)

3, 6 ve 12 aylık fare beyin dokuları için kesitlerin ITO lam üzerine alınma şekli Resim 3’te gösterilmiştir. Resim 3 üzerinde işaretlenmiş olan alana (25 mm x 25 mm) tripsin enzimi uygulandı. 3, 6 ve 12 aylık fare dokuları için 10 µm kalınlıktaki beyin kesitlerine, 2 bar basınçta, nuzzle yüksekliği (z) 29 mm, akış hızı 10 µl/dk ve 8 döngü parametrelerine sahip metod kullanıldı.



Resim 3. 3, 6 ve 12 aylık fare beyin doku kesitlerinin her biri için temsili ITO lam görüntüsü.

Örnek hazırlığının iyileştirilmesi için yapılan denemelerde, 12 aylık dokuların analizindeki alınma şeklinin aksine kesitlerin lamın merkezinde, birbirine yakın ve daha küçük bir alan içerisinde olacak şekilde alınmış olmasının tripsinizasyon işlemi iyileştirdiği tespit edildi. Tripsin püskürtmesi yapılacak alanın küçültülmesi sayesinde, döngüler arası süre kısaldığı için bir önceki döngüde püskürtülmüş olan enzim doku

yüzeyinde kurumadan sonraki döngüye geçiş yapılmış oldu. Böylece, hem kullanılan enzim miktarı azaltılmış oldu hem de en önemlisi enzimin etkinliği korunmuş oldu. Püskürtülmüş olan enzimin kesitler üzerinde kurumasına müsaade etmeden inkübasyon basamağına geçildi.

Tripsin uygulamasını takiben, kesitler SunDigest (SunCrom) cihazında 45°C’de da 2 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 11). Tripsinizasyon işleminin ardından, kesitler üzerindeki peptitlerin sabitlenmesi için lamalar desikatörde 30 dk kurutuldu.

3.3.4.4 Matriks uygulaması

MALDI-MSI uygulamasında peptit analizi yapılacağı için uygun matriks olarak 2,5- Dihydroxybenzoic acid (DHB) (Bruker) kullanıldı. DHB, 30 mg/ml konsantrasyonda %50 asetonitril (ACN) ve %0.2 Trifluoroasetik asit (TFA) ile çözülerek 1 dakika vorteks yapıp 30 dk sonik banyoda bekletildi. Ardından 18.000 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Matriks kaplaması, tripsinizasyon işlemi uygulanan lam üzerine SunCollect Sprayer (SunChrom) cihazı ile gerçekleştirildi. Matriks kaplama protokolü, 2 bar basınçta, z pozisyonu 24 mm, ilk katmanda püskürtme hızı 10 µl/dk, diğer 4 katmanda ise 35 µl/dk olacak şekilde uygulandı.

Matriks kaplaması tamamlandıktan sonra cihaz kalibrasyonu için kullanılacak olan peptit standardı 1:1 oranında matriks solüsyonu ile karıştırılarak lam üzerinde kesitlerden uzak bir bölgeye damlatıldı ve kuruması beklendi.

MALDI TOF/TOF cihazında ITO lam üzerinde lazer atışlarının doğru noktalara denk gelebilmesi için, lamın lokalizasyon bilgisinin cihaza tanıtılması gerekmektedir. Bu sebeple lama matriks kaplaması yapılmadan önce, organik solventte çözünmeyen bir işaretleyici ile lam üzerine işaretlemeler yapılarak, yüksek çözünürlükteki bir tarayıcı ile 4800 dpi’da tarandı (Resim 2 ve Resim 3). Dijital ortama alınan lam görüntüsü, MALDI TOF/TOF bilgisayarına aktarıldı. Lam üzerindeki X işaretlemeleri kullanılarak, cihaz kontrolünü sağlayan FlexControl programına lam üzerindeki kesitlerin lokalizasyon bilgileri tanıtıldı.

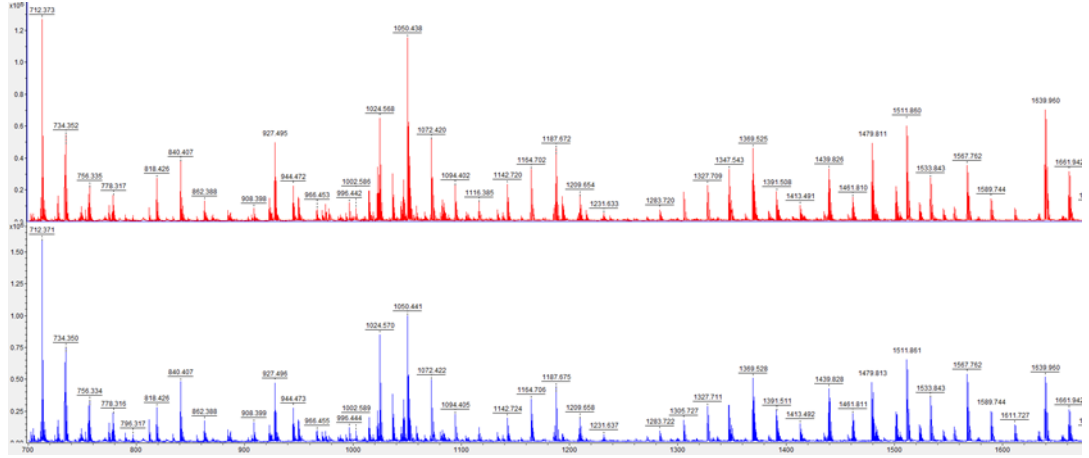
3.3.4.5 MALDI kütle spektrometresi görüntüleme (MSI) analizi

MALDI-MSI analizleri kurumumuzda bulunan Bruker RapifleX MALDI TOF/TOF cihazında yapıldı. Örnek analizinden önce, cihazın iyon kaynağının temizliği, optik ve lazer ayarları, dedektör kontrolü ve kalibrasyonu kontrol edilerek gerekli ayarlamalar FlexControl programı ile yapıldı. Cihazın kalibrasyonu için Resim 4'te içeriği verilen Peptide Calibration Standard II (CARE Products, Bruker) kullanıldı. Ticari olarak liyofilize halde temin edilen kalibrant 125 µl %0,1 TFA ile kısa bir vorteks işlemi ile çözüldü. Sürekli dondurup çözme işlemlerinden zarar görmemesi için 2 µl'lik alikotlar ayrıldı.

Peptide	[M+H] ⁺ Mono isotopic	[M+H] ⁺ Average
Bradykinin 1-7	757.3992	757.86
Angiotensin II	1046.5418	1047.19
Angiotensin I	1296.6848	1297.49
Substance P	1347.7354	1348.64
Bombesin	1619.8223	1620.86
Renin Substrate	1758.9326	1760.03
ACTH clip 1-17	2093.0862	2094.43
ACTH clip 18-39	2465.1983	2466.68
Somatostatin 28	3147.4710	3149.57

Resim 4. Peptit kalibrasyon standart II içeriği.

ITO lamalar “MTP Lam Adaptor II” adaptörüne yerleştirilerek cihaza verildi. FlexImaging programıyla lam üzerindeki bölgeler FlexControl'e tanıtıldı. FlexControl programında kullanılacak olan metod, reflector modda 700-3200 Da kütle aralığı, 50 µm tarama aralığı ve lazer vuruşu 1000 olacak şekilde ayarlandı. Bu metod hem kalibrasyon hem de örnek analizleri için kullanıldı. FlexControl'de metod seçildikten sonra 'Calibration' sekmesine gelerek kalibrantın bulunduğu alana arka arkaya lazer atışı yapıldı. Metodta ± 10 (Err/ppm) hata aralığı göz önünde bulundurularak kalibrasyon yapıldı. Ardından tripsinizasyonun gerektiği düzeyde olup olmadığını gözlemlemek amacıyla lam üzerine damlatılmış ve kesitlerle birlikte tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuş BSA'nın bulunduğu bölgeye lazer atışları yapıp data toplandı. Şekil 12'teki gibi bir kromatogram elde edildiğinde örnek hazırlığı başarılı kabul edildi ve dokuların analizleri başlatıldı. Her analiz sonrasında cihaz vakumdan kesilerek iyon kaynağı firma tarafından gösterildiği gibi temizlendi ve sonraki analizler için cihaz hazırlandı.

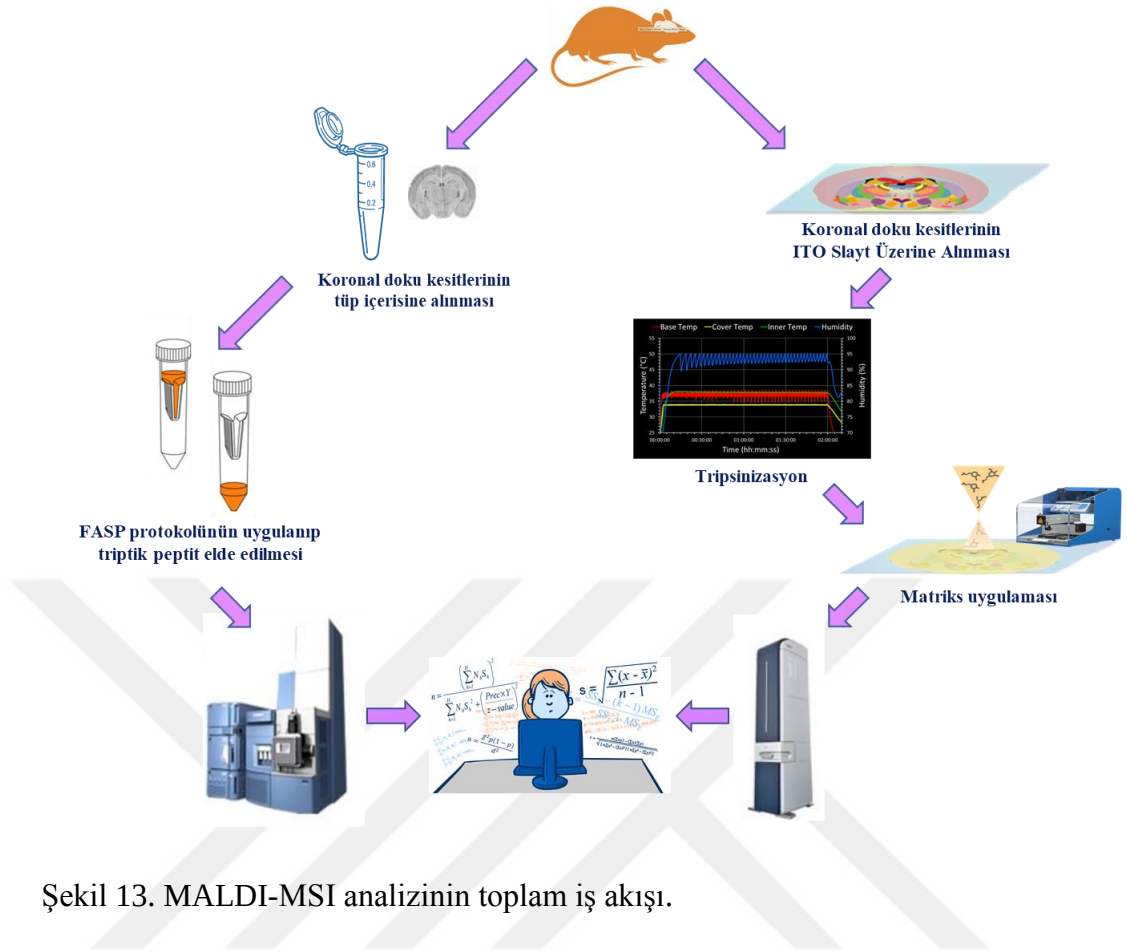


Şekil 12. Temsili BSA kromatogram görüntüleri.

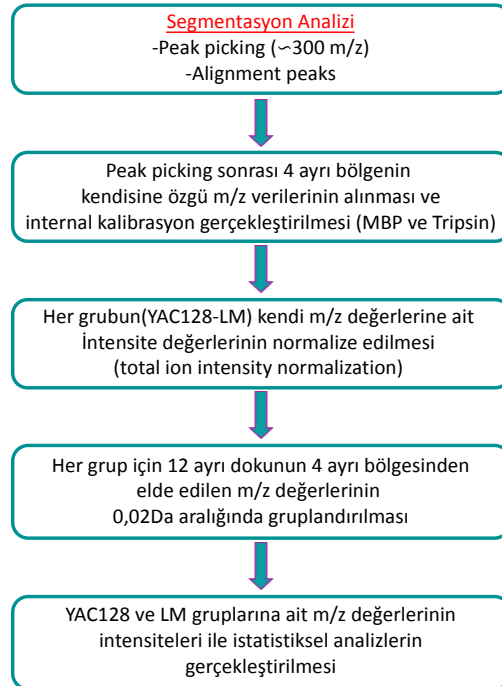
3.3.4.6 MALDI-MSI analiz datalarının işlenmesi

MALDI-MSI analiz protokolü YAC128 ve LM beyin dokularına uygulandı ve elde edilen veriler SCiLS 2D (Bruker) yazılımı kullanılarak analiz edildi. SCiLS 2D, MALDI-MSI sonuçlarının veri madenciliği analizi için kullanılan bir yazılımdır.

MALDI-MSI analizleri için örnek hazırlığından data işlenmesine kadar izlenen iş akışı Şekil 13’de, MALDI-MSI datalarının işlenmesinde izlenen iş akışı ise Şekil 14’teki görseller ile özetlenmiştir.



Şekil 13. MALDI-MSI analizinin toplam iş akışı.



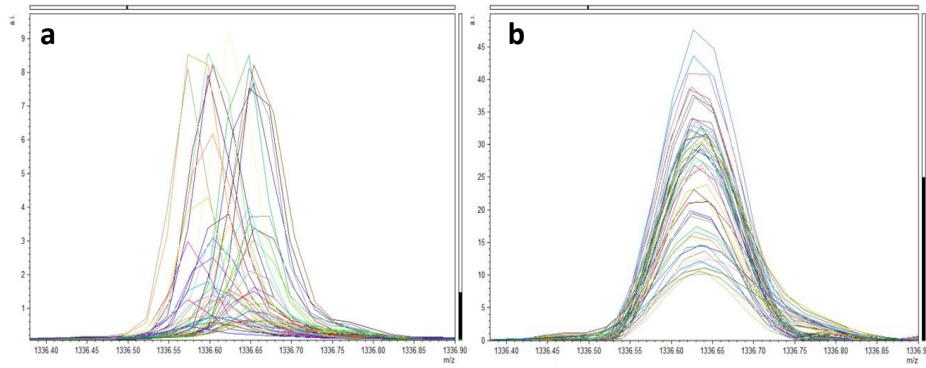
Şekil 14. MALDI-MSI analiz datalarının işlenmesindeki toplam iş akışı.

3.3.4.6.1 SCiLS 2D yazılımı ile dokuların segmentasyon analizleri

Her bir zaman noktası için (3, 6 ve 12 ay) 6 tane YAC128 ve 6 tane LM beyin dokusundan elde edilen analiz verileri, yazılım kılavuzunda ve literatürdeki çeşitli çalışmalarda (82) belirtildiği üzere “interval width: 0.156 Da”, “interval processing mode: mean value on interval” ve “baseline removal algorithm: deconvolution” ve “TIC” parametreleri ayarlanarak yüklendi. Ardından bu parametreler kullanılarak yapılan yükleme sonrası otomatik segmentasyon analizi gerçekleştirildi. Segmentasyon analiziyle belirlenen bölgelerin (R1, R2, R3 ve R4) verileri programdan ayrı ayrı kaydedilerek internal kalibrasyon aşamasına geçildi.

3.3.4.6.2 m/z değerlerinin internal kalibrasyon ile düzeltilmesi

Her ne kadar ITO lamalar hazırlanıp cihaza verilirken peptit standardı ile cihazın external kalibrasyonu yapılsa da elde edilen sonuçların güvenilirliğini arttırmak ve farklı günlerde yapılan analizler arasındaki varyasyonları elimine etmek amacıyla internal kalibrasyon yapılması gerekmektedir (83). Yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda yetişkin fare beyin dokusunda bol miktarda bulunan Myelin Basic Proteini (MBP)’nin bilinen m/z değerlerine göre internal kalibrasyon yapıldığı gözlemlendi (84). Ayrıca, tripsinin triptik otoliz peptitlerinin de internal kalibrant olarak kullanılabileceği tespit edildi (85–87). Sonuç olarak mMass yazılımı kullanılarak MBP’nin bilinen m/z değerleri ve tripsinin triptik otoliz peptitlerine göre internal kalibrasyon gerçekleştirildi (Şekil 15).



Şekil 15. mMass yazılımı ile internal kalibrasyonun temsili görüntüsü. a) Kalibrasyon öncesi, b) Kalibrasyon sonrası verilerin görünümü.

3.3.4.6.3 İntensite verilerinin normalize edilmesi

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda intensiteler, kütle spektrumlarını etkileyebilecek sistematik artefaktları ortadan kaldırmak ve ayrıca günlük cihaz dalgalanmalarından kaynaklanan deneysel varyasyonu en aza indirmek amacıyla normalizasyon faktörü uygulanarak normalize edildi (88). Bu ve bundan sonraki aşamalar için veriler Excel programına aktarıldı. Her bölgeye ait YAC128 ve LM datalarının intensitelerine kendi içlerinde total intensite normalizasyon uygulandı. Tablo 6’da uygulamanın nasıl yapıldığına dair örnek olarak 800.025 m/z’nin farklı dokulardan elde edilen intensite değerlerinin normalizasyon hesaplamaları verildi. Kısaca, her bölgenin kendisine özgü (R1, R2, R3 ve R4 için ayrı ayrı) total intensiteleri kendi içinde toplandı ve en küçük toplama bölünerek normalizasyon faktörü elde edildi. Mevcut intensite değerleri bu faktör ile bölünüp normalize intensite değerleri belirlendi.

Tablo 6. Total intensite normalizasyon hesaplaması örneği

3. ay - R1 m/z 800.025	LM-1	LM-2	LM-3	LM-4	LM-5	LM-6	YAC-1	YAC-2	YAC-3	YAC-4	YAC-5	YAC-6
İntensiteler Toplamı	37659.16	19750.69	9930.24	12068.74	13593.79	12507.05	34722.76	24638.04	12977.19	12298.65	13812.38	10567.31
Normalizasyon Faktörü	3.79	1.99	1.00	1.22	1.37	1.26	3.50	2.48	1.31	1.24	1.39	1.06
İntensite	0.38	0.23	0.28	0.35	0.47	0.54	0.28	0.33	0.40	0.42	0.51	0.45
Normalize İntensite	0.10	0.12	0.28	0.29	0.34	0.43	0.08	0.13	0.30	0.34	0.37	0.42

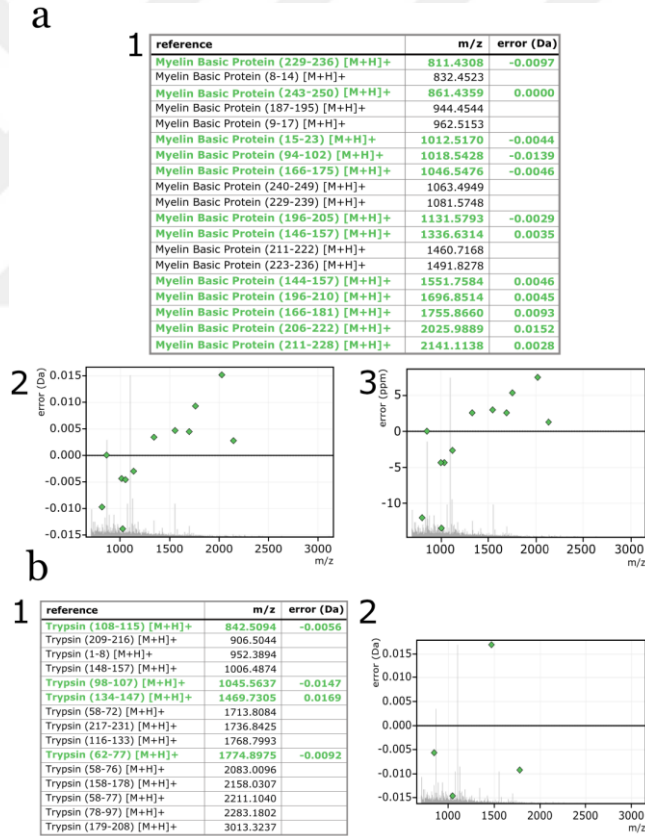
3.3.4.6.4 Verilerin gruplandırılması (data binning)

Pik toplama (peak picking) sonucunda gerçek pik olarak programın tespit ettiği küçük farklılıklar gösteren m/z değerlerinin tek bir m/z değeri olarak gözükebilmesi, spesifik bir m/z için her dokudan gelen o m/z’ye karşılık gelen intensiteler arasında istatistiksel test yapılabilmesi ve spektraların karşılaştırabilmesi amacıyla elde edilen m/z’ler (700-3200 aralığında) 0.02 Dalton aralıklarla gruplandırıldı (data binning)

(89). YAC128 veya LM grubu içinde minimum 3 intensite değeri içeren m/z değerleri için daha ileri istatistiksel analizler uygulandı.

0.02 Dalton aralıklarla gruplandırma (binning) yapılmasının sebebi, Şekil 16’te görüldüğü üzere mMass yazılımı kullanılarak yapılan internal kalibrasyon sonucunda MBP peptitleri ve tripsinin en çok bilinen otoliz peptitleri ile analiz verilerinin eşleşmesinden elde edilen hata oranının 0.02 Da’dan küçük olmasıdır.

Sonuç olarak, bir m/z değerine karşılık 12 farklı dokunun (6 YAC128, 6 LM) kalibre edilmiş intensite değerleri elde edildi. Bu uygulama ile YAC128 ve LM dokularındaki ilgili m/z değeri için intensitelerin karşılaştırılması mümkün kılındı.



Şekil 16. mMass yazılımı ile yapılan internal kalibrasyon sonrası eşleşme hata oranlarının temsili tablosu ve grafikleri. a) 1. MBP için eşleşme hata oranları (Da), 2, 3. MBP için eşleşme hata oranlarının grafiksel gösterimi (Da ve ppm). b) 1. Tripsin peptitleri için eşleşme hata oranları (Da), 2, 3. Tripsin peptitleri eşleşme hata oranlarının grafiksel gösterimi (Da ve ppm).

3.3.4.7 İstatistiksel analizler

MALDI-MSI analizlerinde ilgilenilen bölgenin analizlerindeki piksel noktasının 1000'den fazla olması sebebiyle bölgesel analiz için, veri sayısından bağımsız olan *Cohen's* testi sayesinde, istatistiksel testlerden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi sağlandı. Data binning sonucunda elde edilen ilgili m/z değerlerine karşılık gelen YAC128 ve LM dokularına ait intensite değerlerine *Cohen's d-test* uygulandı (90). *Cohen's d-test* için anlamlılık değeri $d > 0.8$ olarak belirlendi. Sonraki aşamada, *Cohen's* değeri 0.8'den büyük olan intensite değerlerine SPSS (IBM Statistics) aracılığıyla normal dağılım testi uygulandı. Normal dağılım gösteren intensite değerlerine *independent t-test* (non-parametrik) uygulanırken, normal dağılım göstermeyen değerlere ise *Mann Whitney U* testi (parametrik) uygulandı ve $p < .05$ anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

3.3.4.8 LC-MS/MS analizleri ile protein tanımlama

MALDI-MSI analizi sonucunda YAC128 ve LM dokularından elde edilen peptit m/z değerlerinin ait olduğu proteinleri tanımlamak amacıyla direkt beyin kesitinden ekstrakte edilen peptitlerin LC- MS/MS analizleri gerçekleştirildi.

3.3.4.8.1 Doku kesitlerinden LC-MS/MS analizi için örnek hazırlanması

MALDI-MSI deneylerinde kullanılan beyin dokularından cryostat yardımıyla 4 ardışık 10 µm'lik koronal beyin kesitleri Lo-Bind (Eppendorf) tüplere alındı ve homojenize edildi. Homojenizasyon için doku kesitleri üzerine, içerisinde %1 PIC (proteaz inhibitör kokteyli) bulunan 50 µl UPX (Expedeon) solüsyonu eklendi. Sonikatör yardımıyla buz üzerinde dokuların lizisi gerçekleştirildi. Ardından tüpler 15 dakika 95°C 1000 rpm'de çalkalanarak kaynatıldı ve ardından 30 dakika boyunca +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10 dakika 16.000 g'de santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant temiz Lo-Bind tüplere alındı ve daha önce dataylıca anlatılan FASP protokolü takip edildi (79).

3.3.4.8.2 LC-MS/MS analizi

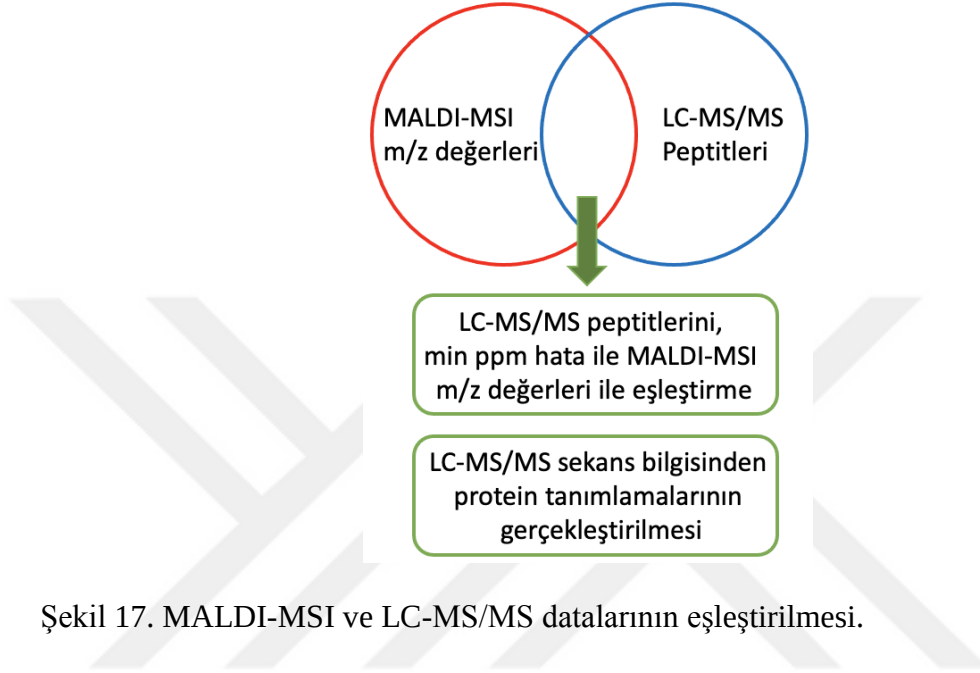
Beyin doku kesitlerinden elde edilen peptitlerin analizi için kurum bünyesinde bulunan nanoLC-ESI-QTOF (Waters, Xevo G2-XS) sistemi kullanıldı. Analizlere başlamadan önce, cihaza özgü MassLynx programı kullanılarak (V4.1- Waters) 200 pg/μl Leucine enkephalin ile detektör kontrolü ve 100 fmol/μl Glu-1-fibrinopeptit B ile cihazın kalibrasyon ayarları yapıldı. SONAR kütle spektrometresi metodu ve sensitivite modu seçildi. FASP protokolü sonunda elde edilen triptik peptitler cihaza verildi. Enjeksiyonu yapılan örnek önce nanoACQUITY UPLC M Class kromatografi sistemi üzerinde bulunan trap kolonundan (ZENFIT-nanoEase MZ Symmetry C18 Trap Column, 100A, 5 μm 180 μm x 20 mm, Waters-186008821) geçirildi ve daha sonra hidrofobikliklerine göre ayırımın yapılacağı analitik kolona (ZENFIT- nanoEase MZ HSS T3 Column, 100 Å, 1.8 μm, 75 μm x 250 mm, Waters-186008818) yönlendirildi. Asetonitril gradienti, %5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, m/z 50-2000 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7 sn MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7 sn MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı.

Protein tanımlamaları yapılırken UniProt/SwissProt protein veri bankasındaki fareye ait protein sekans bilgisi kullanıldı. Progenesis QIP yazılımı (Waters, 2018) kullanılarak protein tanımlaması gerçekleştirildi. Tanımlamalar yapılırken fragment yükü +2 ile +5 aralığında filtrelendi, prekürsör kütle toleransı <10 ppm, protein ve peptit yanlış keşif oranları (False Discovery Range-FDR) ≤1 olarak ayarlandı ve en az 3 benzersiz peptit ile tanımlanan proteinler dikkate alındı.

3.3.4.9 MALDI-MSI analiz sonuçları ile protein belirleme

YAC128 ve LM dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen m/z değerlerinin hangi proteinlere ait olduğu bilgisini bulabilmek için doku kesiti LC-MS/MS analizinden elde edilen proteinlere ait sekans bilgisi kullanıldı. Schober ve ark. 'larının belirttiği gibi (91) MALDI-MSI m/z değerleri ile LC-MS/MS

datasının eşleştirilmesinde minimum ppm hata oranı ile eşleştirme kuralı uygulandı (Şekil 17). 12 aylık farelerin analizlerinden elde edilen veriler minimum ppm hata oranı ile eşleştirilirken, 3, 6 ve 12 aylık farelerin analizlerinden elde edilen veriler maksimum ± 5 ppm hata oranı baz alınarak eşleştirildi.



Şekil 17. MALDI-MSI ve LC-MS/MS datalarının eşleştirilmesi.

3.3.5 İmmünohistokimya analizi

Kullanılan fare modelinin hastalık patolojisine sahip olup olmadığı immünohistokimyasal boyama tekniği ile gösterildi. Ayrıca 12 aylık dokuların MALDI-MSI analiz sonuçlarının validasyonları için de immünohistokimya yöntemi kullanıldı.

Taze dondurulmuş beyin dokularından cryostat (Thermo) yardımıyla, PLL kaplı lamalar (Thermo) üzerine tüm beyinden 18 μm 'lik koronal kesitler alındı. Üzerine kesit alınan lamalar 20 dk boyunca 40°C ısıtıcı üzerinde bekletilerek kesitlerin lam üzerine fiksasyonu sağlandı ve ardından immünohistokimya deneyleri yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

İmmünohistokimyasal boyaması yapılacak kesitleri içeren lamalar -20°C 'den çıkartıldıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından, %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi içerisinde 15 dk çalkalanarak inkübe edildi. PFA inkübasyonu sonrasında, PFA'nın uzaklaştırılması için 3 kez 5'er dakika PBS yıkaması yapıldı. Hücre içi peroksidaz enzimlerinin bloke edilmesi için hidrojen peroksit bloklamasını ($\%0.3 \text{ H}_2\text{O}_2$ metanol içinde, 30 dk) takiben doku kesitlerinin etrafı hidrofobik kalem ile çizildi ve kesitlerin üzeri kaplanacak miktarda BSA ($\%3$, Sigma-Aldrich, A2153) solüsyonu kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapıldı. Ardından lam üzerindeki kesitler, bloklama solüsyonu içerisinde belli dilüsyon oranlarında (Tablo 7) hazırlanan birincil antikorlar ile $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece-boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS yıkamalarının ardından, doku kesitleri yine bloklama solüsyonu içinde belli oranlarda hazırlanan ikincil antikorlar (Tablo 7) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS yıkamaları ile bağlanmayan materyaller uzaklaştırıldıktan sonra peroksidaz substratı olan DAB (VectorLabs, SK-4100) solüsyonu kullanılarak boyamalar gerçekleştirildi. Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma) kesitler üzerine damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Antikor spesifik boyanmalar Axio Vert. A1 (Carl Zeiss) mikroskobu ile görüntülendi.

12 aylık farelerin beyin dokularının ($n = 3$) anti NeuN boyaması, ImageJ yazılımı (National Institutes of Health, ABD) kullanılarak değerlendirildi (92). Makro komutu ile tüm kesitlere eşit muamele uygulanması sağlandı ve sırasıyla şu parametreler takip edildi; 8-bit'e ikilileştirme (binarization to 8-bit), otomatik yoğunlukla eşikleme (thresholding with auto intensity) ve DAB boyamasının olduğu nispi alanın ölçümü (measurement of the relative area covered by DAB staining). İstatistiksel analizlerde varyans homojenliği *Levene's Equality of Variances* testi ile değerlendirilirken, normal dağılım gösteren verilere *independent student t test* uygulandı.

Tablo 7. İmmünohistokimya analizlerinde kullanılan antikorlar, markaları ve dilüsyon oranları

	Antikor	Marka	Dilüsyon
Birincil	Anti Huntingtin, EM48	Millipore – MAB5374	1:50
Birincil	GFAP	Abcam – ab7260	1:1000
Birincil	Anti-NeuN	Abcam – ab177487	1:500
İkincil	Keçi anti-fare IgG-HRP	Santa Cruz - sc-2005	1:1000
İkincil	Keçi anti-tavşan IgG-HRP	Santa Cruz - sc-6721	1:1000

3.3.6 Western blot yöntemi ile elde edilen sonuçların validasyonu

3.3.6.1 Protein örneklerinin hazırlanması

3, 6 ve 12 aylık dokuların MALDI-MSI analiz sonuçlarına göre, R1 (6. ve 12. örnekleri) veya R4 (3. ve 12. ay örnekleri) bölgeleri, MALDI-MSI analizi yapılmış kesitlere ardışık olan doku kesitlerinden dikkatlice disekte edilerek LoBind tüplere aktarıldı. Bu bölgelerden elde edilen protein özleri, proteomik bulguları doğrulamak için kullanıldı. Tüpler içerisindeki kesitler %1 PIC içeren UPX solüsyonu ile homojenize edildi. Karışım 95°C’de 15 dk kaynatıldı ve 1 saat süreyle +4°C’de bekletildi. Ardından, 16000 g’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant alınarak yeni LoBind tüplere koyuldu ve analizler gerçekleştirilene kadar -80°C’de muhafaza edildi.

3.3.6.2 Western blot yöntemi

Analizde kullanılacak jeller TGX Stain-Free FastCast (12%) akrilamid kitinde önerilen protokole uygun olarak hazırlandı. Resolver solüsyonu; eşit miktarlarda resolver A ve resolver B solüsyonları %0,5 APS ve %0,05 TEMED içerecek şekilde hazırlandı. Stacker solüsyonu; eşit miktarlarda stacker A ve stacker B solüsyonlarına %0,5 APS ve %0,1 TEMED eklenerek hazırlandı. 0.75 mm aralıklı cam plakalar arasına solüsyonlar paylaştırıldı ve 30 dakika polimerize olmaları beklendi.

-80°C'den alınan örneklerin Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu tespit edildikten sonra 10 µg protein, %5 BME içeren 2X Laemmli örnek tampon çözeltisi ile karıştırıldı ve 95°C'de 5 dk kaynatılarak denatüre edildi. Hazırlanan jel, yürütme tankına yerleştirildi ve tankın içi 1X Biorad yürütme tampon çözeltisiyle (35 mM SDS, 250 Mm Tris, 1,92 M Glisin; pH: 8,3) dolduruldu. İlk kuyucuğa 5 µL moleküler standart, sonraki kuyucuklara denatüre edilmiş protein örnekleri yüklendi yaklaşık 30 dk 200 V'da yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jeller ChemiDoc (Biorad) görüntüleme cihazı kullanılarak aktive edildi. Biorad Trans-Blot semi-dry transfer sistemi ve Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit kullanılarak jeldeki proteinler membrana transfer edildi. Transfer cihazına, en alta ve en üste transfer tampon çözeltisinde (25 mM Tris, 1,92 M Glisin; pH:8,3) bekletilen kurutma kâğıtları ve araya %100 metanolde aktiveleştirilen membran ile yürütmesi tamamlanan jel koyuldu. Cihazda, 2,5 A 25 V'da moleküler ağırlığı 30 kDa'dan küçük proteinler için 5 dk, 50- 150 kDa arasında olanlar için 7 dk, 150 kDa'dan çok olanlar için 10 dk olan parametreler kullanıldı.

Transfer sonrası membran PBST ile yıkanarak ChemiDoc'ta görüntülendi. Membran, bloklama solüsyonu (PBS'te çözölmüş %5 yağsız süt tozu) içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra membranlar bloklama solüsyonunda belirlenen miktarlarda (Tablo 8) hazırlanan birincil antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBST yıkamalarının ardından birincil antikor ile uyumlu ikincil antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. Renksiz moleküler standardın görüntülenebilmesi için HRP-konjuge streptaktin (1:10.000) ile 5 dk inkübe olan membranın PBST ile yıkaması yapıldı ve ECL kiti kullanımı ile membranlar ChemiDoc görüntüleme cihazında görüntülendi.

Tablo 8. Western Blot validasyonlarında kullanılan antikorlar, markaları ve dilüsyon oranları

	Antikor	Marka	Dilüsyon
Birincil	HSP70	Santa Cruz – sc-32239	1:500
Birincil	NogoA (Reticulon-4)	Abcam – ab62024	1:1000
Birincil	eEF2	Cell Signaling – 2332	1:1000
Birincil	TAU	Santa Cruz – sc-58860	1:200
Birincil	β -Actin	Santa Cruz - sc-47778	1:2000
İkincil	Keçi anti-fare IgG-HRP	Santa Cruz - sc-2005	1:4000
İkincil	Keçi anti-tavşan IgG-HRP	Santa Cruz - sc-6721	1:4000

3.3.6.3 Western blot yöntemi ile elde edilen dataların işlenmesi

Normalizasyon, stain-free jel teknolojisi ile önerilen protokole uygun olarak ChemiDoc Image Laboratory yazılımı (versiyon 6.1) ile gerçekleştirildi. Membran transferi sonrası elde edilen blot görüntüsünde, her bir kuyucuktaki toplam protein miktarlarının antikor inkübasyonları sonrasında açığa çıkan hedef protein bant sinyal yoğunluğuna oranlanmasıyla normalizasyon gerçekleştirildi. Elde edilen densitometrik veriler Graphpad Prism (versiyon 7.04, GraphPad, La Jolla California USA, www.graphpad.com) yazılımı ile analiz edildi. Verilerin normal dağılım değerlendirmeleri *Shapiro-Wilks* testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren verilerin anlamlılığı bağımsız örneklerde *independent student t-test* ile değerlendirildi. Western blot sonuçlarına ait grafikler yine aynı yazılım kullanılarak hazırlandı ve veriler saçılım grafiğinde ortalama $\pm$ standart hata ortalaması (standart error of the mean, SEM) ile gösterildi.

3.3.7 Farklı ekspresyona sahip proteinlerin biyoinformatik analizleri

3, 6 ve 12 aylık dokuların MALDI-MSI analizleri sonucu elde edilen farklı ekspresyona sahip proteinlerin biyoinformatik analizini gerçekleştirmek için sırasıyla uygulanan yöntemler: (1) Gene Ontology (GO) analizi, biyolojik süreci (biological process, BP) ve moleküler işlevleri (*molecular function*, MF) içeren DAVID veritabanı (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, sürüm

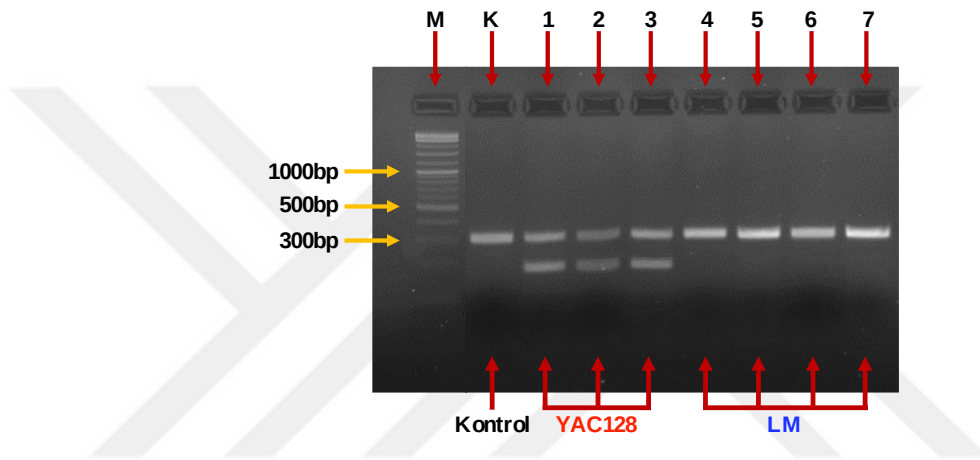
6.8) kullanılarak yapıldı; (2) DAVID biyoinformatik kaynakları, Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) veritabanına dayalı olarak zenginleştirilmiş yolları belirlemek için kullanıldı ve zenginleştirilmiş GO terimlerini ve KEGG yollarını ortaya çıkarmak için p değeri $< .05$ olan bir Fisher's exact testi yapıldı. Baloncuk grafikleri çevrimiçi bir platformda (<http://www.bioinformatics.com.cn/en>) hazırlandı.



4 BULGULAR

4.1 Genotipleme ile Transgenik Hayvanların Belirlenmesi

Transgenik (YAC128) ve transgenik olmayan kontrol grubu (LM) farelerinin ayırt edilebilmesi için yapılan genotipleme analizleri sonucunda Resim 5’de gösterildiği gibi, tek bantın gözlemlendiği kuyucuklardaki örnekler LM farelere aitken, 2 bant gözlemlenen kuyucuklardaki örneklerin YAC128 farelerine ait olduğu belirlendi.



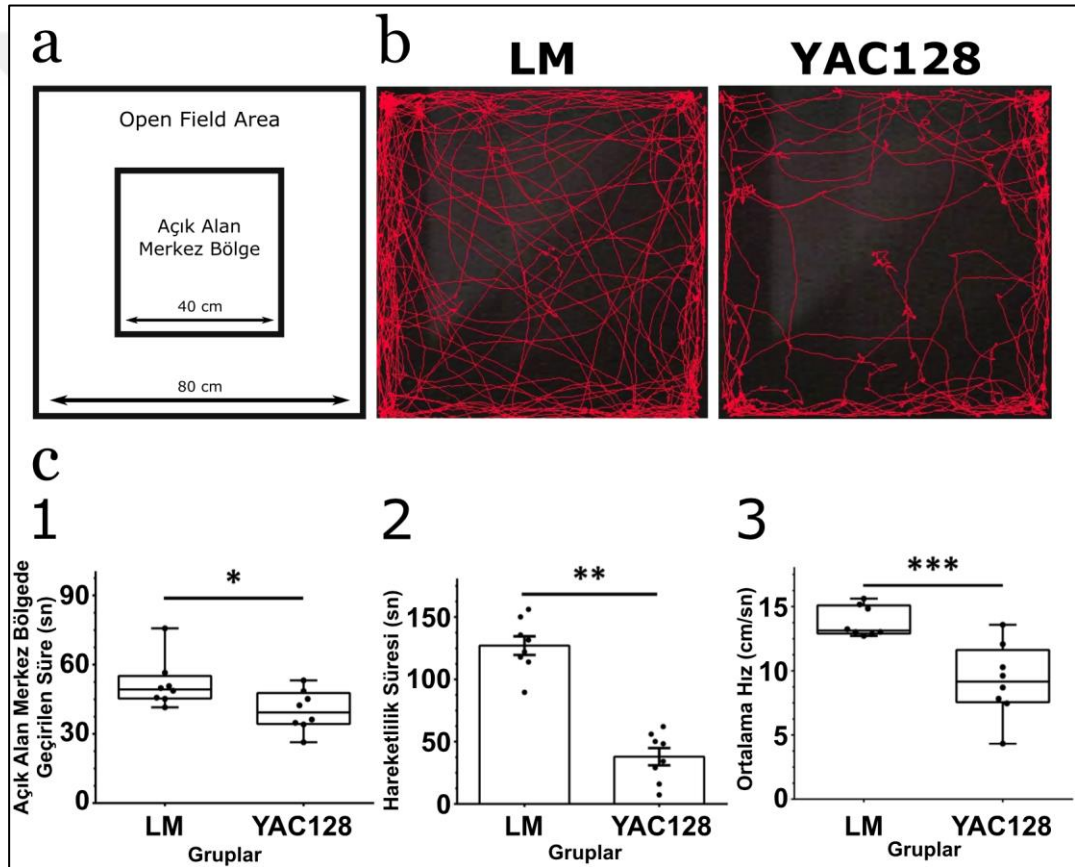
Resim 5. Huntington Hastalığı fare modeli dokularının agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin analizi. M, marker; K, kontrol örneği; YAC128, transgenik fare; LM, transgenik olmayan littermate fare.

4.2 Açık Alan (Open-Field) Davranış Testi Sonuçları

4.2.1 12 aylık farelerin davranış testi sonuçları

Açık alan davranış testi, temsili takip görüntüsünde (Şekil 18.b) ve grafiklerde (Şekil 18.c) gösterildiği gibi, kaygı, korku ve strese sahip 12 aylık YAC128 farelerinin, LM ile karşılaştırıldığında açık alan merkez bölgesinde daha az zaman geçirdiğini gösterdi. Kaygı ölçümü için merkezde geçirilen süre değerlendirildi. *Mann-Whitney U testi*, 12 aylık YAC128 farelerinin (Mdn = 39.3) LM farelerine (Mdn = 49.26) göre önemli düzeyde anksiyete bozukluğuna sahip olduğunu gösterdi ($U = 11.00$, $z = 2.205$, $p = .027$) (Şekil 18.c-1). Farelerin hareketlilik süresi ve test süresi içindeki ortalama hızları spontan lokomotor aktivite ölçümü için değerlendirildi. Hareketlilik süresini

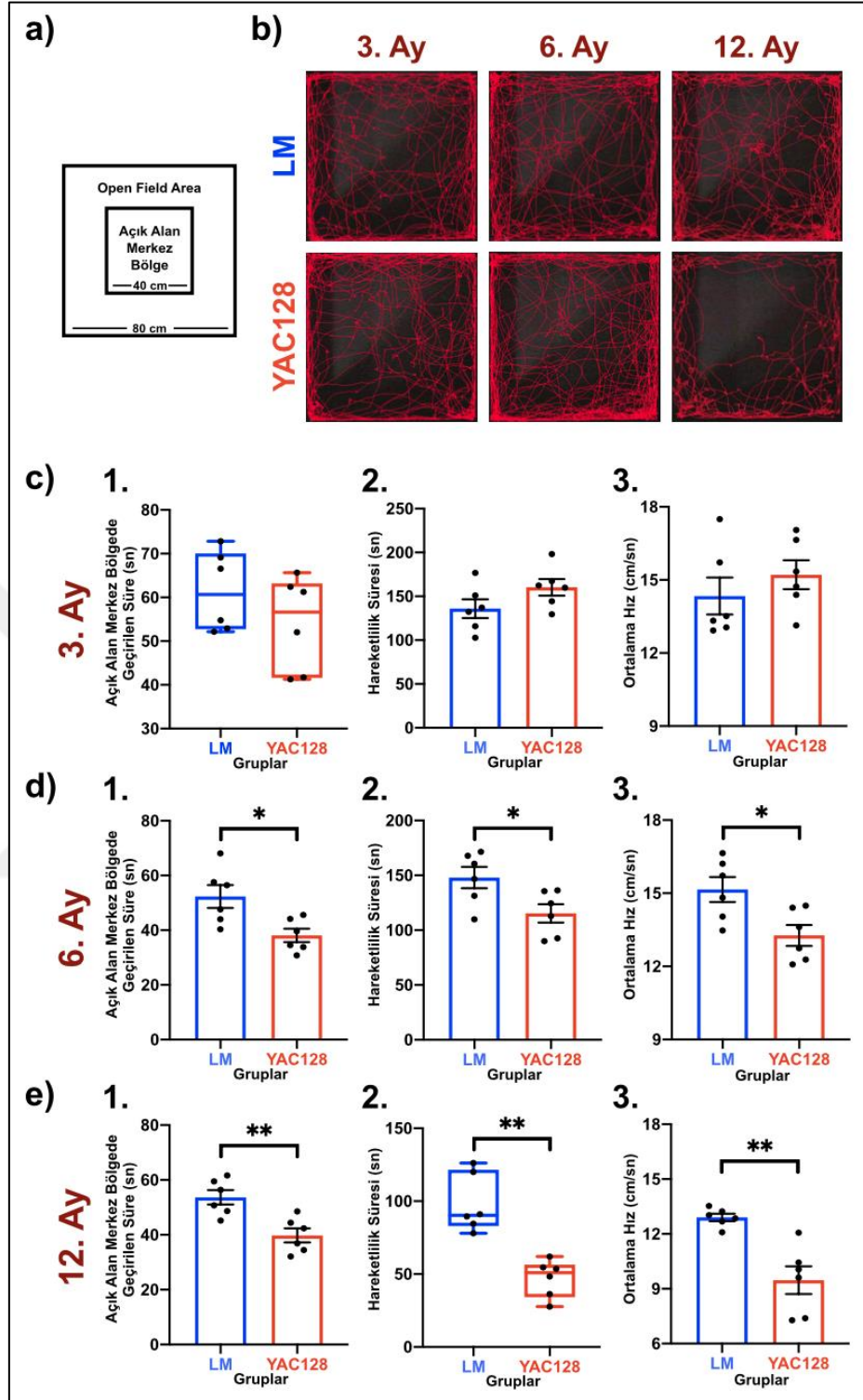
karşılaştırmak için *independent student t-test* kullanıldı. 12 aylık LM ($M = 127.10$, $SEM = 7.51$) ve YAC128 fareleri ($M = 37.91$, $SEM = 6.92$) arasında anlamlı bir fark vardı; $t(14) = 8.737$, $p < .001$ (Şekil 18.c-2). Grupların ortalama hızlarını karşılaştırmak için *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. Bu teste göre 12 aylık YAC128'in ($Mdn = 9.15$) LM'den ($Mdn = 13.13$) daha yavaş hareket ettiği ($U = 5.00$, $z = 2.836$, $p = .005$) belirlendi (Şekil 18.c-3). Bu sonuçlar, 12 aylık YAC128 farelerinin, LM farelerine kıyasla daha inaktif olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, 12 aylık YAC128 fareleri hareketlilik süresi, ortalama hız ve açık alan merkez bölgesinde harcanan süre açısından istatistiksel öneme sahipti ($p < .05$).



Şekil 18. 12 aylık farelerin açık alan testi sonuçları. a) Davranış testi alanını gösteren temsili şekil. b) Açık alan testi için grupların temsili takip görüntüleri. c) Grafikler, (1) açık alan merkez bölgesinde geçirilen süre, (2) hareketlilik süresi ve (3) ortalama hızdaki değişiklikleri göstermektedir. *, ($p < .05$), **, ($p < .001$) ve ***, ($p = .005$).

4.2.2 3, 6 ve 12 aylık farelerin davranış testi sonuçları

Açık alan davranış testi, 3, 6 ve 12 aylık YAC128 ve LM farelerinin kaygı benzeri davranışlarını ve spontan lokomotor aktivitelerini karşılaştırmak için kullanıldı. Merkezde geçtikleri süre, 3, 6 ve 12 aylık YAC128 ve LM farelerinin kaygı ölçümü olarak kabul edilirken, hareketlilik süreleri ve ortalama hızları, spontan lokomotor aktivitelerini gösterdi. Grupları karşılaştırmak için *independent t* test kullanıldı. Temsili takip görüntüsünde (Şekil 19.b) ve grafiklerde (Şekil 19.c, d, e) görüldüğü gibi, 6 ve 12 aylık YAC128 fareleri (sırasıyla $t(10) = 2.94, p = .015$; $t(10) = 3.76, p = .004$), LM farelerine kıyasla açık alan merkez bölgesinde önemli ölçüde daha az zaman geçirdiler (Şekil 19.d-1, e-1). Aksine, 3 aylık YAC128 ve LM farelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($t(10) = 1.28, p = .231$) (Şekil 19.c-1). 3. ayda, hareket süresi ($t(10) = -1.70, p = .119$) (Şekil 19.c-2) ve ortalama hız ($t(10) = -0.91, p = .386$) (Şekil 19, c-3) açısından YAC128 farelerinin aktivitesinde LM farelerinininkine göre anlamlı bir fark gözlenmedi. 6 ve 12 aylık YAC128 fareleri, LM farelerine kıyasla önemli derecede hipoaktivite gösterdi. 6 aylık YAC128 farelerinin hareket süresi ($t(10) = 2.55, p = .029$) ve ortalama hızı ($t(10) = 2.82, p = .018$) LM'ye kıyasla azaldı (Şekil 19.d-2, 3). 12 aylık YAC128 ve LM fareleri karşılaştırıldığında, hareketlilik süresi ($t(10) = 5.30, p < .001$) ve ortalama hız ($t(10) = 4.38, p = .001$) açısından anlamlı ve en yüksek farklılık tespit edildi (Şekil 19.e-2, 3). Bu sonuçlar, 6 ve 12 aylık YAC128 farelerinin, LM farelerine kıyasla daha endişeli, depresif ve hareketsiz olduğunu ($p < .05$) gösterirken, 3 aylık YAC128 farelerinin, LM fareleri ile karşılaştırıldığında bu değişkenlerde anlamlı bir farklılık göstermediğini ortaya çıkardı. ($p > .05$).



Şekil 19. 3, 6 ve 12 aylık farelerin açık alan testi sonuçları. a) Davranış testi alanını gösteren temsili şekil. b) Her grup için temsili takip görüntüsü. Grafikler, 3, 6 ve 12 aylık fareler için c, d, e) açık alan merkez bölgesinde harcanan süre (1), hareketlilik süresi (2) ve ortalama hızdaki (3) değişiklikleri göstermektedir. *, ($p < .05$), **, ($p < .01$).

4.3 LC-MS/MS ve MALDI-MSI Analizlerinin Sonuçları

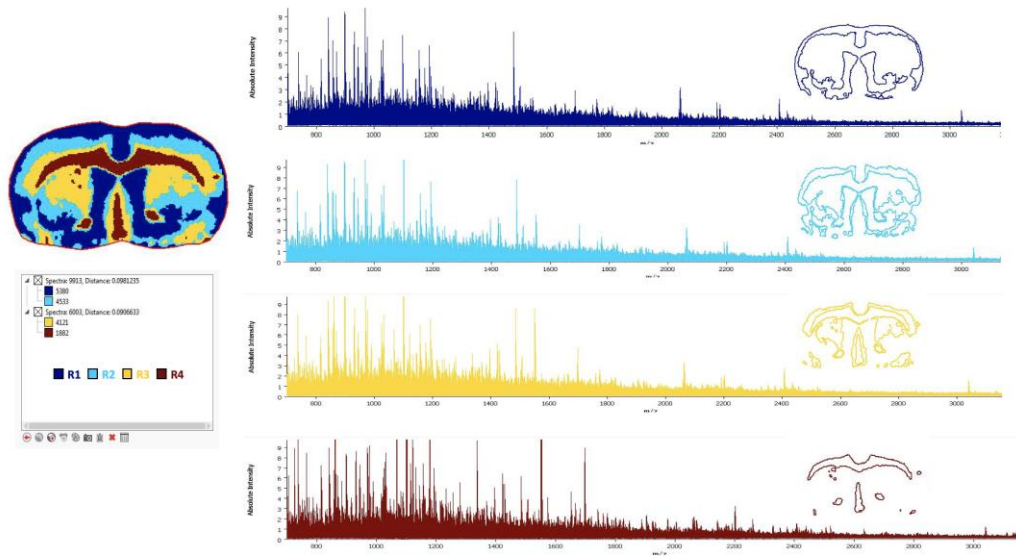
4.3.1 LC-MS/MS analizi

LC-MS/MS analizlerinde, 12 aylık fare beyin dokularının kesitlerinden 1940 (93) protein tanımlanırken, 3, 6 ve 12 aylık fare beyin dokularının tüm kesitlerinden toplam 1338 protein tanımlandı. Bu proteinlerin peptit listeleri, MALDI-MSI analizinden elde edilmiş gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren m/z değerleri ile eşleştirmek için kullanıldı.

4.3.2 MALDI-MSI analizi

4.3.2.1 12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI sonuçları

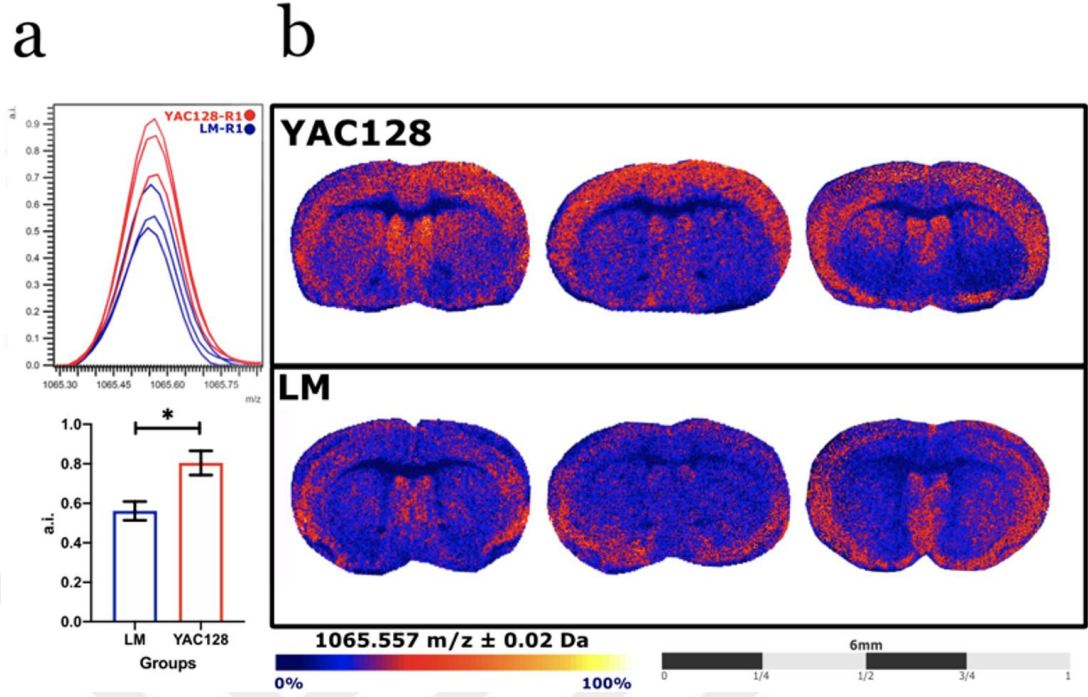
12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI verileri ile Scils Lab yazılımı kullanılarak yapılan otomatik segmentasyon analizi sonuçlarına göre beyin dokularından R1, R2, R3 ve R4 olmak üzere 4 farklı bölge elde edildi. Bu 4 farklı bölgenin temsili görüntüleri ve triptik peptit profilleri temsili segmentasyon haritası ile birlikte Şekil 20'de gösterilmiştir.



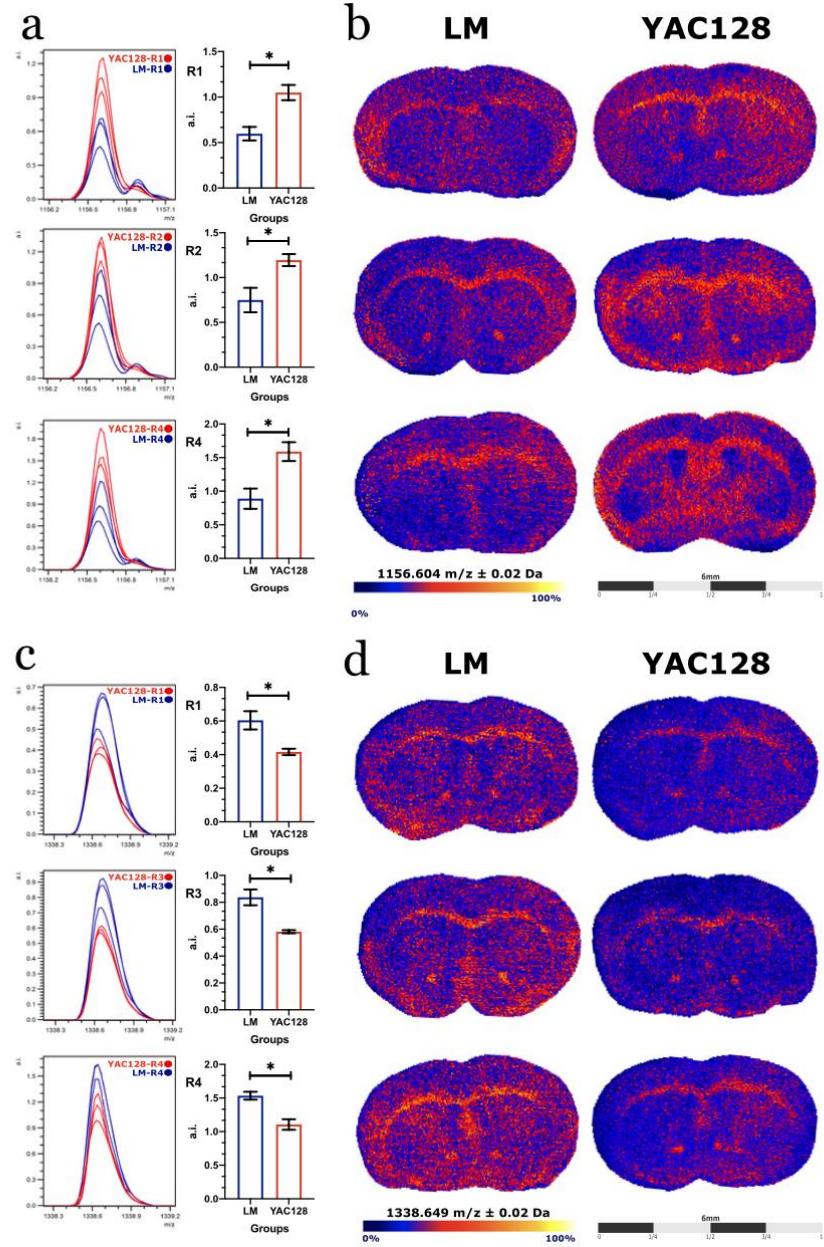
Şekil 20. 12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin temsili segmentasyon haritası, R1, R2, R3 ve R4 bölgelerine ait görüntüler ve triptik peptit profilleri.

12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI verilerinin segmentasyon analizinden elde edilen sonuçları karşılaştırmak için, her bir dokunun bölgesel verileri (internal kalibrasyonu yapılmış m/z ve normalize edilmiş intensite değerleri) Excel'e aktararak veri gruplaması (data binning) yapıldı. İlgili doku bölümlerinden farklı m/z değerleri 0,02 Da aralığında gruplandırıldığında, R1 için tekrarsız 154 m/z değeri ve R2, R3 ve R4 için tekrarsız 112 m/z değeri elde edildi. Daha sonra YAC128 ve LM dokularından sağlanan 4 farklı bölgenin yoğunluk değerleri istatistiksel testlerle birbiriyle (örneğin YAC128-R1 vs. LM-R1) karşılaştırıldı. İstatistiksel test sonuçlarına göre R1, R2, R3 ve R4 için sırasıyla 59, 30, 33 ve 31 m/z değerlerinin YAC128 ve LM arasında istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi (EK 2, Tablo 9). Sonunda, bu m/z değerleri, LC-MS/MS analizinden elde edilen proteinlerle minimum ppm hata oranı (0.5 – 29 ppm) göz önünde bulundurularak eşleştirildi ve 12 aylık YAC128 ve LM dokuları arasında anlamlı farklılık gösteren toplam 22 protein belirlendi (EK3, Tablo 10).

R1 bölgelerinin karşılaştırılması sonucunda, LC-MS/MS analizinden elde edilen bilgiler, iki grubu istatistiksel olarak birbirinden ayıran m/z değerlerinden biri olan 1065.56'nın glial fibriler asidik proteininin (GFAP) triptik peptitlerinden biri olduğunu gösterdi. Ayrıca, 12 aylık YAC128 dokularındaki GFAP triptik peptidinin intensitesinin, LM'dekinden istatistiksel olarak önemli ölçüde ($p < .05$) daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 21.a). Benzer şekilde, gruplar arasında istatistiksel olarak farklılaşan 1156,60 (R1, R2 ve R4) ve 1338.64 (R1, R3 ve R4) m/z değerlerinin, NAD-bağımlı protein deasetilaz sirtuin-2 ve sitrat sentaz proteinlerinin (Şekil 22.a ve c) triptik peptitleri olduğu belirlendi. 22 proteinden, bu 3 proteinin doku üzerindeki dağılımları ve intensite grafikleri Şekil 21.b ve Şekil 22.b ve d'de gösterilmiştir.



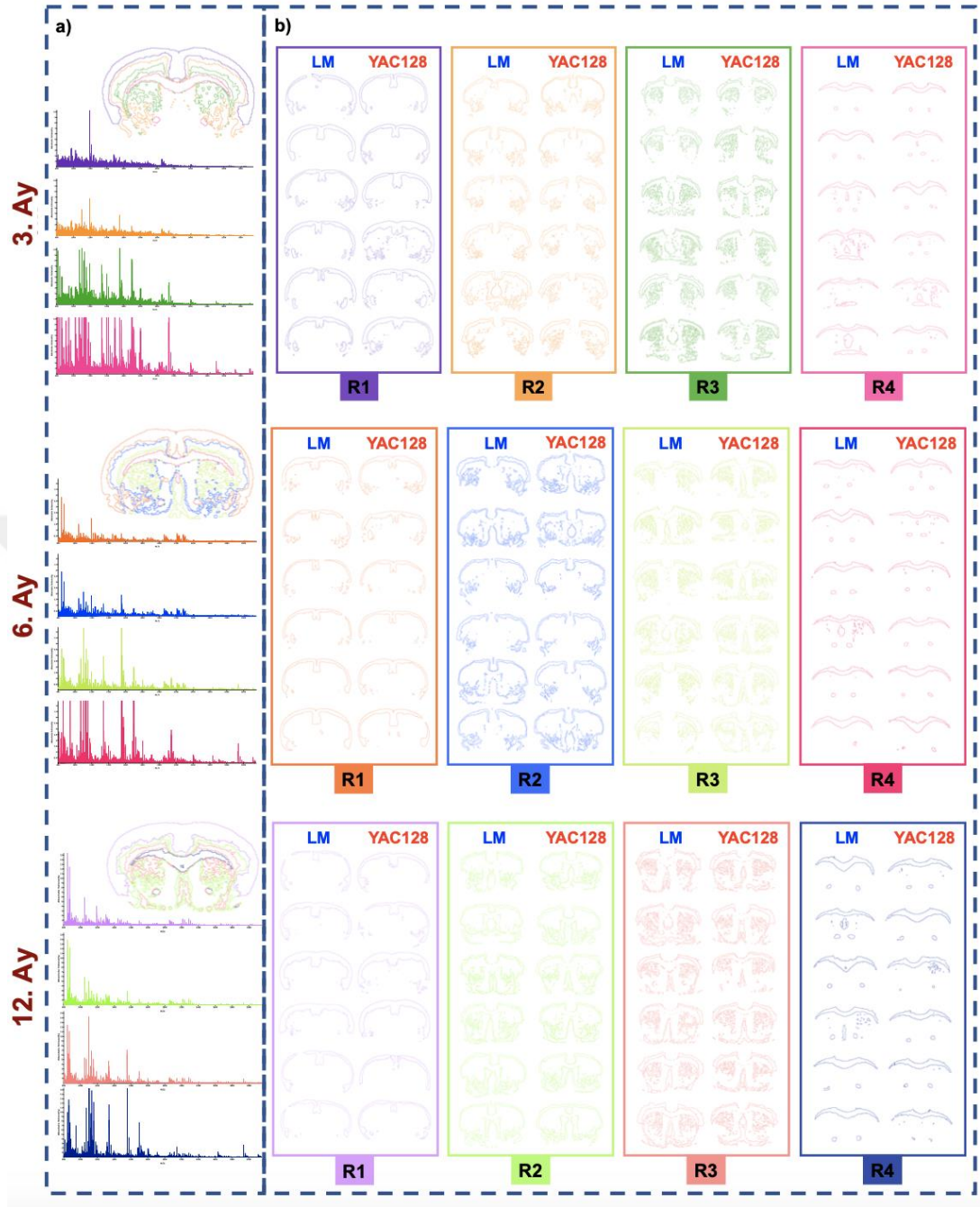
Şekil 21. GFAP'ın 12 aylık YAC128 ve LM beyin doku kesitleri üzerindeki dağılımı ve intensite grafikleri. a) R1 bölgesinden elde edilen 1065,56 m/z spektrumu (bir GFAP peptidi) ve intensite değerlerinden elde edilen bar grafiği, b) 1065,56 + 0,02 Da m/z'sinin farklı biyolojik dokular üzerindeki dağılımı. *, ($p < .05$). İntensite grafiğindeki x ve y eksenleri sırasıyla m/z ve auto intensite (a.i.) değerlerini, renk gradyanı ve siyah-gri ölçek çubuğu, sırasıyla yoğunluk seviyelerini ve beyin dokusu kesit boyutunu ifade etmektedir.



Şekil 22. Sirtuin-2 ve sitrat sentaz proteinlerinin 12 aylık YAC128 ve LM fare beyin doku kesitleri üzerindeki dağılımları ve intensite grafikleri. a) R1, R2 ve R4 bölgelerinden elde edilen 1156,60 m/z 'sinin (sirtuin-2 proteininin bir peptidi) spektrumu ve intensite değerlerinden elde edilen bar grafiği. b) 1156.60 $\pm$ 0.02 Da m/z 'sinin farklı biyolojik dokular üzerindeki dağılımı. c) R1, R3 ve R4 bölgelerinden elde edilen 1338,64 m/z 'sinin (sitrat sentaz proteininin bir peptidi) spektrumu ve intensite değerlerinden elde edilen bar grafiği. d) 1338.64 $\pm$ 0.02 Da m/z 'sinin farklı biyolojik dokular üzerindeki dağılımı. *, ($p < .05$). İntensite grafiğindeki x ve y eksenleri sırasıyla m/z ve auto intensite (a.i.) değerlerini, renk gradyanı ve siyah-gri ölçek çubuğu, sırasıyla yoğunluk seviyelerini ve beyin dokusu kesit boyutunu ifade etmektedir.

4.3.2.2 3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI sonuçları (iyileştirilmiş protokol)

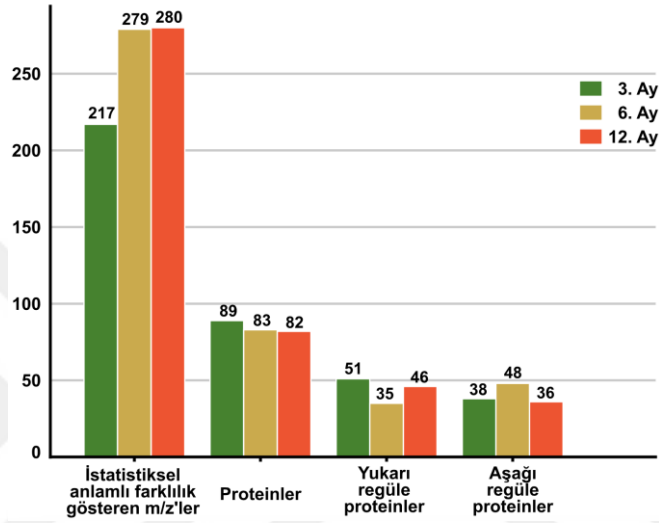
3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin dokularının örnek hazırlığındaki kesit alma basamağında, kesitlerin ITO lamaların merkezinde, birbirine yakın ve daha küçük bir alan içerisinde olacak şekilde alınmış olması ve ardından lamaların yıkama prosedüründe soğutulmuş solüsyonların kullanılması, MALDI-MSI analiz verilerine uygulanan data işleme prosedüründeki segmentasyon analizinde daha başarılı sonuçlar edilmesini sağladı. Yapılan bu iyileştirmelerin sonucunda, segmentasyon analizi ile belirlenen bölgelerin (R1, R2, R3 ve R4) birbirleriyle örtüşmeksizin daha keskin ayrımlar gösterdiği (Şekil 23) ve tripsinizasyon etkinliğinin artırılmış olması sebebiyle büyük m/z değerlerine sahip peptitlerin (2000 ve üzeri) dahi saptanabildiği ve kromatogramlar üzerinde görülebildiği tespit edildi.



Şekil 23. 3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin dokularının segmentasyon analizi ile belirlenen R1, R2, R3 ve R4 bölgelerine ait görüntüler ve temsili triptik peptit profilleri. a) Her gruptan bir beyin dokusuna ait segmentasyon görüntüleri ve bölge-spesifik triptik peptit profilleri. b) 3, 6 ve 12 aylık grupların her biri için 12 farklı doku kesitinin bölge-spesifik görselleri.

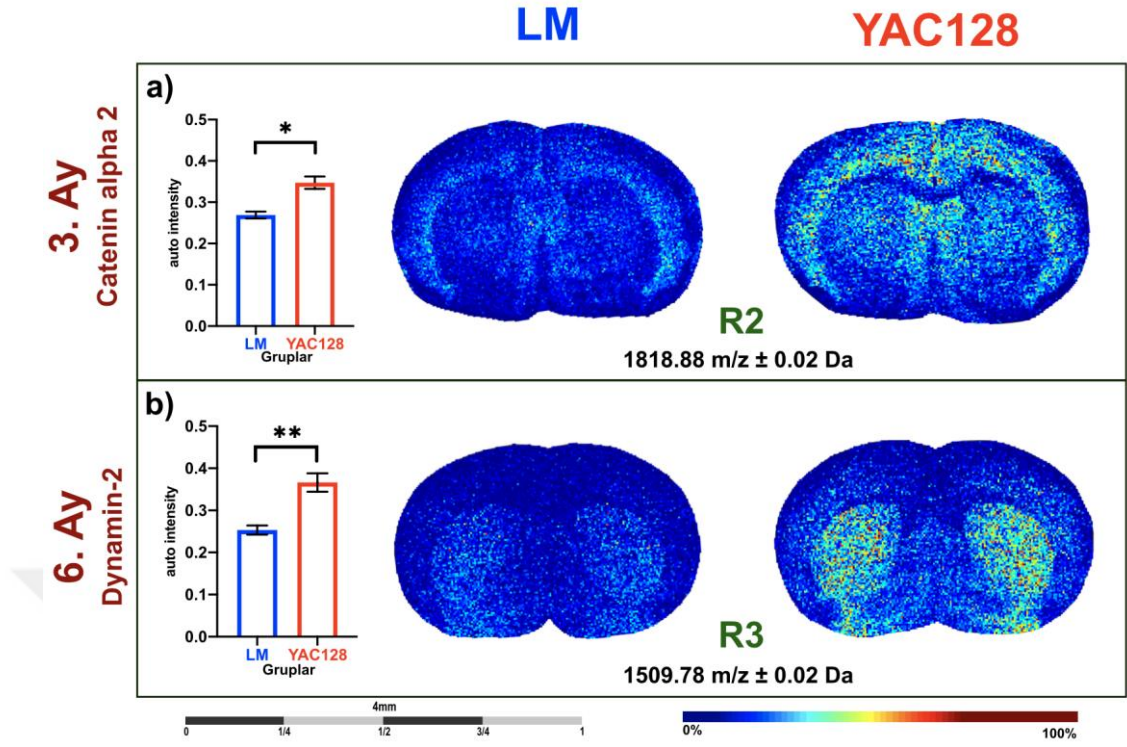
3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin doku kesitlerinin MALDI-MSI analiz sonuçlarında, SciLS Lab yazılımındaki otomatik mekansal segmentasyon analizinin

kullanılmasıyla, doku kesitleri üzerinde Şekil 23’ da gösterildiği gibi birbirinden ayrılmış 4 bölge (R1, R2, R3, R4) yazılım tarafından belirlendi. 3, 6 ve 12 aylık gruplardaki her bir örnek için bölgesel verilerin kalibre ve normalize edilmesinden sonra, YAC128 ve LM fareleri arasındaki m/z değerlerinin intensiteleri istatistiksel testlerle değerlendirildi ve 3, 6 ve 12 aylık fareler için sırasıyla toplam 217, 279 ve 280 m/z değeri istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p < .05$) (Şekil 24).



Şekil 24. m/z değerleri ve tanımlanan proteinlerin sayısı. Grafik, 3, 6 ve 12. aylarda LM ve YAC128 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı m/z değerlerinin ($p < .05$), ± 5 ppm hata oranının altında eşleştirme ile belirlenen proteinlerin ve yukarı/aşağı regüle olan proteinlerin sayısını göstermektedir.

Bu peptit m/z değerlerinin LC-MS/MS sonuçlarından elde edilen proteinlerle maximum ± 5 ppm hata oranı ile eşleştirilmesinin bir sonucu olarak, sırasıyla 3, 6 ve 12 aylık fareler için 89, 83 ve 82 adet ekspresyonel farklılık gösteren protein elde edildi (EK 4, Tablo 11). Bu proteinler arasında, 3 aylık farelerde 51 proteinin yukarı regüle ve 38 proteinin aşağı regüle, 6 aylık farelerde sırasıyla 35 ve 48 proteinin yukarı ve aşağı regüle ve 12 aylık farelerde sırasıyla 46 ve 36 proteinin yukarı ve aşağı regüle bulundu (Şekil 24). Seçilen 6 proteinin (3 aylık için Tau, 1579,8 m/z ve Catenin alpha 2, 1818,88 m/z; 6 aylık için Dynamin-2, 1509,78 m/z ve EF2, 1543,77 m/z; 12 aylık için HSP70, 1196,57 m/z ve NogoA, 2281,12 m/z) dokular üzerindeki bölgesel dağılımları ve YAC128 ve LM grupları arasındaki intensite farklılıkları Şekil 25 ve Şekil 29.a, b, c, d-1’de gösterilmiştir.

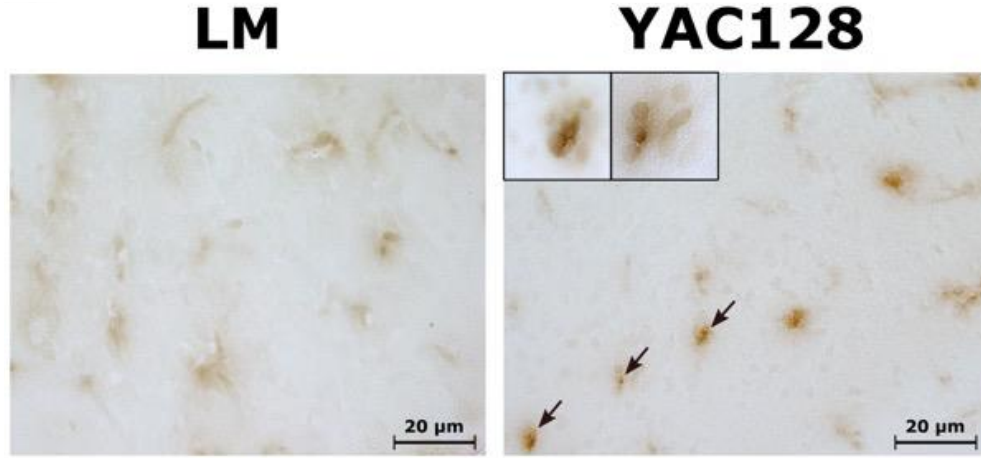


Şekil 25. LM ve YAC128 fare beyin dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren m/z değerlerinin temsili görüntüleri ve intensite değerlerinden elde edilen bar grafikler. a) 3 aylık dokuların R2 bölgelerinde anlamlı farklılık elde edilen 1818.88 m/z (bir Katenin alfa 2 peptidi). b) 6 aylık dokuların R3 bölgelerinde anlamlı farklılık elde edilen 1509.78 m/z (bir Dynamin-2 peptidi). *, ($p < .05$), **, ($p < .01$). a.i., auto intensity. Siyah-gri ölçek çubuğu ve renk gradyanı, sırasıyla beyin dokusu kesit boyutunu ve intensite seviyelerini göstermektedir.

4.4 İmmünohistokimya Analiz Sonuçları

4.4.1 EM48 antikoruna özgü immünohistokimyasal boyama

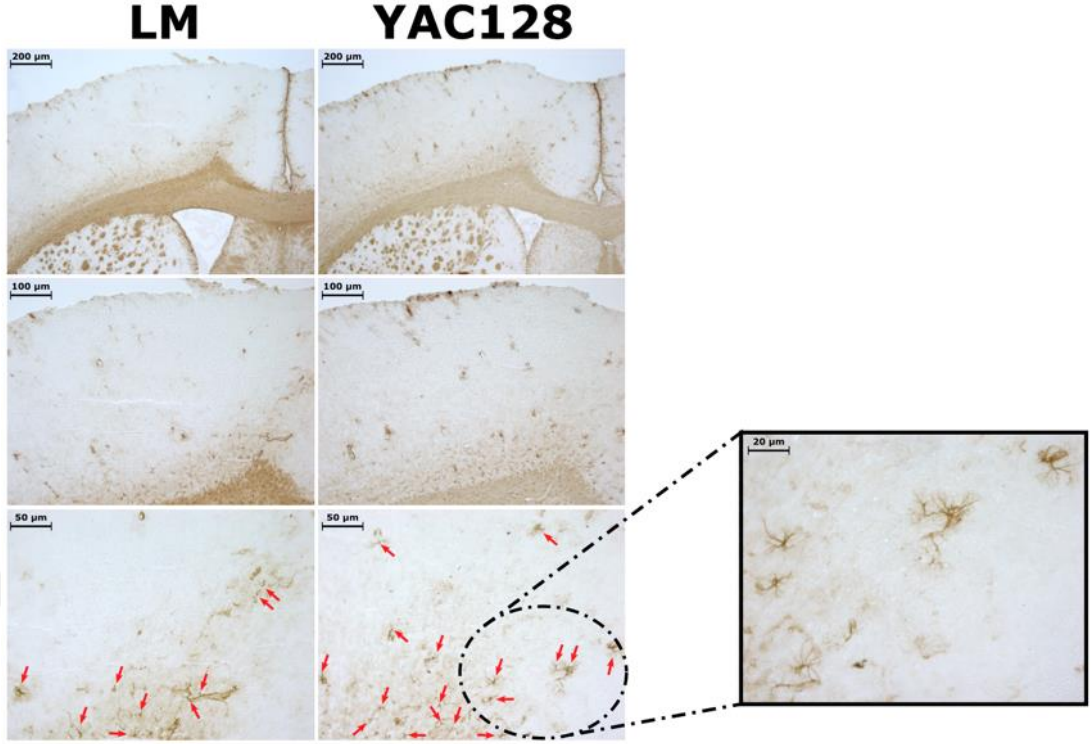
Kullanılan fare modelinin hastalık patolojisine sahip olup olmadığını belirlemek için yapılan immünohistokimya analizlerine göre literatüre uyumlu olarak 3 ve 6. ayda hem YAC128 hem de LM örneklerinde poliglutamin birikimi gözlenmez iken 12. ay YAC128 beyin dokularında EM48 antikoruna karşı boyanmalar tespit edilmiştir (Şekil 26).



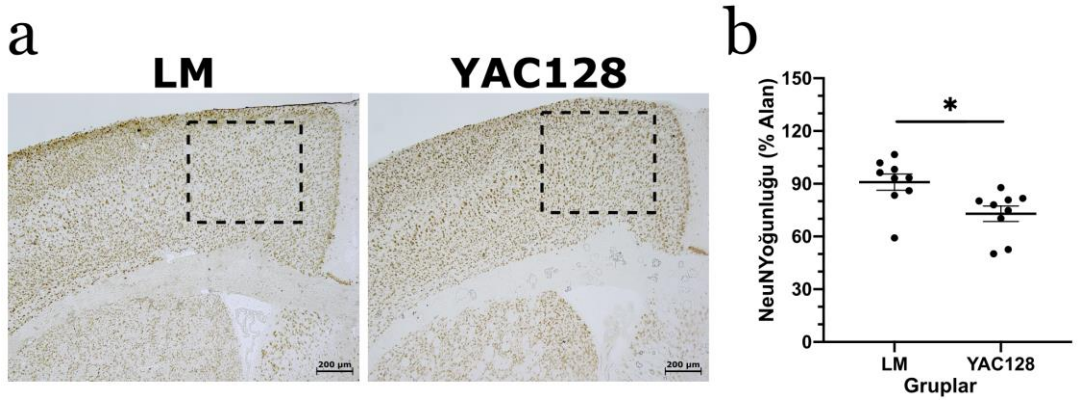
Şekil 26. 12 aylık LM ve YAC128 farelerinin beyin dokularında mEM48 antikorunun immüno-histokimyasal boyama yöntemiyle gösterimi. Orijinal büyütme: 40X, sol köşede ekli küçük resimler: 100X.

4.4.2 12 aylık farelere ait beyin dokularının MALDI-MSI verilerinin immünohistokimyasal boyama validasyon sonuçları

İyileştirilmiş protokol uygulanmamış olan 12 aylık örneklerin MALDI-MSI analizinden elde edilen verileri doğrulamak amacıyla, LM ve YAC128 doku örneklerinde büyük ölçüde korteksi temsil eden R1 bölgeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren GFAP proteinini geleneksel bir yöntemle valide etmek için immünohistokimyasal boyama yapıldı. 12 aylık YAC128 farelerinin kortekslerinde LM'ye kıyasla daha yüksek GFAP boyaması tespit edildi (Şekil 27) (93). Buna ek olarak, MALDI-MSI tarafından tespit edilen birkaç proteinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (özellikle sadece R1 bölgesinde değişim gösterenler) nöronal kayıpla ilişkilendirilmiştir. Bu hipotez, YAC128 fareleri için ($M = 72.92$, $SEM = 4.38$) LM'den ($M = 90.91$, $SEM = 4.64$) önemli ölçüde daha düşük olan NeuN (nöronal spesifik bir belirteç) antikorunun immünohistokimyasal boyanması ile doğrulandı ($t(16) = 2.82$, $p < .05$) (Şekil 28).



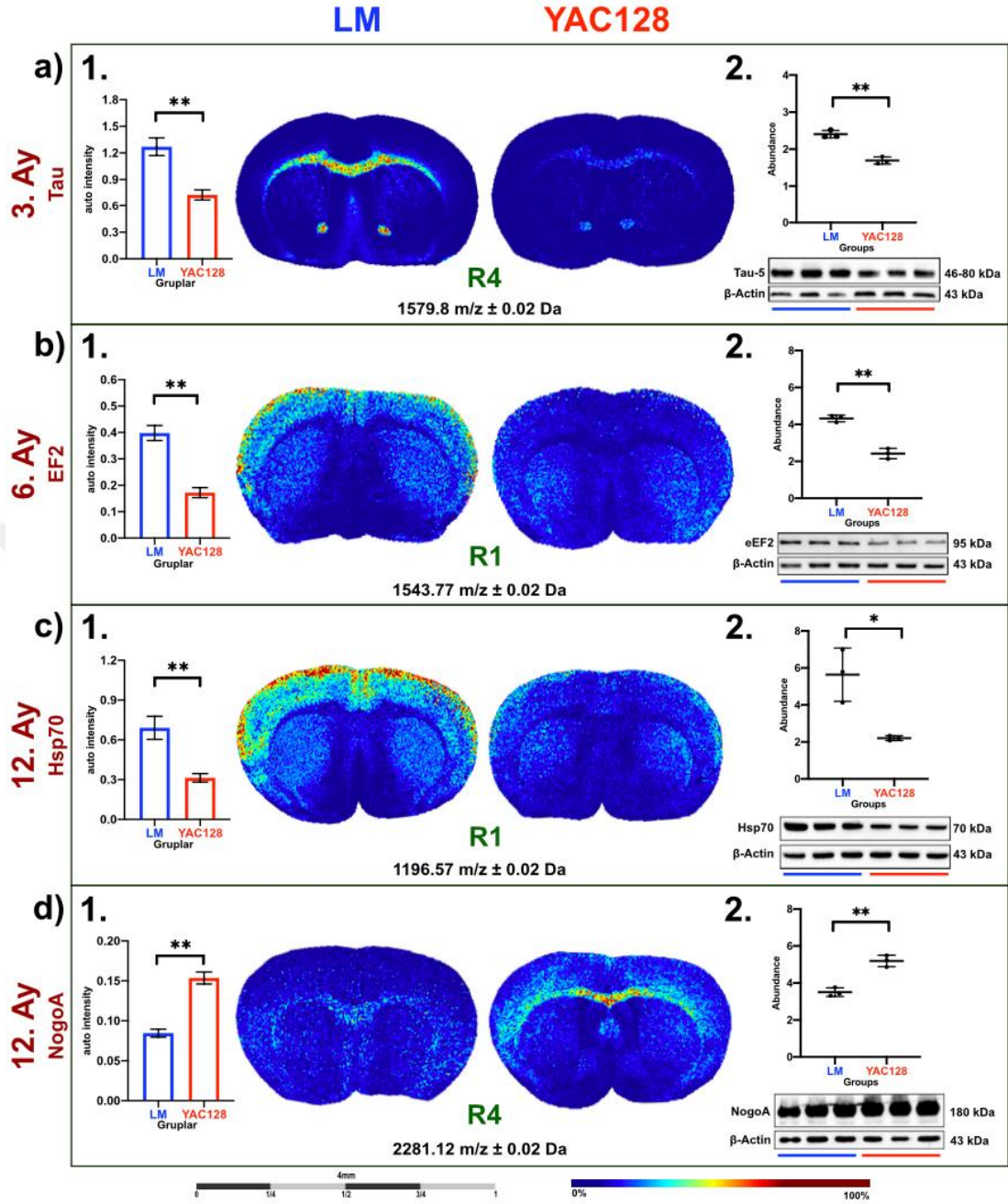
Şekil 27. 12 aylık LM ve YAC128 beyin dokularındaki GFAP immunohistokimyasal boyanmasının görüntüleri. Büyütme oranları: üst kutular: 5X , alt kutular: 20X.



Şekil 28. Kortikal NeuN yoğunluğunun gösterimi ve ölçümü. a) LM ve YAC128'deki koronal beyin kesitlerinin NeuN için immünohistokimyasal boyanma paterni. b) ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen NeuN yoğunluğunun miktar tayini. *, ($p < .05$). Orijinal büyütme: 5X.

4.5 3, 6 ve 12 aylık farelere ait beyin dokularının MALDI-MSI verilerinin western blot validasyon sonuçları

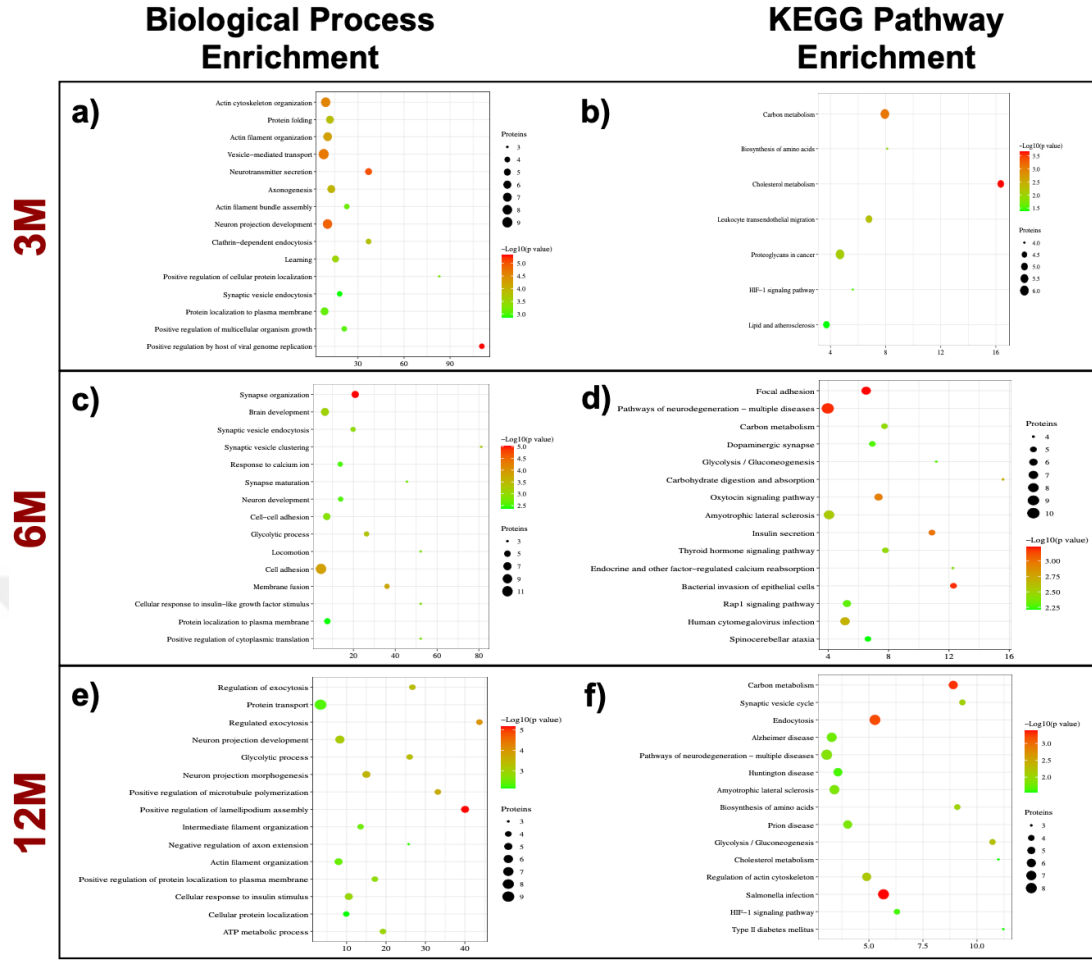
İyileştirilmiş protokol uygulanan 3, 6 ve 12 aylık örneklerin MALDI-MSI analizleriyle elde edilen protein ekspresyon sonuçlarını valide etmek amacıyla, seçilen 4 protein için western blot analizleri yapıldı. Karşılaştırılan değişkenler normal dağılım gösterdiğinden, istatistiksel farklılıkları değerlendirmek için *independent student t* test kullanıldı. Western blot analizleri, Tau ($t(4) = 8.87, p = .001$), EF2 ($t(4) = 9.89, p = .001$), HSP70 ($t(4) = 4.12, p = .015$) proteinlerinin sırasıyla 3, 6 ve 12. ayda LM örneklerine kıyasla YAC128 örneklerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde azaldığını gösterdi (Şekil 29.a, b, c-2). Farklı olarak NogoA proteininin ($t(4) = -7.54, p = .002$) western blot analizinde 12 aylık YAC128 beyin dokularında kontrol dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulundu (Şekil 29.d-2). Şekilde de görüldüğü üzere, western blot sonuçları, bu çalışmada MALDI-MSI analizleri ile tespit edilen protein ekspresyon değişiklikleri ile tutarlıydı.



Şekil 29. Gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilen Tau, EF2, Hsp70 ve NogoA proteinlerinin dokular üzerindeki dağılımlarını gösteren temsili görüntüler ve bunların western blot validasyonları. a-1) 3 aylık dokuların R4 bölgelerinde 1579,80 m/z (bir Tau peptidi), b-1) 6 aylık dokuların R1 bölgelerinde 1543,77 m/z (EF2 peptidi), c, d-1) 12 aylık dokuların, sırasıyla R1 ve R4 bölgelerinde 1196,57 m/z (HSP70'in bir peptidi) ve 2281,12 m/z (NogoA'nın bir peptidi). a, b, c, d-2) Sırasıyla Tau, EF2, HSP70 ve NogoA proteinleri için western blot analiz sonuçları. *, ($p < .05$), **, ($p < .01$). a.i., auto intensity. Siyah-gri ölçek çubuğu ve renk gradyanı, sırasıyla beyin dokusu kesit boyutunu ve intensite seviyelerini göstermektedir.

4.6 Biyoinformatik Analizler

3, 6 ve 12 aylık örneklerin MALDI-MSI analizleri sonucunda R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde istatistiksel anlamlılığa sahip ekspresyonel değişim gösteren proteinler, biyolojik süreçlere katılımlarını belirlemek için fare proteini referans veri tabanında bulunan bilgilere dayalı olarak ayrı ayrı analiz edildi. Her bir zaman noktası için, ilk 15 biyolojik süreç (BP) zenginleştirmesi, baloncuk grafikleriyle gösterildi (Şekil 30). 3 aylık fareler için en önemli biyolojik süreçler aktin hücre iskeleti organizasyonu, taşınması ve endositozu (Şekil 30.a) iken, 6 aylık fareler için ise sinaps organizasyonu, olgunlaşması ve sinaptik vezikül endositozudur (Şekil 30.c). 12 aylık farelerde, ekzositozun düzenlenmesi, nöron projeksiyon morfogenez, glikolitik süreç ve mikrotübül polimerizasyonunun pozitif düzenlenmesi dikkate değer biyolojik zenginleşmelerdir (Şekil 30.e). Anlamlı değişim gösteren proteinlerin dahil olduğu yolları daha iyi anlamak için KEGG yolağı analizi yapıldı. 3 aylık örneklerden elde edilen anlamlı değişim gösteren proteinler için önde gelen KEGG sinyal yolları, karbon metabolizması, kolesterol metabolizması ve amino asitlerin biyosentezidir (Şekil 30.b). 6 aylık örneklerden elde edilen anlamlı değişim gösteren proteinler için göze çarpan yollar, nörodejenerasyon, karbon metabolizması, fokal adezyon, insülin sekresyonu, oksitosin ve tiroid hormonu sinyal yolu ve glikoliz/glukoneogenez yollarıdır (Şekil 30.d). Son olarak, 12 aylık örneklerden elde edilen anlamlı değişim gösteren proteinler için göze çarpan yollar, karbon metabolizması, endositoz, nörodejenerasyon yolları, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, sinaptik vezikül, glikoliz/glikoneogenez ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesidir (Şekil 30.e).



Şekil 30. Anlamlı farklılık gösteren proteinlerin katıldıkları biyolojik süreçler ve zenginleştikleri KEGG yollarının baloncuk grafiği ile gösterimi. a, b) 3. ay; c, d) 6. ay; e, f) 12. ay. y eksenini biyolojik süreçleri ve KEGG terimlerini temsil ederken, x eksenini $\log_{10}$ tabanında zenginleştirme katını (fold enrichment, FE) temsil eder. Sembollerin boyutu, belirtilen terimle ilişkili protein kodlayan genlerin sayısını belirtirken; renkler, p değerini göstermektedir ($-\log_{10}$).

5 TARTIŞMA

HH, 4. kromozomdaki *htt* geninde CAG trinükleotit tekrarlarının genişlemesinden kaynaklanan, beyinde hasara, bilişsel yetersizliğe, kontrolsüz hareketlere ve duygusal dalgalanmalara yol açan ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Genetiği değiştirilmiş farelerin HH gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanılması, insanlara fizyolojik benzerliklerinden dolayı hastalığın anlaşılmasında önemli faydalar sağlar. Tam uzunlukta bir insan mutant *htt* proteini taşıyan YAC128 transgenik farelerinin, ilerleyici motor işlev bozukluğu, bilişsel bozukluk ve seçici nöropatoloji gibi insan HH' sinin birçok ayırt edici özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (94) ve bu özelliklerinden dolayı araştırmalarda en çok tercih edilen HH fare modellerinden birisidir. Anksiyete, ortalama hız ve spontan lokomotor aktivite eksikliklerini gösteren davranış testi sonuçları (Şekil 19) ve striatal mutant *htt* kümelerinin (poliglutamin) varlığı (Şekil 26), YAC128'in geçerli bir HH transgenik fare modeli olduğunu ve bu nedenle HH ile ilgili araştırmalar için uygun bir model olduğunu desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, HH'nin farklı evrelerinde mekansal moleküler değişikliklerin proteomik açıdan araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, literatürdeki bilgiler ışığında 3 zaman noktası belirlendi; 3. ay, davranışsal veya patolojik belirteçlerin henüz ortaya çıkmadığı pre-patolojik dönem olarak; 6. ay, görünür motor kusurların başladığı, ancak belirgin nöropatolojik özelliklerin gözlenmediği gelişimsel dönem olarak; ve 12. ay, YAC128 fare modelinde önemli motor eksiklikler, nöronal bozulmalar ve tespit edilebilir inklüzyonların gözlenebildiği patolojik dönem olarak seçildi. 3 aylık YAC128 farelerinin sağlıklı kontrollere (LM) kıyasla anlamlı bir fark göstermediğini ortaya koyan açık alan davranış testinde literatürle uyumlu sonuçlara ulaşıldı. Bunun aksine, 6 ve 12 aylık YAC128 farelerinde LM farelere kıyasla hipoaktivitede artış, hareket süresi ve ortalama hızda istatistiksel olarak anlamlı düşüşler tespit edildi ve bu değişimler açısından 12 aylık YAC128 ve LM fareleri arasındaki farkın 6. ay grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 19).

HH'nin moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak amacıyla bugüne kadar pekçok güçlü proteomik teknikleri kullanılmıştır (67–69). Standart kütle spektrometresi teknikleri, vücut sıvıları, dokular veya hücre numunelerini analiz

etmeyi sağlar. Ancak bu analiz teknikleriyle, biyolojik numuneler her zaman homojen olmayabileceğinden ve dokular benzer tipte hücreler içermeyebileceğinden, ve ayrıca analizlerde total örnek lizatlarının kullanılmasından ötürü ilgilenilen biyomoleküllerin bölgeye özgü bilgileri kaybedilir ve mekansal biyokimyasal farklılıklar tanımlanamaz. MALDI-MSI teknolojisi, total örnek homojenizasyonu gerektirmeden, proteinler, peptitler, lipitler ve metabolitler gibi biyomoleküllerin doğrudan doku kesitlerinde mekansal olarak analiz edilmesini ve görselleştirilmesini mümkün kılan yeni bir MS tabanlı tekniktir. Bu yaklaşımla, dokuların kimyasal ve mekansal bütünlüğü, homojenizasyon işlemi sırasında kaybolabilecek bölgeye özgü değişikliklerle birlikte korunur. MALDI-MSI tabanlı proteomik çalışmaların, bölgesel farklılıkları tespit etme kapasitesinin yüksek olması nedeniyle HH araştırmalarına yeni bir bakış açısı getirebileceğini düşünmekteyiz.

MALDI-MSI analizinden elde edilen veriler büyük miktarda spektral bilgiye sahiptir ve her işlenmemiş spektrum binlerce m/z değeri içerir. Birden çok MALDI-MSI verisini birlikte değerlendirmek ve karşılaştırmak, veri işleme, analiz ve görselleştirmede önemli zorlukları da beraberinde getirir. Verileri işlemek ve görselleştirmek için, cihazın üreticisi tarafından sağlanan SciLS Lab gibi bir yazılımla taban çizgisi düzeltme (baseline correction), düzleştirme (smoothing), segmentasyon analizi gibi yaygın veri ön işleme (pre-processing) yöntemleri gerçekleştirilebilir. Bilinen bir kütleli kullanarak internal kalibrasyon yapmak, iki veya daha fazla spektrumu karşılaştırırken veri kümeleri arasında doğru kütle hizalamasını sağlamak için başka bir önemli ön işleme adımıdır. Bu amaçla kullanılabilecek mMass gibi ücretsiz erişilebilir yazılımlar bulunmaktadır. Verilere uygun ön işleme yöntemlerinin uygulanması ile örnek hazırlamadaki farklılıklar, günden güne ve pikselden piksele olabilecek varyasyonlar gibi deneysel artefaktlar doğru şekilde ortadan kaldırılabilir ve böylece spektrumlar birbiriyle karşılaştırılabilir hale gelir. Öte yandan, bu teknikle elde edilen verilerle proteinlerin doğrudan tanımlanabilmesi mümkün değildir. Bu yetersizliğin üstesinden gelebilmek amacıyla, proteinleri belirlemek için genellikle LC-MS/MS tabanlı tanımlama kullanılır. Tüm bu bilgiler ışığında deneysel süreçte elde edilen verilerin kalitesini en üst düzeye çıkarmak ve oluşabilecek hataları en aza indirmek için bu tez çalışmasında çeşitli önlemler alınmıştır. İlk olarak, trypsinizasyon

etkinliğini değerlendirmek için, sığır serum albümin proteini (BSA), ITO lamaların üzerindeki doku kesitlerinin yakınına damlatıldı ve dokularla birlikte tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Her örnek analizi öncesi BSA'nın bulunduğu alana ardarda lazer atışları yapıp veri toplandı ve elde edilen triptik BSA peptit piklerinin ve intensitelerinin birbirleriyle benzer bir trend içinde olduğu kaydedildi. İkinci olarak, örnekler arasında tekrarlanabilirliği kontrol etmek amacıyla her doku analizinen elde edilen MBP için, MBP'nin bilinen peptitlerinin kesit üzerindeki mekansal dağılımları ve intensiteleri değerlendirildi. Üçüncü olarak, uygun kütle hizalamasını sağlamak için birden fazla MBP peptidi kullanılarak, analiz edilen tüm dokuların total spektrumları üzerinde yeniden kalibrasyon (internal kalibrasyon) geręekleştirildi. Dördüncü olarak, LC-MS/MS analizlerinden elde edilen verilere katı bir yanlış eşleşme oranı ($FDR < 1\%$) ve benzersiz peptit filtreleme kriterleri uygulandı. MALDI-MSI analizi ile elde edilen m/z değerlerinin protein karşılıklarını belirlemede minimum ppm hata oranıyla eşleştirme yapılırken sadece LC-MS/MS'de en az 3 peptit ile tanımlabilen proteinler kabul edildi. Sonuç olarak, bu çalışma hem LC-MS/MS hem de MALDI-MSI'dan sağlanan katı veriler kullanılarak geręekleştirildi (93).

5.1 12 Aylık YAC128 ve LM farelerine Ait Beyin Doku Kesitlerinin MALDI-MSI Analizleri

12 aylık fare beyin dokularının MALDI-MSI analizi ve ardından SCiLS Lab aracılığıyla yapılan denetimsiz (unsupervised) segmentasyon analizi, belli anatomik bölgeleri içeren 4 ayırt edici bölgeyi ortaya çıkardı: R1 - korteks, lateral ventrikülün bir parçası, septum ve nükleus akkumbens, R2 - striatum ve preoptik alan, R3 – korpus kallosumun küçük bir kısmı ve striatum ve R4 - korpus kallosum ve anterior komissür. HH'deki en hassas ve sağlam bulgu, striatumda ilerleyici nöronal ölümün bir sonucu olan atrofidir. Striatumdaki orta dikenli nöronlarda bir azalma vardır, ancak bu özel savunmasızlığın kaynağı bilinmemektedir (95). Kortekste mutant *htt* birikimi ve dismorfik dendritler gibi morfolojik değişiklikler, HH fare modelinin kullanıldığı bir çalışmada daha önce gösterilmiştir (96). Beyindeki en büyük beyaz madde lif yolunu içeren korpus kallozum (CC), HH'den etkilenen başka bir bölgedir. CC'deki değişiklikler ve beyaz madde anormallikleri, HH fare modellerinde incelenmiştir (97). Septum, nükleus akumbens, preoptik alan ve anterior komissür bölgeleri ile ilgili

sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen HH'de bu bölgelerin çeşitli mekanizmalarla etkilendiği bilinmektedir (98–102).

12 aylık YAC128 ve LM fare beyin dokularının MALDI-MSI analizleri sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren 22 protein tespit edildi (EK 3, Tablo 10). Yapılan literatür araştırmalarına göre bunlardan 6'sı daha önce doğrudan HH ile ilişkilendirilirken, 16 proteinin diferansiyel ekspresyon seviyeleri ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Citrate synthase (103,104), Sirtuin-2 (105–109), Serine/threonine-protein phosphatase 2B (110–114), Dihydropyrimidinase-related protein 2 (67,115), UV excision repair protein RAD23B (116) ve GFAP'in (117–119) daha önce doğrudan HH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Gruplar arasındaki proteinlerin ifade değişiklikleri, iki istisna dışında literatürle tutarlıydı. UV excision repair protein RAD23B 'nin HH hastalarının striatumundaki inklüzyon cisimciklerinde biriktiği gösterilmiştir (116). MALDI-MSI analizi sonuçlarına göre YAC128 fare modelinde striatumu içermeyen R1 bölgesinde bu proteinin intensitesinde bir azalma saptadık. HH'de Serine/threonine-protein phosphatase 2B (PP2B)'nin ifade değişikliği hakkında literatürde tartışmalı raporlar bulunmaktadır. PP2B proteini için, ölümsüzleştirilmiş prekürsör striatal HH hücrelerindeki ekspresyon seviyesinde artış rapor edilirken (120), YAC128 farelerinin striatum lizatlarından elde edilen PP2B ekspresyonunda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (114). Bunun sebebi, tüm doku lizati çalışılmasından ötürü bölgesel ekspresyon bilgisinin kaybı olabilir. Bu çalışmada MALDI-MSI analizi ile YAC128 beyin dokusunun R1, R3 ve R4 bölgelerinde PP2B proteini için LM'ye kıyasla yüksek intensite değerleri elde ettik ($p < 0.05$). Literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak elde ettiğimiz sonuçlar, hem araştırmamız için seçtiğimiz fare modelini hem de daha da önemlisi MALDI-MSI deneyleri için kullandığımız veri işleme analizinin geçerliliğini desteklemektedir. EK 3, Tablo 10'daki diğer proteinlerin HH ile doğrudan ilişkisi daha önce bildirilmemiştir. Bununla birlikte, yapılan literatür araştırmaları ile bu proteinlerin diğer nörodejeneratif hastalıklarda veya HH ile ilgili yolaklarda yer aldıkları tespit edildi. Mutant *htt*, HH'nin önemli bir özelliğidir ve Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) (38), Alpha-actinin-1 (121–123), Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1 (124), Importin subunit beta-1 (125,126) ve Destrin (127,128) proteinlerinin *htt* ile

çeşitli şekillerde ilişkili olduğu bildirilmiştir. YAC128 HH fare modelinin karakteristik özelliklerinden birisi de artmış kaygıya sahip olmasıdır ki kaygıdaki bu artışın Limbic system-associated membrane protein ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (129). Reticulon-4, Vacuolar protein sorting-associated protein 13C ve Syntaxin-1A proteinleri, HH'de ciddi şekilde bozulmuş olan trafficking yolağına dahil olurlar (130–133). Proteasome subunit alpha type 5, Spectrin beta chain non-erythrocytic 1, Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 ve ayrıca Microtubule-associated protein 1A, 2'_3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase ve Vacuolar protein sorting-associated protein 13C proteinlerinin de daha önce diğer nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı rapor edilmiştir (134–141). Trifunctional enzyme subunit beta ve ATP synthase subunit gamma proteinleri HH ile ilişkilendirilmemiştir, ancak bu proteinlerin bazı alt birimlerinin diğer nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (142–145). MALDI-MSI analizleri aracılığıyla elde edilen verilerden yola çıkarak, bu proteinlerin HH mekanizmasıyla ilişkili olabileceğini öne sürmekteyiz. Bu veriler, yalnızca HH ile ilişkili proteinleri ortaya çıkarmakla kalmayıp, aynı zamanda MALDI-MSI aracılığıyla mekansal bilgi edinilebilmesi sebebiyle mevcut bilgimize katkıda bulunur (EK 3, Tablo 10). Bu proteinler hakkında yapılacak daha fazla araştırma, HH patolojisi hakkında derinlemesine bilgi edinmemize yardımcı olabilir.

12 aylık YAC128 ve LM farelerinin beyin dokuları ile yapılan MALDI-MSI analiz sonuçlarını doğrulamak için immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. İlk olarak, MALDI-MSI analizinin doğrulanması olarak, büyük oranda korteksi içeren R1 bölgesinde gruplar arasında farklı yoğunlukta saptanan GFAP'ın dokular üzerindeki bolluğu immünohistokimyasal boyama ile doğrulandı (Şekil 27). İkinci olarak, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen MAP-1A, Actinin, PP2B, Sirtuin-2 ve GFAP'ın doğrudan veya dolaylı olarak nöronal kayıpla ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda bildirildiği için nöronal kaybın doğrulanması amaçlandı. EK 3, Tablo 10'da gösterilen bu proteinlerin bölgesel değişimlerine bakıldığında, büyük oranda korteksi kapsayan R1 bölgesinin hepsinde ortak olduğu görülmektedir. NeuN proteininin, sinir dokusu ile ilişkili olduğu kapsamlı immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiş ve bu nedenle spesifik bir

nöronal belirteç olduğu öne sürülmüştür. Çeşitli çalışmalar, anti-NeuN antikollarının sinir sistemindeki çoğu nöron tipini tanımlayabildiğini göstermiştir. NeuN immün reaktivitesindeki azalmanın nöronal ölümle ilişkili olduğu da bilinmektedir (146–149). Bu nedenle, kortikal nöron kaybını göstermek için anti-NeuN'a özgü immünohistokimyasal boyama ile doğrulama yapıldı. YAC128 beyin dokularının korteks bölgesinde gözlenen daha düşük anti-NeuN boyama kapsamı, 12 aylık örneklerin MALDI-MSI analizlerinden elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

5.2 3, 6 ve 12 Aylık YAC128 ve LM Farelerine Ait Beyin Doku Kesitlerinin MALDI-MSI Analizleri

3, 6 ve 12 aylık YAC128 ve LM farelerine ait beyin dokularının MALDI-MSI analizinin ardından ScilsLab aracılığıyla yapılan denetimsiz (unsupervised) segmentasyon analizi, dört farklı bölgeyi ortaya çıkardı (R1, R2, R3 ve R4). Bu bölgeler arasında, fare beyni anatomik atlasına göre özellikle korteks ve korpus kallosuma karşılık gelen R1 ve R4 bölgeleri, iç içe geçmeksizin önemli bölgesel bir ayrım sergilemiştir (Şekil 23). Bu bölgeler diğer bölgelere girişimsel müdahale olmaksızın doku kesitinden kolayca disekte edilebildiğinden, MALDI-MSI analizi ile belirlenen 4 proteinin (Tau, EF2, HSP70 ve NogoA) bölgeye özgü ekspresyonel farklılıkları western blot yöntemi ile valide edildi.

Yalnızca tek tek genlerin veya proteinlerin etkisinden ziyade hastalığın altında yatan moleküler mekanizmalara ışık tutabilen sistem tabanlı tekniklerin kullanılması, HH, Parkinson hastalığı (PH) ve Alzheimer hastalığı (AH) gibi kompleks nörodejeneratif hastalıkların incelenmesi için önem arz etmektedir. Omiks teknolojileri, yüksek verimli analizler sağlar ve genellikle belirli bir fenotipte yer alabilecek genleri veya proteinleri belirlemede oldukça kullanışlı olan protein ve genlerin ekspresyonel farklılıklarını içeren bir listesini üretir. Analizin karmaşıklığını azaltmak ve basitleştirmek amacıyla, araştırılan hastalığı daha iyi anlamada bu listeleri ilgili genlerin veya proteinlerin daha küçük kümeleri halinde düzenlemek ortaya çıkmıştır. Tek tek genlerin veya proteinlerin bir listesini elde etmek yerine, GO veya KEGG gibi kamuya açık kaynaklardan alınan yolak bilgileri kullanılarak bir dizi gen veya proteinin dahil oldukları yolaklara göre gruplandırılmasına izin veren uygulamalı

zenginleştirme analizinin uygulanması elde edilen veriyi anlamlı kılar. Kısaca, çeşitli genlerin veya proteinlerin elde edilen bir listesiyle karşılaştırıldığında, iki koşul arasında farklı olan önemli ve etkili yolların belirlenmesi daha fazla açıklayıcı bilgi ve anlam sunar (150–152). Buna göre, 3, 6 ve 12 aylık farelerin MALDI-MSI analiziyle elde edilen ekspresyonel farklılık gösterdiği tespit edilmiş proteinlerin (EK 4, Tablo 11) biyolojik fonksiyonlarını anlamak için biyolojik süreç ve KEGG yolak zenginleştirme analizleri yapıldı (Şekil 30).

3 aylık YAC128 ve LM fareleri arasında yapılan biyolojik süreç ve KEGG yolak analizleri, ekspresyonel farklılık gösteren proteinlerin aktin hücre iskeleti organizasyonu, vezikül aracılı taşıma, klatrin bağımlı endositoz gibi biyolojik süreçlerde ve karbon ve kolesterol metabolizması yollarında belirgin bir şekilde zenginleştiğini gösterdi. Nöronal morfoloji, plastisite, sinyalleşme ve nörodejeneratif süreçler, hücre iskeletinden önemli ölçüde etkilenir. Bu fonksiyonlar için mikrotübüller, mikrofilamentler, ara filamentler ve bunların birbirleri ile etkileşimleri gereklidir. HH gibi birçok nörodejeneratif hastalığa neden olan düzensiz sinyal kaskadlarının birincil nedeni, hatalı biçimlendirilmiş genetik veya bozulmuş taşıma yollarının neden olduğu hücre iskeletinin bozulmasıdır (153). Hastalıkta etkilenen normal *htt* proteini, mikrotübüller boyunca veziküler taşımanın sürdürülmesinde önemlidir. Mutant *htt* varlığı, taşımada bozulmalara yol açar ve sinir sisteminde taşımanın zarar görmesi nöronal toksisiteye neden olur. Hasarlı taşımayı onarmaya çalışmak, HH'deki terapötik yaklaşımlardan biridir (154). HH'nin bir başka önemli özelliği de değiştirilmiş aksonal taşımadır. Vesiküler taşıma, mutant *htt*'nin motor proteinlerle değişen etkileşimlerinden önemli ölçüde etkilenir ve bu da karşılığında sinaptik disfonksiyona neden olur (155). Karbon ve kolesterol metabolizmalarının da HH'den etkilendiği bilinmektedir. Şekerleri metabolik öncüllere dönüştürmek için, merkezi karbon metabolizması karmaşık bir dizi enzimatik süreç kullanır. Tüm hücrenin biyokütlesi daha sonra bu öncüller kullanılarak üretilir. Karbon metabolizması, substratların biyokütle öncüllerine ayrıldığı ve enerjinin açığa çıkarıldığı yolları içeren metabolizmadır (156). Metabolik disfonksiyonun hem fenotipik hem de moleküler yansımaları HH'de görülür. HH hastalarının hastalığın erken evrelerinde dahi negatif enerji dengesine sahip oldukları daha önce bildirilmiştir

(157). Kolesterol, merkezi sinir sisteminin önemli bir membran bileşeni olduğundan, kolesterol homeostazındaki değişiklikler nöronal aktiviteleri olumsuz etkiler. HH'de kolesterol metabolizmasının düzensizliği ile ilgili çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Fare modelleri, hücre hatları ve klinik örnekleri kullanan çalışmalarda kolesterol metabolizmasında global bir aşağı regülasyon olduğuna dair kanıtlar vardır (155).

6 aylık YAC128 ve LM fareleri arasında yapılan biyolojik süreç ve KEGG yolak analizleri, ekspresyonel farklılık gösteren proteinlerin, sinaps organizasyonu ve olgunlaşması, sinaptik vezikül endositozu ve kümelenme gibi sinapslarla ilgili biyolojik süreçlerde esas olarak zenginleştirdiğini ortaya koydu. Sinapslardaki moleküler değişikliklerin HH'de görülen motor ve kognitif bozukluğun nedeni olduğuna inanılmaktadır (158). Mutant *htt*'nin, hastalığın erken başlangıcını veya ilerlemesini etkileyebilecek semptomların ortaya çıkmasından önce sinaptik fonksiyon, organizasyon ve olgunlaşmada yer alan proteinleri etkilediği öne sürülmüştür (159). Hem hayvan modellerinde hem de HH hastalarında, HH patogenezi için önemli bir bölge olan kortikostriatal nöronal yolda nöronal ölümden önce erken sinaptik bozukluklar meydana gelir (160). Normal *htt*'nin ekzositoz ve endositoz için gerekli olan çeşitli sinaptik vezikül proteinleri ile etkileşime girdiği bilinmektedir ve mutant *htt*'nin ilgili proteinlerle değişen etkileşimlerinin HH'de anormal sinaptik iletme katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (161). Ayrıca hücre adezyonu, beyin gelişimi ve membran füzyonu biyolojik süreçlerde zenginleştirilmiştir. *htt*'nin, hücrelerin hücre morfolojisinin değişmesine sebep olan bir büyüme faktörü ile uyarıldıktan sonra normal hücre adezyonunun korunmasının yanı sıra normal hücre morfolojisini korumak için gerekli olduğu ve ayrıca mutant *htt*'nin hücre adezyonunda değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (162). *htt*'nin fonksiyonu beyin gelişimi için hayati öneme sahiptir. HH transgenik fare modellerinde *htt* eksikliğinin anormal beyin gelişimi ve orta derecede hareket bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir (163). Bunun nedeni, gelişimsel süreç boyunca mutant *htt*'nin fonksiyon kaybı olabilir veya normal *htt*'nin koruyucu fonksiyonunun, mutant *htt*'nin fonksiyon kazanmasını engellemesi olabilir. Önceki araştırmalar, *htt*'nin, nöronal iletimin moleküler temelini oluşturan vezikül tomurcuklanması veya zar füzyon süreçlerine aracılık edebileceğini

öne sürdü. Ancak *htt*-membran ilişkisinin HH patofizyolojisindeki spesifik fonksiyonlarını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (164). Yapılan KEGG yolak analizlerinde, ekspresyonel değişim gösteren proteinlerin, çok sayıda hastalığın nörodejenerasyon yolakları, fokal adezyon, insülin sekresyonu, oksitosin sinyal yolağı, glikoliz/glukoneogenez, karbonhidrat sindirimi ve emilimi gibi yolaklarda zenginleştiği tespit edildi. Fokal adezyonlar olarak bilinen kapsamlı, dinamik ve hücre içi protein kompleksleri, integrin-matriks bağlanması yoluyla oluşur ve hücrenin dışından başlatılan sinyali geliştirmek için mekanik güçler üretme, iletme ve saptama işlevi görür. HH dahil nörodejeneratif hastalıklarda integrin sinyallesinde ve fokal adezyonda düzensizliklerin olduğu rapor edilmiştir (165). HH hastaları ile yapılan insülin duyarlılığı ile ilgili çalışmalarda hem insülin duyarlılığında azalma hem de insülin salgılama kapasitesinde bozulmalar gözlenmiştir (166). Oksitosin sinyal yolağı terimi, oksitosin, oksitosin reseptörleri ve ilişkili düzenleyici faktörler gibi sinyal yolağında yer alan proteinleri ifade eder. Oksitosin, beslenme ve diğer davranışların kontrolünde önemli rol oynayan hormonlardan birisidir. Transgenik HH fare modelleri kullanılarak yapılan bir araştırmada oksitosin ve vazopressin gibi hormonların düzenlenmesinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (167). Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde oksitosinin, nöroprotektif ve anti-enflamatuar özelliklerinin potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak hizmet edebileceği de öne sürülmüştür (168). Tiroid hormonu sinyal yolağı, glikoz metabolizması, hücre çoğalması ve farklılaşması ve homeostazın korunması gibi çeşitli amaçlara hizmet eder. Erken evre HH hastalarında yapılan bir çalışmada tirotropik regülasyonda değişiklikler olduğu gösterilmiştir (169). HH'ye ek olarak, PH, AH ve amiyotrofik lateral sklerozda (ALS) da glikolitik metabolizmada değişiklikler gözlenmiştir. Glikolitik disfonksiyon, nörodejenerasyona yol açan ortak bir mekanizma kavramı olarak önerilmiştir (170). Dahası, karbonhidrat metabolizmasındaki bozuklukların tipik olarak HH, AH ve PH gibi sporadik veya kalıtsal nörodejeneratif bozukluklarla bağlantılı olduğu iyi bilinmektedir (171).

12 aylık YAC128 ve LM grubunun karşılaştırılmasında ekspresyonel değişim gösteren proteinler, sırasıyla şu biyolojik süreçlerde zenginleşmişlerdir: ekzositozun düzenlenmesi, protein taşınması, nöron projeksiyon morfogenezi ve gelişimi,

glikolitik süreç, mikrotübül polimerizasyonunun pozitif düzenlenmesi (Şekil 30, e). Normal *htt*'nin, nöronlarda aksonal taşıma, ekzositoz, transkripsiyonel kontrol ve kalsiyum homeostazı gibi işlevlerde fonksiyonu vardır. Ekzositoz, normal *htt* tarafından pozitif olarak düzenlenirken, normal *htt*'nin kaybı ile bozulur. *htt* ve interaktomunun, ekzositik nörotransmitter salınımında çok önemli unsurlar olduğuna inanılmaktadır (172,173). Veziküler trafficking, protein taşınması ve hücre iskeleti bağlanması dahil olmak üzere bir dizi hücresel işlevin, sinyal süreçleri ve hücre içi taşıma için protein gruplarının koordinasyonunda bir yapı iskelesi olarak kabul edilen normal *htt* tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. *htt* mutasyona uğradığında, yanlış katlanabilir ve bu durum onun normal işlevini kaybetmesine neden olacak toksik bir işlev kazanmasına neden olabilir. Ek olarak, mutant *htt*, nükleer transkripsiyon ve protein taşınması, hücre içi sinyalleşme ve protein degradasyon yolları dahil olmak üzere bir dizi hücresel süreçte müdahale ederek nörodejenerasyona katkıda bulunur (174,175). GO terimi ayrıntılarına göre nörit büyümesi, nöron projeksiyon morfogenez ve gelişimi ile eş anlamlıdır (<http://www.informatics.jax.org>). Genişletilmiş CAG tekrarlarının ifadesi nedeniyle, HH, agregat oluşumuna, kaspaz bağımlı hücre ölümüne ve nörit büyümesinde hasarlara sebep olur. Mitokondriyal bütünlük, mutant *htt*'nin varlığından etkilenir. Bu, daha sonra nörit büyümesi ve dallanması üzerinde de etkisi olabilecek nörotrofik faktörlerin oluşumunu ve traffickingini etkiler. Nörit büyümesini artırmanın HH patolojisini iyileştirmek için bir strateji olabileceğine inanılmaktadır (176,177). Metabolizma üzerine yapılan çalışmalar, HH'de glikolitik kapasitenin değiştiğini ortaya koymuştur. HH hücrelerinin glikolitik genleri ve proteinleri normalden daha düşük seviyelerde ifade ettiği tespit edilmiştir ve HH nöronlarındaki kusurlu enerji metabolizmasının kısmen glikolitik süreç eksikliğinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (178). Son araştırmalar, *htt* ile mikrotübüller, aktin filamentleri ve diğer hücre iskeleti yapıları gibi hücre iskeleti elemanları arasında güçlü bir bağlantı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, *htt*'nin büyüme faktörü sinyali ile mikrotübül polimerizasyonunu ve yeni bağlanma bölgelerinde bağlanma aktivitelerini birleştirdiği fikrini öne sürmüşlerdir (179). Yapılan çalışmalar, *htt*'nin mikrotübüle bağımlı süreçleri düzenleyen moleküler sistemlerle etkileşime girdiğini, aksine mutant *htt*'nin bu etkileşimleri değiştirdiğini göstermiştir (162). Yapılan KEGG yolak

analizleri, ekspresyonel değişim gösteren proteinlerin, AH, HH, ALS ve prion hastalığı nörodejenerasyon yolakları gibi birkaç nörodejeneratif yolağa dahil olduğunu ortaya çıkardı. Ayrıca, diğer zenginleştirilmiş yolaklar, sinaptik vezikül döngüsü, endositoz, glikoliz/glikoneogenez ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesidir (Şekil 30, f). HH'de anormal sinaptik vezikül dinamikleri ve havuzlarının varlığı, bu nörodejeneratif hastalık için olası patojenik yolaklardan biri olarak düşünülebilir. Ayrıca, bir HH fare modelinde sinaptik vezikül geri dönüşümündeki bozukluklar gösterilmiştir (180,181). Normal *htt* ve çeşitli proteinler tarafından oluşturulan kompleksler endositozun düzenlenmesinde önemlidir. Normal *htt*'nin kaybı, bu komplekslerin bozulmasına ve endositoz hasarlarının oluşmasına neden olur. Ayrıca, mutant *htt*'nin primer striatal nöronlarda endositozu spesifik olarak inhibe ettiği bilinmektedir (172,182). Mitokondriyal disfonksiyonlar ve glikoz metabolizmasındaki çeşitli bozulmalar, AH, PH ve HH gibi nörodejeneratif hastalıklarda göze çarpmaktadır ve genellikle hücre ölümleri ile ilişkilendirilmiştir. Birçok nörodejeneratif hastalıkta görülmesi, glikolitik disfonksiyonun nörodejenerasyona neden olan yaygın bir yolak olduğu hipotezini destekler. Yapılan çalışmalar HH'nin diyabet ve glikoz metabolizmasındaki değişimlerle de ilişkili olduğunu göstermiştir (170,183–185). HH fare modeli üzerinde yapılan proteomik bir çalışmada, glikoliz/glikoneogenez ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde yer alan proteinlerin ekspresyonel değişiklikler gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (186). Başka bir çalışmada, kompetent genlerin aktin hücre iskeleti yolağının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve nükleer faktör-kappa B'nin (NFKB) aktivasyonunun, mutant *htt* protein seviyelerini artırarak HH patogenezi desteklediği öne sürülmüştür (186,187).

Elde ettiğimiz tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda; 3, 6 ve 12. aya özgü temelde farklı moleküler yolakların etkilendiği ve ön plana çıktığı görülmüştür. Pre-patolojik evrede (3. ay) karbon ve kolesterol metabolizması gibi metabolik yolaklar dikkat çekerken, gelişimsel evrede (6. ay) bu yolaklara fokal adezyon, karbonhidrat metabolizması, tiroid hormon sinyalizasyonu ve nörodejenerasyon yolakları dahil olmuştur. Ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, endositoz ve bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili yolakların patolojik evrede (12. ay) katıldığı görülmüştür. 3, 6 ve 12 aylık grupların hepsinde karbon metabolizmasının ortak olması şaşırtıcı değildir.

Literatürde, hastalığın erken evrelerinde bile değişmiş karbon metabolizmasının varlığına dikkat çekilmektedir (188). Mutant *htt*'nin enerji metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemekle birlikte, biyoenerjetik anormalliklerin HH'deki nöronal disfonksiyonun ana nedenlerinden biri olduğu kabul edilmektedir (189,190). Elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alındığında, nörodejenerasyona bağlı yolakların 3. aydan ziyade 6. aydan itibaren etkilenmeye başlaması, altıncı ve sonraki aylarda hastalığın semptomlarını sergilemeye başlayan kullandığımız transgenik fare modelini destekler niteliktedir. 6. ve 12. aylarda ekspresyonel değişim gösteren proteinlerin, HH'nin gelişimsel ve patolojik dönemlerdeki ortak moleküler ilerlemesini yansıtan nörodejenerasyon yolaklarında yaygın olarak zenginleştiği bulundu. Ayrıca 12. ay KEGG analizinde HH, AH gibi bireysel hastalıklar da tespit edilebilmektedir.

MALDI-MSI analizleri ile elde edilen proteinlerin ekspresyon değişikliklerini doğrulamak için, YAC128 ve LM grupları arasında ekspresyonel farklılık gösteren 4 protein seçildi ve MALDI-MSI analizi yapılmış kesitlere ardışık olan kesitlerden iki farklı bölge (R1 ve R4; R2 ve R3 bölgelerine kıyasla, bu bölgeler daha keskin bir ayrım göstermiştir ve birbiriyle iç içe geçmiş değildir, ve doku kesitinden başka bir bölgeye müdahale olmaksızın kolayca disekte edilebilmiştir.) disekte edilerek hazırlanan örneklerin kullanımıyla western blot analizleri yapıldı. Tüm bu seçilmiş proteinlerin western blot sonuçları istatistiksel olarak anlamlıydı ve MALDI-MSI sonuçlarıyla tutarlı sonuçlar elde edildi (Şekil 29).

6 SONUÇ

Bu tez çalışmasında, ilk defa MALDI-MSI teknolojisi kullanarak HH'nin pre-patolojik, gelişimsel ve patolojik evrelerini temsil eden 3, 6 ve 12 aylık YAC128 ve LM farelerinde mekansal proteom değişiklikleri araştırıldı. YAC128 ve LM farelerinin beyin dokuları kullanılarak yapılan MALDI-MSI analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, pre-patolojik evrede 89, gelişimsel evrede 83 ve patolojik evrede 82 proteinin intensite seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu tespit edildi. Bu proteinlerin katıldığı biyolojik süreçler ve moleküler yollar yapılan biyoinformatik analizlerle ortaya çıkarıldı ve elde edilen zenginleştirilmiş yolların temsil ettikleri evrelerle uyumlu olduğu tartışıldı. Ekspresyonel değişim gösterdiği tespit edilen proteinler arasından Tau, EF2, HSP70 ve NogoA proteinleri ile western blot tekniği kullanılarak MALDI-MSI sonuçlarının validasyonu gerçekleştirildi.

Sonuç olarak, belirli bir doku kesitinde mekansal bilgileri gösterme avantajı sunan ve bölgesel farklılıkları tespit etme kapasitesi diğer tekniklere göre daha yüksek olan MALDI-MSI tabanlı proteomik çalışmaların, HH gibi kompleks hastalıkların altında yatan mekanizmaların incelenmesi ve anlaşılmasında yeni bakış açıları sunabileceğini öneriyoruz. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen verilerin, daha kapsamlı çalışmalar için bir başlangıç noktası olabileceğine inanıyoruz.

7 KAYNAKLAR

1. Heemels M-T. Neurodegenerative diseases. *Nature*. 2016 Nov 9;539(7628):179–179.
2. Krach F, Stemick J, Boerstler T, Weiss A, Lingos I, Reischl S, et al. An alternative splicing modulator decreases mutant HTT and improves the molecular fingerprint in Huntington's disease patient neurons. *Nat Commun*. 2022 Nov 10;13(1):6797.
3. Ersoy N. Molecular genetics of Huntington's Disease: When size does matter. In 2007.
4. Reiner A, Dragatsis I, Dietrich P. Genetics and Neuropathology of Huntington's Disease. In: *International review of neurobiology*. 2011. p. 325–72.
5. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* (80-). 1997;277(5334):1990–3.
6. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*. 1997;90(3):537–48.
7. Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, Langbehn DR, Long JD, Warner JH, et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat Rev Neurol*. 2014 Apr 11;10(4):204–16.
8. Carroll JB, Lerch JP, Franciosi S, Spreew A, Bissada N, Henkelman RM, et al. Natural history of disease in the YAC128 mouse reveals a discrete signature of pathology in Huntington disease. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):257–65.
9. Bečanović K, Asghar M, Gadawska I, Sachdeva S, Walker D, Lazarowski ER, et al. Age-related mitochondrial alterations in brain and skeletal muscle of the YAC128 model of Huntington disease. *npj Aging Mech Dis*. 2021 Dec 14;7(1):26.
10. Van Raamsdonk JM, Murphy Z, Slow EJ, Leavitt BR, Hayden MR. Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14(24):3823–35.
11. Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12(13):1555–67.
12. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2019. p. 99–103.
13. Southwell AL, Smith SEP, Davis TR, Caron NS, Villanueva EB, Xie Y, et al. Ultrasensitive measurement of huntingtin protein in cerebrospinal fluid demonstrates increase with Huntington disease stage and decrease following brain huntingtin suppression. *Sci Rep*. 2015;5(1):12166.
14. Cui M, Cheng C, Zhang L. High-throughput proteomics: a methodological mini-review. *Lab Investig*. 2022 Nov 3;102(11):1170–81.
15. Aichler M, Walch A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab Investig*. 2015;95(4):422–31.
16. Huber K, Khamehgar-Silz P, Schramm T, Gorshkov V, Spengler B, Römpf A. Approaching cellular resolution and reliable identification in mass spectrometry imaging of tryptic peptides. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(23):5825–37.
17. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007;369(9557):218–28.
18. Bhattacharyya KB. The story of George Huntington and his disease. *Ann Indian Acad Neurol*. 2016;19(1):25–8.
19. Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(1):15005.
20. Lipe H, Bird T. Late onset Huntington disease: Clinical and genetic characteristics of 34 cases. *J Neurol Sci*. 2009;276(1–2):159–62.
21. Lo DC, Hughes RE. *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. 2011.
22. Lo DC, Hughes RE. *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. 2011.
23. Kotrcova E, Jarkovska K, Valekova I, Zizkova M, Motlik J, Gadher SJ, et al. Challenges of Huntington's disease and quest for therapeutic biomarkers. *Proteomics - Clin Appl*. 2015;9(1–

- 2);147–58.
24. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*. 2001 Jan;29(1):15–32.
25. Michalik A, Van Broeckhoven C. Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet*. 2003;12:R173–86.
26. Li H, Li S-H, Yu Z-X, Shelbourne P, Li X-J. Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci*. 2001;21(21):8473–81.
27. Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, et al. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*. 2001;413(6857):739–43.
28. Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim Y-M, Standaert DG, Hersch SM, et al. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* (80-). 2002;296(5576):2238–43.
29. Obrietan K. CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci*. 2004;24(4):791–6.
30. Sugars KL, Brown R, J. Cook L, Swartz J, Rubinsztein DC. Decreased cAMP response element-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4988–99.
31. Sharma S, Taliyan R. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: The role of histone deacetylases. *Pharmacol Res*. 2015;100:157–69.
32. Moumné L, Betuing S, Caboche J. Multiple aspects of gene dysregulation in Huntington's disease. *Front Neurol*. 2013;4:127.
33. Browne SE, Bowling AC, Macgarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muquit MMK, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol*. 1997;41(5):646–53.
34. Panov A V., Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, et al. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci*. 2002;5(8):731–6.
35. Shin H, Kim MH, Lee SJ, Lee K-H, Kim M-J, Kim JS, et al. Decreased metabolism in the cerebral cortex in early-stage Huntington's disease: A possible biomarker of disease progression? *J Clin Neurol*. 2013;9(1):21.
36. Lin J, Wu P-H, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang C-Y, et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*. 2004;119(1):121–35.
37. Marinković P, Reuter MS, Brill MS, Godinho L, Kerschensteiner M, Misgeld T. Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(11):4296–301.
38. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*. 2004;118(1):127–38.
39. Reddy PH, Shirendeb UP. Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2012;1822(2):101–10.
40. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative Stress in Huntington's Disease. *Brain Pathol*. 2006;9(1):147–63.
41. André VM, Cepeda C, Levine MS. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther*. 2010;16(3):163–78.
42. Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med*. 2008;205(8):1869–77.
43. Nayak A, Ansar R, Verma SK, Bonifati DM, Kishore U. Huntington's disease: an immune perspective. *Neurol Res Int*. 2011;2011:1–7.
44. Ellrichmann G, Reick C, Saft C, Linker RA. The Role of the Immune System in Huntington's Disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:1–11.
45. Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, et al. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(2):161–72.
46. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, et al. Microglial activation in

- presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*. 2007;130:1759–66.
47. Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, Barker RA, et al. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology*. 2006;66(11):1638–43.
 48. Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P. Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Exp Neurol*. 1999;159(2):362–76.
 49. Rus H, Cudrici C, David S, Niculescu F. The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity*. 2006;39(5):395–402.
 50. Seeley C, Kegel-Gleason KB. Taming the Huntington's disease proteome: what have we learned? *J Huntingtons Dis*. 2021;10(2):239–57.
 51. Zabel C, Chamrad DC, Priller J, Woodman B, Meyer HE, Bates GP, et al. Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(5):366–75.
 52. Schönberger SJ, Jezdic D, Faull RLM, Cooper GJS. Proteomic analysis of the human brain in Huntington's Disease indicates pathogenesis by molecular processes linked to other neurodegenerative diseases and to type-2 diabetes. *J Huntingtons Dis*. 2013;2(1):89–99.
 53. Bensimon A, Heck AJR, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):379–405.
 54. Larance M, Lamond AI. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(5):269–80.
 55. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:49–79.
 56. Nadler WM, Waidelich D, Kerner A, Hanke S, Berg R, Trumpp A, et al. MALDI versus ESI: the impact of the ion source on peptide identification. *J Proteome Res*. 2017;16(3):1207–15.
 57. de Hoffmann E, Charette JJ, Stroobant V, Trottier J. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. In 1997.
 58. Thomas SN. *Mass Spectrometry*. In: *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*. Fourth Edi. 2019. p. 171–85.
 59. Kaklamanos G, Aprea E, Theodoridis G. *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation*. In: *Chemical Analysis of Food (Second Edition)*. 2020. p. 525–52.
 60. Dunn WB. *Mass Spectrometry in Systems Biology: An Introduction*. In: *Methods in Systems Biology*. 2011. p. 15–35.
 61. Mellon FA. *Mass Spectrometry | Principles and Instrumentation*. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. 2003. p. 3739–49.
 62. Sinha A, Mann M. A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Biochem (Lond)*. 2020;42(5):64–9.
 63. Dass C. *Hyphenated Separation Techniques*. In: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. 2007. p. 151–94.
 64. Karpievitch Y V, Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: biological and technological aspects. *Ann Appl Stat*. 2010;4(4):1797–823.
 65. Rousu T, Herttuainen J, Tolonen A. Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification in vitro - amitriptyline and verapamil as model compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24(7):939–57.
 66. Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Oct;12(5):483–90.
 67. Hosp F, Gutiérrez-Ángel S, Schaefer MH, Cox J, Meissner F, Hipp MS, et al. Spatiotemporal proteomic profiling of Huntington's disease inclusions reveals widespread loss of protein function. *Cell Rep*. 2017;21(8):2291–303.
 68. Xu L, Sun H, Zhang Y, Guo Z, Xiao X, Zhou X, et al. Proteomic analysis of human frontal and temporal cortex using iTRAQ-based 2D LC-MS/MS. *Chinese Neurosurg J*. 2021;7(1):27.
 69. Cozzolino F, Landolfi A, Iacobucci I, Monaco V, Caterino M, Celentano S, et al. New label-free methods for protein relative quantification applied to the investigation of an animal model of Huntington disease. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238037.
 70. Schwamborn K, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry - painting molecular pictures. *Mol Oncol*. 2010 Dec;4(6):529–38.

71. Maccarrone G, Nischwitz S, Deininger S-O, Hornung J, König FB, Stadelmann C, et al. MALDI imaging mass spectrometry analysis-A new approach for protein mapping in multiple sclerosis brain lesions. *J Chromatogr B*. 2017;1047:131–40.
72. Kelley AR, Perry G, Bethea C, Castellani RJ, Bach SBH. Molecular mapping Alzheimer's disease: MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded human hippocampal tissue. *Open Neurol J*. 2016;10(1):88–98.
73. Hunter M, Demarais NJ, Faull RLM, Grey AC, Curtis MA. Subventricular zone lipidomic architecture loss in Huntington's disease. *J Neurochem*. 2018;146(5):613–30.
74. Kaya I, Zetterberg H, Blennow K, Hanrieder J. Shedding light on the molecular pathology of amyloid plaques in transgenic Alzheimer's disease mice using multimodal MALDI imaging mass spectrometry. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(7):1802–17.
75. Heijs B, Potthoff A, Soltwisch J, Dreisewerd K. MALDI-2 for the enhanced analysis of N-linked glycans by mass spectrometry imaging. *Anal Chem*. 2020;92(20):13904–11.
76. Hunter M, Demarais NJ, Faull RLM, Grey AC, Curtis MA. An imaging mass spectrometry atlas of lipids in the human neurologically normal and Huntington's disease caudate nucleus. *J Neurochem*. 2021;157(6):2158–72.
77. Hunter M, Demarais NJ, Faull RLM, Grey AC, Curtis MA. Subventricular zone lipidomic architecture loss in Huntington's disease. *J Neurochem*. 2018;146(5):613–30.
78. Arribat Y, Talmat-Amar Y, Paucard A, Lesport P, Bonneaud N, Bauer C, et al. Systemic delivery of P42 peptide: a new weapon to fight Huntington's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2(1):86.
79. Gürel B. Beyin Ekstrasellüler Matriksinin Nörodejenerasyondaki Rolünün Alzheimer Fare Modelinde Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2017 (Danışman: Prof. Dr. G. Öztürk).
80. Southwell AL, Franciosi S, Villanueva EB, Xie Y, Winter LA, Veeraghavan J, et al. Anti-semaphorin 4D immunotherapy ameliorates neuropathology and some cognitive impairment in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*. 2015;76:46–56.
81. Menalled L, Lutz C, Ramboz S, Brunner D, Lager B, Noble S, et al. A Field Guide to Working with Mouse Models of Huntington's Disease. The Jackson Laboratory; 2014.
82. Klein O, Strohschein K, Nebrich G, Fuchs M, Thiele H, Giavalisco P, et al. Unraveling local tissue changes within severely injured skeletal muscles in response to MSC-based intervention using MALDI Imaging mass spectrometry. *Sci Rep*. 2018;8(1):12677.
83. Gustafsson JOR, Eddes JS, Meding S, Koudelka T, Oehler MK, McColl SR, et al. Internal calibrants allow high accuracy peptide matching between MALDI imaging MS and LC-MS/MS. *J Proteomics*. 2012;75(16):5093–105.
84. Huber K, Khamehgar-Silz P, Schramm T, Gorshkov V, Spengler B, Römpp A. Approaching cellular resolution and reliable identification in mass spectrometry imaging of tryptic peptides. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(23):5825–37.
85. Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS. *Anal Chem*. 2002;74(15):3915–23.
86. Angel PM, Norris-Caneda K, Drake RR. In situ imaging of tryptic peptides by MALDI imaging mass spectrometry using fresh-frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Curr Protoc Protein Sci*. 2018;94(1):e65.
87. Harris WA, Janecki DJ, Reilly JP. Use of matrix clusters and trypsin autolysis fragments as mass calibrants in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2002;16(18):1714–22.
88. Bergvall T. Normalization Methods for Imaging Mass. Uppsala University School of Engineering, Master of Science Thesis, Uppsala, 2008 (Supervisor: P. Andrén). 2008.
89. Ransom HW, Varghese RS, Goldman R. Computational Methods for Analysis of MALDI-TOF Spectra to Discover Peptide Serum Biomarkers. In: *The Protein Protocols Handbook*. 2009. p. 1175–83.
90. Yajima Y, Hiratsuka T, Kakimoto Y, Ogawa S, Shima K, Yamazaki Y, et al. Region of interest analysis using mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue. *Sci Rep*. 2018;8(1):7493.
91. Schober Y, Schramm T, Spengler B, Römpp A. Protein identification by accurate mass matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of tryptic peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25(17):2475–83.

92. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–5.
93. Karayel-Basar M, Uras I, Kiris I, Sahin B, Akgun E, Baykal AT. Spatial proteomic alterations detected via MALDI-MS imaging implicate neuronal loss in a Huntington's disease mouse (YAC128) brain. *Mol Omi*. 2022;18(4):336–47.
94. Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR. Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2005;25(16):4169–80.
95. Le Cann K, Foerster A, Rösseler C, Erickson A, Hautvast P, Giesselmann S, et al. The difficulty to model Huntington's disease in vitro using striatal medium spiny neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):6934.
96. Laforet GA, Sapp E, Chase K, McIntyre C, Boyce FM, Campbell M, et al. Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2001;21(23):9112–23.
97. Hong C, Seo H, Kwak M, Jeon J, Jang J, Jeong EM, et al. Increased TRPC5 glutathionylation contributes to striatal neuron loss in Huntington's disease. *Brain*. 2015 Oct 1;138(10):3030–47.
98. Soyulu-Kucharz R, Baldo B, Petersén Á. Metabolic and behavioral effects of mutant huntingtin deletion in Sim1 neurons in the BACHD mouse model of Huntington's disease. *Sci Rep*. 2016;6:28322.
99. Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, et al. Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun;97(12):6809–14.
100. Petrasch-Parwez E, Habbes H-W, Lobbecke-Schumacher M, Saft C, Niescery J. The ventral striatopallidum and extended amygdala in Huntington disease. In: *The Amygdala - A Discrete Multitasking Manager*. 2012. p. 716–30.
101. Yu Z-X, Li S-H, Evans J, Pillarisetti A, Li H, Li X-J. Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci*. 2003;23(6):2193–202.
102. Casella C, Lipp I, Rosser A, Jones DK, Metzler- Baddeley C. A critical review of white matter changes in Huntington's disease. *Mov Disord*. 2020;35(8):1302–11.
103. Naseri NN, Xu H, Bonica J, Vonsattel JPG, Cortes EP, Park LC, et al. Abnormalities in the tricarboxylic acid cycle in Huntington disease and in a Huntington disease mouse model. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(6):527–37.
104. Askeland G, Dosoudilova Z, Rodinova M, Klempir J, Liskova I, Kuśnierczyk A, et al. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):9817.
105. Gunawardena S, Her L, Brusch RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, et al. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic PolyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron*. 2003;40(1):25–40.
106. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*. 2007;27(13):3571–83.
107. Pallos J, Bodai L, Lukacsovich T, Purcell JM, Steffan JS, Thompson LM, et al. Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2008;17(23):3767–75.
108. Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, et al. SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(17):7927–32.
109. Chopra V, Quinti L, Kim J, Vollor L, Narayanan KL, Edgerly C, et al. The sirtuin 2 inhibitor AK-7 is neuroprotective in Huntington's disease mouse models. *Cell Rep*. 2012;2(6):1492–7.
110. Xifró X, Giralt A, Saavedra A, García-Martínez JM, Díaz-Hernández M, Lucas JJ, et al. Reduced calcineurin protein levels and activity in exon-1 mouse models of Huntington's disease: Role in excitotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2009;36(3):461–9.
111. Pineda JR, Pardo R, Zala D, Yu H, Humbert S, Saudou F. Genetic and pharmacological inhibition of calcineurin corrects the BDNF transport defect in Huntington's disease. *Mol Brain*. 2009;2(1):33.
112. Pardo R. Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci*. 2006;26(5):1635–45.

113. Ermak G, Hench KJ, Chang KT, Sachdev S, Davies KJA. Regulator of calcineurin (RCAN1-1L) is deficient in Huntington disease and protective against mutant huntingtin toxicity in vitro. *J Biol Chem*. 2009;284(18):11845–53.
114. Metzler M, Gan L, Mazarei G, Graham RK, Liu L, Bissada N, et al. Phosphorylation of huntingtin at Ser421 in YAC128 neurons is associated with protection of YAC128 neurons from NMDA-mediated excitotoxicity and is modulated by PP1 and PP2A. *J Neurosci*. 2010;30(43):14318–29.
115. Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(4):562–71.
116. Bergink S, Severijnen L, Wijgers N, Sugawara K, Yousaf H, Kros JM, et al. The DNA repair-ubiquitin-associated HR23 proteins are constituents of neuronal inclusions in specific neurodegenerative disorders without hampering DNA repair. *Neurobiol Dis*. 2006;23(3):708–16.
117. Diaz-castro B, Gangwani MR, Yu X, Coppola G, Khakh BS. Astrocyte molecular signatures in Huntington's disease. 2019;1(October):1–13.
118. Bradford J, Shin J, Roberts M, Wang C, Li X-J, Li S. Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(52):22480–5.
119. Bayram-Weston Z, Jones L, Dunnett SB, Brooks SP. Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in YAC128 Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res Bull*. 2012;88(2–3):137–47.
120. Xifró X, García-Martínez JM, del Toro D, Alberch J, Pérez-Navarro E. Calcineurin is involved in the early activation of NMDA-mediated cell death in mutant huntingtin knock-in striatal cells. *J Neurochem* [Internet]. 2008 Jun;105(5):1596–612. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2008.05252.x>
121. Tousley A, Iuliano M, Weisman E, Sapp E, Zhang N, Vodicka P, et al. Rac1 activity is modulated by huntingtin and dysregulated in models of Huntington's disease. *J Huntingtons Dis*. 2019;8(1):53–69.
122. Culver BP, Savas JN, Park SK, Choi JH, Zheng S, Zeitlin SO, et al. Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis. *J Biol Chem*. 2012;287(26):21599–614.
123. Shirasaki DI, Greiner ER, Al-Ramahi I, Gray M, Boontheung P, Geschwind DH, et al. Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron*. 2012;75(1):41–57.
124. Modregger J. PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2002 Oct 2;11(21):2547–58. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/11.21.2547>
125. Desmond CR, Atwal RS, Xia J, Truant R. Identification of a karyopherin $\beta 1/\beta 2$ proline-tyrosine nuclear localization signal in huntingtin protein. *J Biol Chem*. 2012 Nov;287(47):39626–33.
126. Hosp F, Vossfeldt H, Heinig M, Vasiljevic D, Arumughan A, Wyler E, et al. Quantitative interaction proteomics of neurodegenerative disease proteins. *Cell Rep*. 2015;11(7):1134–46.
127. Bamberg JR, Bernstein B, Davis R, Flynn K, Goldsberry C, Jensen J, et al. ADF/cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases. *Curr Alzheimer Res*. 2010;7(3):241–50.
128. Munsie L, Caron N, Atwal RS, Marsden I, Wild EJ, Bamberg JR, et al. Mutant huntingtin causes defective actin remodeling during stress: Defining a new role for transglutaminase 2 in neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet*. 2011;20(10):1937–51.
129. Innos J, Koido K, Philips M, Vasar E. Limbic system associated membrane protein as a potential target for neuropsychiatric disorders. *Front Pharmacol*. 2013;4(32).
130. Chiurchiù V, Maccarrone M, Orlacchio A. The role of reticulons in neurodegenerative diseases. *NeuroMolecular Med*. 2014 Mar 12;16(1):3–15.
131. Peng X, Kim J, Zhou Z, Fink DJ, Mata M. Neuronal Nogo-A regulates glutamate receptor subunit expression in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2011;119(6):1183–93.
132. Kumar N, Leonzino M, Hancock-Cerutti W, Horenkamp FA, Li P, Lees JA, et al. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J Cell Biol*. 2018;217(10):3625–39.

133. Speert D. With friends like these... *Neurosci Gatew* [Internet]. 2007; Available from: <http://www.nature.com/articles/aba1747>
134. Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Potin FTY, Bihain BE, et al. Microtubule-associated Protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 Proteolysis during Soluble Amyloid β -Peptide-induced Neuronal Apoptosis. *J Biol Chem*. 2006;281(1):229–40.
135. Wu Y, Deng Y, Zhang S, Luo Y, Cai F, Zhang Z, et al. Amyloid- β precursor protein facilitates the regulator of calcineurin 1-mediated apoptosis by downregulating proteasome subunit α type-5 and proteasome subunit β type-7. *Neurobiol Aging*. 2015;36(1):169–77.
136. Machnicka B, Czogalla A, Hryniewicz-Jankowska A, Bogusławska DM, Grochowalska R, Heger E, et al. Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):620–34.
137. Yang P, Yang Y, Sun P, Tian Y, Gao F, Wang C, et al. β II spectrin (SPTBN1): biological function and clinical potential in cancer and other diseases. *Int J Biol Sci*. 2021;17(1):32–49.
138. Seyfried NT, Dammer EB, Swarup V, Nandakumar D, Duong DM, Yin L, et al. A multi-network approach identifies protein-specific co-expression in asymptomatic and symptomatic Alzheimer's disease. *Cell Syst* [Internet]. 2017 Jan;4(1):60-72.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cels.2016.11.006>
139. Bossenmeyer- Pourié C, Smith AD, Lehmann S, Deramecourt V, Sablonnière B, Camadro J, et al. N- homocysteinylation of tau and MAP1 is increased in autopsy specimens of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Pathol*. 2019;248(3):5254.
140. Muraro PA, Kalbus M, Afshar G, McFarland HF, Martin R. T cell response to 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2002;130(1–2):233–42.
141. Smolders S, Van Broeckhoven C. Genetic perspective on the synergistic connection between vesicular transport, lysosomal and mitochondrial pathways associated with Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):63.
142. Choi J, Ravipati A, Nimmagadda V, Schubert M, Castellani RJ, Russell JW. Potential roles of PINK1 for increased PGC-1 α -mediated mitochondrial fatty acid oxidation and their associations with Alzheimer disease and diabetes. *Mitochondrion*. 2014;18(1):41–8.
143. Taghizadeh S, Vazehan R, Beheshtian M, Sadeghinia F, Fattahi Z, Mohseni M, et al. Molecular diagnosis of hereditary neuropathies by whole exome sequencing and expanding the phenotype spectrum. *Arch Iran Med*. 2020;23(7):426–33.
144. Ebanks B, Ingram TL, Chakrabarti L. ATP synthase and Alzheimer's disease: putting a spin on the mitochondrial hypothesis. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(16):16647–62.
145. Chen R, Park H-A, Mnatsakanyan N, Niu Y, Licznarski P, Wu J, et al. Parkinson's disease protein DJ-1 regulates ATP synthase protein components to increase neuronal process outgrowth. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):469.
146. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1167–71.
147. Davoli M., Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson G., et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*. 2002;115(1):125–36.
148. Tian X, Liu T, Fang B, Wang A, Zhang M, Hussain S, et al. NeuN-specific fluorescent probe revealing neuronal nuclei protein and nuclear acids association in living neurons under STED nanoscopy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(38):31959–64.
149. Gusel'nikova V V, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*. 2015;7(2):42–7.
150. Alcaraz N, List M, Batra R, Vandin F, Ditzel HJ, Baumbach J. De novo pathway-based biomarker identification. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(16):e151–e151.
151. Arrell DK, Terzic A. Systems proteomics for translational network medicine. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(4):478–478.
152. Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten years of pathway analysis: Current approaches and outstanding challenges. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(2):e1002375.
153. Sen S, Lagas S, Roy A, Kumar H. Cytoskeleton saga: Its regulation in normal physiology and modulation in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*. 2022;925:175001.
154. Saudou F, Humbert S. Huntington's Disease: Function and Dysfunction of Huntingtin in Axonal Transport. In: *Intracellular Traffic and Neurodegenerative Disorders*. 2009. p. 115–23.

155. Kacher R, Mounier C, Caboche J, Betuing S. Altered cholesterol homeostasis in Huntington's disease. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:1–24.
156. Chen Y, Nielsen J. Energy metabolism controls phenotypes by protein efficiency and allocation. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(35):17592–7.
157. Handley RR, Reid SJ, Patassini S, Rudiger SR, Obolonkin V, McLaughlan CJ, et al. Metabolic disruption identified in the Huntington's disease transgenic sheep model. *Sci Rep.* 2016;6(1):20681.
158. Sapp E, Seeley C, Iuliano M, Weisman E, Vodicka P, DiFiglia M, et al. Protein changes in synaptosomes of Huntington's disease knock-in mice are dependent on age and brain region. *Neurobiol Dis.* 2020;141(November 2019):104950.
159. DiProspero NA, Chen E-Y, Charles V, Plomann M, Kordower JH, Tagle DA. Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol.* 2004;33(5):517–33.
160. Virlogeux A, Scaramuzzino C, Lenoir S, Carpentier R, Louessard M, Genoux A, et al. Increasing brain palmitoylation rescues behavior and neuropathology in Huntington disease mice. *Sci Adv.* 2021;7(14).
161. Smith R, Brundin P, Li J-Y. Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(17):1901–12.
162. Tousley A, Iuliano M, Weisman E, Sapp E, Richardson H, Vodicka P, et al. Huntingtin associates with the actin cytoskeleton and α -actinin isoforms to influence stimulus dependent morphology changes. *PLoS One.* 2019;14(2):e0212337.
163. Auerbach W. The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum Mol Genet.* 2001;10(22):2515–23.
164. Suopanki J, Gotz C, Lutsch G, Schiller J, Harjes P, Herrmann A, et al. Interaction of huntingtin fragments with brain membranes - clues to early dysfunction in Huntington's disease. *J Neurochem.* 2006;96(3):870–84.
165. Hernandez SJ, Fote G, Reyes-Ortiz AM, Steffan JS, Thompson LM. Cooperation of cell adhesion and autophagy in the brain: Functional roles in development and neurodegenerative disease. *Matrix Biol Plus.* 2021;12:100089.
166. Lalić NM, Marić J, Svetel M, Jotić A, Stefanova E, Lalić K, et al. Glucose homeostasis in Huntington disease. *Arch Neurol.* 2008;65(4):476.
167. Kotliarova S, Jana NR, Sakamoto N, Kurosawa M, Miyazaki H, Nekooki M, et al. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine- EGFP fluorescent aggregates. *J Neurochem.* 2005;93(3):641–53.
168. Panaro MA, Benameur T, Porro C. Hypothalamic neuropeptide brain protection: Focus on oxytocin. *J Clin Med.* 2020;9(5):1534.
169. Ahmad Aziz N, Pijl H, Frölich M, Roelfsema F, Roos RAC. Altered thyrotropic and lactotropic axes regulation in Huntington's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;73(4):no-no.
170. Zhang X, Alshakhshir N, Zhao L. Glycolytic metabolism, brain resilience, and Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2021;15:662242.
171. Brás IC, König A, Outeiro TF. Glycation in Huntington's disease: A possible modifier and target for intervention. *J Huntingtons Dis.* 2019;8(3):245–56.
172. Barron JC, Hurley EP, Parsons MP. Huntingtin and the synapse. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:689332.
173. Lim D, Fedrizzi L, Tartari M, Zuccato C, Cattaneo E, Brini M, et al. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5780–9.
174. Li S, Li X-J. Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Mol Neurodegener.* 2006 Dec;1(19):19.
175. Li X, Wang J. Maintenance of chaperone-mediated autophagy activity in cultured cells expressing mutant huntingtin. *Biomed Reports.* 2014;2(4):529–32.
176. Liu Y, Xue Y, Ridley S, Zhang D, Rezvani K, Fu X, et al. Direct reprogramming of Huntington's disease patient fibroblasts into neuron-like cells leads to abnormal neurite outgrowth, increased cell death, and aggregate formation. *PLoS One.* 2014;9(10):e109621.
177. Yusuf IO, Chen H-M, Cheng P, Chang C, Tsai S, Chuang J, et al. FGF9 induces neurite outgrowth upon ERK signaling in knock-in striatal Huntington's disease cells. *Life Sci.* 2021;267(December 2020):118952.
178. Kedaigle AJ, Fraenkel E, Atwal RS, Wu M, Gusella JF, MacDonald ME, et al. Bioenergetic

- deficits in Huntington's disease iPSC-derived neural cells and rescue with glycolytic metabolites. *Hum Mol Genet.* 2020 Jul;29(11):1757–71.
179. Taran AS, Shuvalova LD, Lagarkova MA, Alieva IB. Huntington's disease-An outlook on the interplay of the HTT protein, microtubules and actin cytoskeletal components. *Cells.* 2020;9(6):1514.
 180. Chen S, Yoo H, Li CH, Park C, Park G, Tan LY, et al. Real-time three-dimensional tracking of single vesicles reveals abnormal motion and pools of synaptic vesicles in neurons of Huntington's disease mice. *iScience.* 2021;24(10):103181.
 181. McAdam R, Cousin M, Smillie K. A08 Synaptic vesicle recycling is disrupted in a mouse model of huntington's disease. In: *A: Pathogenic mechanisms.* 2021. p. A3.2-A3.
 182. Trushina E, Singh RD, Dyer RB, Cao S, Shah VH, Parton RG, et al. Mutant huntingtin inhibits clathrin-independent endocytosis and causes accumulation of cholesterol in vitro and in vivo. *Hum Mol Genet.* 2006;15(24):3578–91.
 183. El-Sahar AE, Rastanawi AA, El-Yamany MF, Saad MA. Dapagliflozin improves behavioral dysfunction of Huntington's disease in rats via inhibiting apoptosis-related glycolysis. *Life Sci.* 2020;257:118076.
 184. M. F, Dobransky T, D. Gervasio-Carvalho EA, S. J, A. F. Energy Metabolism in Huntington's Disease. In: *Huntington's Disease - Core Concepts and Current Advances.* InTech; 2012.
 185. Montojo MT, Aganzo M, González N. Huntington's disease and diabetes: Chronological sequence of its association. *J Huntingtons Dis.* 2017;6(3):179–88.
 186. Zabel C, Mao L, Woodman B, Rohe M, Wacker MA, Kläre Y, et al. A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for Huntington disease. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Apr;8(4):720–34.
 187. Al-Ramahi I, Lu B, Di Paola S, Pang K, de Haro M, Peluso I, et al. High-throughput functional analysis distinguishes pathogenic, nonpathogenic, and compensatory transcriptional changes in neurodegeneration. *Cell Syst.* 2018;7(1):28-40.e4.
 188. Goodman AOG, Murgatroyd PR, Medina-Gomez G, Wood NI, Finer N, Vidal-Puig AJ, et al. The metabolic profile of early Huntington's disease-a combined human and transgenic mouse study. *Exp Neurol.* 2008;210(2):691–8.
 189. Hamilton J, Pellman JJ, Brustovetsky T, Harris RA, Brustovetsky N. Oxidative metabolism in YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1;24(17):4862–78.
 190. Mochel F, Haller RG. Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J Clin Invest.* 2011;121(2):493–9.

8 EKLER

EK 1

Etik Kurul İzni



EK 2

12 Aylık YAC128 ve LM Grupları Arasında Değişim Gösteren m/z Değerleri

Tablo 9. 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinden elde edilen istatistiksel anlamlı m/z değerleri

R1		R2	R3	R4
705,289	985,303	708,949	706,282	708,949
708,949	1006,436	721,620	708,949	721,620
709,239	1015,536	758,846	714,930	758,846
719,886	1030,558	770,891	721,620	842,646
721,620	1044,547	842,646	728,945	866,625
725,882	1057,556	866,625	758,846	878,282
727,893	1065,557	878,282	770,891	914,485
728,901	1067,529	914,485	842,646	917,344
738,253	1115,590	917,344	878,282	930,333
743,869	1144,787	933,463	914,485	933,463
744,217	1156,605	968,624	917,344	968,422
758,843	1158,583	985,303	930,333	968,620
760,294	1159,580	1015,536	933,463	972,540
770,891	1174,596	1026,501	952,725	985,303
815,357	1178,600	1029,552	968,624	1015,536
826,865	1193,363	1115,590	972,540	1026,501
834,678	1221,421	1156,605	985,303	1030,558
837,045	1232,637	1178,600	1015,536	1156,605
842,646	1303,669	1192,446	1026,501	1159,580
862,807	1337,982	1198,928	1144,786	1174,596
865,686	1338,662	1221,421	1159,580	1232,637
878,282	1397,113	1303,669	1192,446	1303,669
899,385	1423,786	1337,981	1198,928	1337,981
909,434	1698,581	1397,115	1215,487	1338,662
914,485	2189,676	1420,204	1303,669	1397,115
933,463	2191,828	1422,764	1338,662	1420,208
952,725		1423,786	1397,113	1422,764
959,283		1698,581	1420,204	1423,786
966,327		2189,676	1422,764	1444,764
968,624		2191,828	1444,764	1698,581
970,349			1698,581	2191,828
972,540			2189,676	
977,390			2191,828	

EK 3

12 Aylık YAC128 ve LM Grupları Arasında Değişim Gösteren Proteinler

Tablo 10. 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler

Intensity Ratio	Month	Region	MALDI-MSI observed m/z	LC-MS/MS m/z (+H)	Matching error (ppm)	Modifications	Accession	Description
Up-regulated in YAC128	12	R1	914.485	914.473	12.654		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R1	1303.669	1303.674	-3.847		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R1	1015.536	1015.553	-17.044		O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	12	R1	1156.605	1156.615	-9.027		Q8VDQ8	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2
	12	R1	1423.786	1423.783	1.85		Q9Z2U1	Proteasome subunit alpha type 5
	12	R1	1159.580	1159.595	-13.213		Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A
	12	R1	972.540	972.522	17.979		P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic sub. a
	12	R1	1115.589	1115.569	18.261		Q7TPR4	Alpha-actinin-1
	12	R1	1178.6	1178.572	23.184		Q99P72	Reticulon-4
	12	R1	1030.558	1030.542	16.302		O35526	Syntaxin-1A
	12	R1	1232.637	1232.601	29.42		Q62261	Spectrin beta chain_non-erythrocytic 1
	12	R1	1174.596	1174.595	0.532		Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1
	12	R1	1065.557	1065.558	-0.842		P03995	Glial fibrillary acidic protein
	12	R1	909.434	909.425	9.933		B2RSH2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1
	12	R1	1044.547	1044.547	-0.544		Q8BLK3	Limbic system-associated membrane protein
	12	R1	1057.556	1057.557	-0.833		Q8BLK3	Limbic system-associated membrane protein
	12	R2	914.485	914.473	12.654		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R2	1303.669	1303.674	-3.847		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R2	1015.536	1015.553	-17.044		O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	12	R2	1156.605	1156.615	-9.027		Q8VDQ8	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2
	12	R2	1423.786	1423.783	1.85		Q9Z2U1	Proteasome subunit alpha type 5
	12	R2	1026.501	1026.504	-2.89	[N-term] Acetyl N-TERM	P16330	2'_3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
	12	R2	1115.589	1115.569	18.261		Q7TPR4	Alpha-actinin-1
	12	R2	1178,6	1178,572	23,184		Q99P72	Reticulon-4
	12	R3	914,485	914,473	12,654		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R3	1303,669	1303,674	-3,847		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R3	1015,536	1015,553	-17,044		O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	12	R3	1159.58	1159.595	-13.213		Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A
	12	R3	972.54	972.522	17.979		P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic sub. a
	12	R3	1026.501	1026.504	-2.89	[N-term] Acetyl N-TERM	P16330	2'_3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
	12	R3	1444.764	1444.753	7.33	[N-term] Acetyl N-TERM [5] Deamidation N	Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1
	12	R4	914.485	914.473	12.654		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R4	1303.669	1303.674	-3.847		Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	12	R4	1015.536	1015.553	-17.044		O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	12	R4	1156.605	1156.615	-9.027		Q8VDQ8	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2
	12	R4	1423.786	1423.783	1.85		Q9Z2U1	Proteasome subunit alpha type 5
	12	R4	1159.58	1159.595	-13.213		Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A
	12	R4	972.54	972.522	17.979		P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic sub. a
	12	R4	1026.501	1026.504	-2.89	[N-term] Acetyl N-TERM	P16330	2'_3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
	12	R4	1030.558	1030.542	16.302		O35526	Syntaxin-1A

Tablo 10. 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Up-regulated in YAC128	12	R4	1232.637	1232.601	29.42		Q62261	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 1
	12	R4	1174.596	1174.595	0.532		Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1
	12	R4	1444.764	1444.753	7.33	[N-term] Acetyl N-TERM [5] Deamidation N	Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1
	12	R4	968.422	968.418	4.268		Q91VR2	ATP synthase subunit gamma_ mitochondrial
Down-regulated in YAC128	12	R1	933.463	933.471	-8.499	[1]Carbamidomethyl C	Q9R0P5	Destrin
	12	R1	1338.662	1338.644	13.899		Q9CZU6	Citrate synthase_ mitochondrial
	12	R1	1158.583	1158.589	-5.035		P54728	UV excision repair protein RAD23 homolog B
	12	R1	1067.529	1067.53	-1.164		Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta mitochondrial
	12	R2	933.463	933.471	-8.499	[1]Carbamidomethyl C	Q9R0P5	Destrin
	12	R2	1422.764	1422.774	-6.982		D3YXG0	Hemicentin-1
	12	R2	1029.552	1029.548	4.015		P70168	Importin subunit beta-1
	12	R3	933.463	933.471	-8.499	[1]Carbamidomethyl C	Q9R0P5	Destrin
	12	R3	1338.662	1338.644	13.899		Q9CZU6	Citrate synthase_ mitochondrial
	12	R3	1422.764	1422.774	-6.982		D3YXG0	Hemicentin-1
	12	R4	933.463	933.471	-8.499	[1]Carbamidomethyl C	Q9R0P5	Destrin
	12	R4	1338.662	1338.644	13.899		Q9CZU6	Citrate synthase_ mitochondrial
	12	R4	1422.764	1422.774	-6.982		D3YXG0	Hemicentin-1

EK 4

3, 6 ve 12 Aylık YAC128 ve LM Grupları Arasında Değişim Gösteren Proteinler

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler

Intensity Ratio	Month	Region	MALDI-MSI observed m/z	LC-MS/MS m/z (+H)	Matching error (ppm)	Modifications	Accession	Description
Down-regulated in YAC128	3	R1	862.42	862.4305	-2.2833	[5] Deamidation Q	P26040	Ezrin
	3	R1	1361.66	1361.6617	-0.7279	[N-term] Acetyl N-TERM [2] Oxidation M	P15508	Spectrin beta chain_ erythrocytic
	3	R1	1460.72	1460.7202	-2.9595		P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
	3	R1	1686.88	1686.8810	-0.4344		Q9QXS1	Plectin
	3	R1	1742.86	1742.8629	0.2345		Q9JI91	Alpha-actinin-2
	3	R1	2042.00	2041.9964	-4.3350		Q91YS8	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
	3	R1	2247.10	2247.1000	-1.3319		P31001	Desmin
	3	R1	2262.12	2262.1176	-2.4395		P27773	Protein disulfide-isomerase A3
	3	R1	2327.14	2327.1415	-0.9647		Q9QWI6	SRC kinase signaling inhibitor 1
	3	R1	2465.16	2465.1619	-0.9510		Q7TQF7	Amphiphysin
	3	R1	2708.36	2708.3639	1.1194	[N-term] Acetyl N-TERM	P63044	Vesicle-associated membrane protein 2
	3	R1	2807.32	2807.3161	-1.9556	[7] Deamidation Q [8] Oxidation M	Q6R891	Neurabin-2
	3	R1	2856.34	2856.3381	-0.8700		P06837	Neuromodulin
	3	R1	3011.38	3011.3865	1.4569		Q91XV3	Brain acid soluble protein 1
	3	R2	845.44	845.4363	-2.6209	[6] Deamidation N	Q03517	Secretogranin-2
	3	R2	1021.50	1021.5023	-1.0942		Q9Z2X1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
	3	R2	1160.56	1160.5596	0.6244		P49025	Citron Rho-interacting kinase
	3	R2	1405.66	1405.6594	-1.4157		Q9CQI3	Glia maturation factor beta
	3	R2	1460.72	1460.7202	-1.4999		P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
	3	R2	1707.82	1707.8265	-2.8260		P35564	Calnexin
	3	R2	1858.94	1858.9334	-4.0606		P17183	Gamma-enolase
	3	R2	1987.98	1987.9906	1.8816		Q64105	Sepiapterin reductase
	3	R2	2057.96	2057.9622	-2.3503		Q91XV3	Brain acid soluble protein 1
	3	R2	2075.90	2075.9000	-4.6462		Q91XV3	Brain acid soluble protein 1
	3	R2	2229.12	2229.1180	-1.5134	[5] Deamidation N	Q9QY76	Vesicle-associated membrane protein associated protein B
	3	R2	2263.16	2263.1506	-4.3307		Q64332	Synapsin-2
	3	R3	1076.54	1076.5371	-4.5907	[N-term] Acetyl N-TERM	Q9Z2Y3	Homer protein homolog 1
	3	R3	1694.78	1694.7911	1.1171	[10]Carbamidomethyl C	P31230	Aminoacyl tRNA synthase complex Interacting multifunctional protein 1
	3	R3	1817.88	1817.8963	2.7017	[2]Carbamidomethyl C	Q7TPR4	Alpha-actinin-1
	3	R3	2057.97	2057.9622	-1.5785		Q91XV3	Brain acid soluble protein 1
	3	R3	2134.06	2134.0636	0.8970		Q8JZP2	Synapsin-3
	3	R3	2156.06	2156.0645	-0.4882	[10] Deamidation Q	Q91V92	ATP-citrate synthase
	3	R3	2168.06	2168.0740	3.6570	[10]Carbamidomethyl C [12]Carbamidomethyl C	Q8R0S2	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1
	3	R3	2295.10	2295.0975	-2.2999		Q8R0Y6	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase
	3	R3	2367.16	2367.1688	2.2112		Q7TQF7	Amphiphysin
	3	R3	2523.26	2523.2661	2.0522	[10]Carbamidomethyl C [18] Deamidation N	P13707	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] cytoplasmic
	3	R4	1036.52	1036.5211	0.7864		O08599	Syntaxin-binding protein 1,
	3	R4	1236.60	1236.6081	3.0444	[3] Deamidation N	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Down-regulated in YAC128	3	R4	1237.62	1237.6212	-0.0604		Q00623	Apolipoprotein A-1
	3	R4	1364.70	1364.7056	4.2317		P24369	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
	3	R4	1528.76	1528.7642	-0.3853		Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
	3	R4	1579.80	1579.8074	1.6980	[15] Deamidation N	P10637	Microtubule-associated protein tau
	3	R4	2079.94	2079.9441	-2.6249	[N-term] Acetyl NTERM [1] Deamidation N	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3
Up-regulated in YAC128	3	R1	1107.52	1107.5218	-1.5988	[N-term] Acetyl N-TERM	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A
	3	R1	1256.60	1256.6117	3.3500		Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A
	3	R1	1342.64	1342.6499	1.9600	[N-term] Acetyl N-TERM	Q8R464	Cell adhesion molecule 4
	3	R1	1382.62	1382.6225	0.5869		Q811D0	Disks large homolog 1
	3	R1	1399.66	1399.6700	0.1162		Q64324	Syntaxin-binding protein 2
	3	R1	1730.88	1730.8881	0.9450	[N-term] Acetyl N-TERM	Q9CQ92	Mitochondrial fission 1 protein
	3	R2	1161.56	1161.5647	4.0295		Q00612	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X
	3	R2	1356.64	1356.6543	3.0701		Q9CZW5	Mitochondrial import receptor subunit TOM70
	3	R2	1367.64	1367.6447	-2.9259	[1] Carbamidomethyl C	P12367	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit
	3	R2	1399.66	1399.6700	-1.5444		Q64324	Syntaxin-binding protein 2
	3	R2	1444.68	1444.6777	-4.6769		Q9QUR6	Prolyl endopeptidase
	3	R2	1512.76	1512.7740	4.5081	[12] Carbamidomethyl C	Q80TZ3	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin
	3	R2	1818.88	1818.8828	1.9629		Q61301	Catenin alpha-2
	3	R2	1907.96	1907.9749	4.6245	[16] Deamidation N	Q99KI0	Aconitate hydratase_ mitochondrial
	3	R2	1919.94	1919.9379	-1.0752	[1] Carbamidomethyl C	P21107	Tropomyosin alpha-3 chain
	3	R2	2002.96	2002.9685	3.9875	[1] Carbamidomethyl C	P51174	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial
	3	R2	2109.06	2109.0683	2.4737		Q3UM45	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7
	3	R2	2131.04	2131.0376	-1.7928	[N-term] Acetyl N-TERM [8] Oxidation M	P68404	Protein kinase C beta type
	3	R2	2133.04	2133.0499	1.2172	[N-term] Acetyl N-TERM [10] Deamidation Q	O35643	AP-1 complex subunit beta-1
	3	R2	2148.04	2148.0455	-1.6679		Q61330	Contactin-2
	3	R2	2152.06	2152.0629	0.7114		Q8BHE3	Caytaxin
	3	R2	2301.10	2301.1081	0.9846	[9] Carbamidomethyl C	P35235	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
	3	R3	1074.54	1074.5426	4.7233		P13595	Neural cell adhesion molecule 1
	3	R3	1116.56	1116.5718	-2.1226	[N-term] Acetyl N-TERM	Q61753	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
	3	R3	1448.70	1448.7050	1.2436		O35685	Nuclear migration protein nudC
	3	R3	1540.76	1540.7602	-3.7331	[4] Deamidation N	Q61548	Clathrin coat assembly protein AP180
	3	R3	1658.82	1658.8240	-4.6848		Q8C8R3	Ankyrin-2
	3	R3	1768.88	1768.8864	2.7991		Q8R464	Cell adhesion molecule 4
	3	R3	1813.88	1813.8926	2.2149	[7] Deamidation Q	Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6
	3	R3	1896.92	1896.9338	3.0049		Q60598	Src substrate cortactin
	3	R3	1943.96	1943.9709	0.8594		Q62261	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 1
	3	R3	1983.98	1983.9770	-3.7225		Q80UG5	Septin-9
	3	R3	2038.98	2038.9829	-1.7543		Q9CWZ7	Gamma-soluble NSF attachment protein
	3	R3	2049.04	2049.0386	0.0880	[4] Deamidation N [9] Deamidation N [16] Deamidation Q	P33175	Kinesin heavy chain isoform 5A
	3	R3	2152.06	2152.0631	-1.1744		Q69Z23	Dynein heavy chain 17_ axonemal
	3	R3	2185.06	2185.0628	-3.6024		Q8BGH2	Sorting and assembly machinery component 50 homolog
	3	R3	2523.24	2523.2375	-4.5186		P09671	Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial
	3	R4	966.46	966.4680	2.3721	[N-term]Acetyl N-TERM	O35215	D-dopachrome decarboxylase
	3	R4	1019.56	1019.5534	-4.9781		P32921	Tryptophan--tRNA ligase_ cytoplasmic
	3	R4	1060.50	1060.5098	-1.9808		P42669	Transcriptional activator protein Pur-alpha
	3	R4	1092.50	1092.5069	3.8267		Q61553	Fascin
	3	R4	1131.58	1131.5793	-1.1232		P04370	Myelin basic protein

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Up-regulated in YAC128	3	R4	1205.54	1205.5467	0.2306	[N-term] Acetyl N-TERM [2] Oxidation M	Q3UHL1	CaM kinase-like vesicle-associated protein
	3	R4	1251.60	1251.6077	4.3416	[N-term] Acetyl N-TERM	Q63844	Mitogen-activated protein kinase 3
	3	R4	1267.60	1267.6052	0.7611		Q8VD37	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting 1
	3	R4	1289.62	1289.6267	0.7498		P08226	Apolipoprotein E
	3	R4	1546.74	1546.7505	-2.2678	[15] Deamidation N	Q8BUV3	Gephyrin
	3	R4	1595.72	1595.7233	-2.2902	[N-term] Acetyl N-TERM [1] Deamidation N	P08113	Endoplasmic
	3	R4	1702.84	1702.8395	-1.8774		P16388	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1
	3	R4	2044.02	2044.0168	-0.5008		P26443	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial
	3	R4	2066.00	2066.0077	0.6178		Q9ES97	Reticulon-3
	3	R4	2091.04	2091.0465	4.5289		Q9WV55	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
	3	R4	2424.20	2424.2140	2.9248		Q64521	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase mitochondrial
	3	R4	2424.20	2424.2140	2.9248		Q64521	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase mitochondrial
Down-regulated in YAC128	6	R1	944.46	944.4618	-0.4339		Q8BKZ9	Pyruvate dehydrogenase protein X component_ mitochondrial
	6	R1	1064.50	1064.5106	1.7874		P42932	T-complex protein 1 subunit theta
	6	R1	1428.72	1428.7190	-3.3119		Q8VHW2	Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit
	6	R1	1460.72	1460.7202	-1.7729		P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
	6	R1	1543.76	1543.7751	1.5188		P58252	Elongation factor 2
	6	R1	1714.90	1714.9010	-3.5234		Q9CWS0	N(G)_N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
	6	R1	2007.00	2006.9930	-2.0756		P27773	Protein disulfide-isomerase A3
	6	R1	2072.04	2072.0546	4.8778	[13] Deamidation Q	Q7TMK9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
	6	R2	886.44	886.4517	0.8524	[N-term] Acetyl N-TERM [5] Deamidation N	P62631	Elongation factor 1-alpha 2
	6	R2	1075.54	1075.5419	-2.2375		O35136	Neural cell adhesion molecule 2
	6	R2	1165.54	1165.5484	-3.5162		P54227	Stathmin
	6	R2	1205.52	1205.5256	-0.4736	[7]Carbamidomethyl C	Q68FF6	ARF GTPase-activating protein GIT1
	6	R2	1527.76	1527.7584	-3.0932	[4]Carbamidomethyl C	P17710	Hexokinase-1
	6	R2	1576.76	1576.7701	0.0049		Q6ZWR6	Nesprin-1
	6	R2	1609.78	1609.7897	3.4180		P07724	Albumin
	6	R2	1627.82	1627.8214	-3.5170		Q8CJ19	[F-actin]-monooxygenase MICAL3
	6	R2	1751.86	1751.8671	-1.5181		Q9Z0P4	Paralemmin-1
	6	R2	1770.88	1770.8810	-2.6869		P08553	Neurofilament medium polypeptide
	6	R2	1871.92	1871.9320	1.8858		Q9Z2H5	Band 4.1-like protein 1
	6	R2	1886.94	1886.9389	-4.2354		Q8BYI9	Tenascin-R
	6	R2	1972.98	1972.9876	0.4483		Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B
	6	R2	2051.94	2051.9364	-4.9864	[N-term] Acetyl N-TERM	P06837	Neuromodulin
	6	R3	880.48	880.4887	-0.6041		O88342	WD repeat-containing protein 1
	6	R3	1069.50	1069.5095	3.6677	[8]Carbamidomethyl C	Q810U4	Neuronal cell adhesion molecule
	6	R3	1077.52	1077.5187	-3.2168	[6]Carbamidomethyl C	Q9QUP5	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1
	6	R3	1180.54	1180.5450	0.3689	[1]Carbamidomethyl C [6]Carbamidomethyl C	Q6PIE5	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2
	6	R3	1214.60	1214.6012	2.6313		Q8VIM9	Immunity-related GTPase family Q protein
	6	R3	1540.76	1540.7602	-1.3506	[4] Deamidation N	Q61548	Clathrin coat assembly protein AP180
	6	R3	1578.78	1578.7758	-2.8826		Q9DC07	LIM zinc-binding domain-containing Nebulette
	6	R3	1582.79	1582.7932	4.9733	[N-term] Acetyl N-TERM [12] Deamidation Q	Q6ZWR6	Nesprin-1
	6	R3	1621.82	1621.8254	0.6279		P17751	Triosephosphate isomerase
	6	R3	1770.86	1770.8731	0.6968		A2ASS6	Titin
	6	R3	1898.94	1898.9463	2.5974	[8]Carbamidomethyl C	Q02248	Catenin beta-1
	6	R3	1949.92	1949.9338	0.7041		Q71LX4	Talin-2

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Down-regulated in YAC128	6	R3	1972.98	1972.9876	2.0954		Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B
	6	R3	1984.98	1984.9902	2.4494		Q64010	Adapter molecule crk
	6	R3	2047.08	2047.0675	-4.8017	[6]Carbamidomethyl C	P52480	Pyruvate kinase PKM
	6	R3	2131.04	2131.0376	-3.7887	[N-term] Acetyl N-TERM [8] Oxidation M	P68404	Protein kinase C beta type
	6	R3	2378.20	2378.1987	0.0015		Q810U3	Neurofascin
	6	R4	896.48	896.4836	1.0818		Q6NXX7	Inactive dipeptidyl peptidase 10
	6	R4	1151.58	1151.5943	3.7172		P20108	Thioredoxin-dependent peroxide reductase mitochondrial
	6	R4	1275.58	1275.5825	-2.1970		P56959	RNA-binding protein FUS
	6	R4	1294.64	1294.6525	1.5197	[2] Deamidation Q	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
	6	R4	1346.64	1346.6546	4.8503		Q91VN4	MICOS complex subunit Mic25
	6	R4	1453.76	1453.7607	1.9873		O88935	Synapsin-1
	6	R4	1531.80	1531.8002	0.0500	[5] Deamidation Q	Q8VD04	GRIP1-associated protein 1
	6	R4	1544.80	1544.8067	4.1310		Q8K310	Matrin-3
	6	R4	1567.76	1567.7639	-2.5316		Q9CPV4	Glyoxalase domain-containing protein 4
	6	R4	1847.86	1847.8617	-0.7353		Q6S5L9	SHC-transforming protein 4
	6	R4	1903.94	1903.9508	4.0270		P08551	Neurofilament light polypeptide
Up-regulated in YAC128	6	R1	989.50	989.5010	0.7209		Q91VW5	Golgin subfamily A member 4
	6	R1	1218.64	1218.6511	2.8283		P58281	Dynamin-like 120 kDa protein_ mitochondrial
	6	R1	1512.78	1512.7740	-2.4304	[12]Carbamidomethyl C	Q80TZ3	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin
	6	R1	1651.84	1651.8360	-4.5999		P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C
	6	R1	1872.94	1872.9484	2.1802		P63044	Vesicle-associated membrane protein 2
	6	R1	2115.00	2115.0023	-0.7937	[1]Carbamidomethyl C	Q61361	Brevican core protein
	6	R2	1223.60	1223.6154	2.4433		Q9QYB1	Chloride intracellular channel protein 4
	6	R2	1606.84	1606.8435	3.4878		P67778	Prohibitin
	6	R2	1694.78	1694.7911	-0.0155	[10]Carbamidomethyl C	P31230	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1
	6	R2	1736.86	1736.8748	1.5922		Q8CHU3	Epsin-2
	6	R2	1813.89	1813.8926	2.3754	[7] Deamidation Q	Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6
	6	R2	1818.87	1818.8716	-0.7032		Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6
	6	R2	1872.94	1872.9484	3.0786		P63044	Vesicle-associated membrane protein 2
	6	R2	1953.90	1953.9045	-2.2850	[3]CarbamidomethylC [9] Deamidation N	Q60692	Proteasome subunit beta type-6
	6	R2	2037.00	2037.0072	1.2767		Q9Z1B3	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1
	6	R2	2063.00	2063.0139	1.4141		Q9QYX7	Protein piccolo
	6	R2	2085.02	2085.0287	1.3033	[1] Deamidation N [13] Deamidation [14] Deamidation Q	O55131	Septin-7
	6	R2	2301.10	2301.1081	-2.2204	[9]Carbamidomethyl C	P35235	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
	6	R2	2360.18	2360.1816	-0.4106	[1]Carbamidomethyl C	Q61361	Brevican core protein
	6	R2	2415.18	2415.1899	0.4737	[9] Deamidation N	Q9R0N7	Synaptotagmin-7
	6	R2	2530.22	2530.2168	-2.3882		Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6
	6	R2	2701.32	2701.3202	-1.2815	[1] Deamidation [4] Deamidation [23] Deamidation Q	P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform
	6	R2	3055.36	3055.3713	1.4389		Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1
	6	R3	1465.68	1465.6952	2.2819	[7] Carbamidomethyl C	Q9WUM4	Coronin-1C
	6	R3	1500.76	1500.7693	-2.4655		Q99KI0	Aconitate hydratase_ mitochondrial
	6	R3	1509.78	1509.7907	2.1963		P39054	Dynamin-2
	6	R3	1577.76	1577.7588	-4.2797	[2] Carbamidomethyl C	Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
	6	R3	1581.78	1581.7829	1.6795	[2] Carbamidomethyl C	P11499	Heat shock protein HSP 90-beta
	6	R3	1601.79	1601.7918	-0.2472		Q99KI0	Aconitate hydratase_ mitochondrial
	6	R3	1745.84	1745.8374	-1.6817		Q07076	Annexin A7
	6	R3	1799.84	1799.8480	-1.7407		Q9JI91	Alpha-actinin-2
	6	R3	1949.94	1949.9392	-0.1585		Q9CZ30	Obg-like ATPase 1

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Up-regulated in YAC128	6	R3	1953.91	1953.9045	-0.4424	[3] Carbamidomethyl C [9] Deamidation N	Q60692	Proteasome subunit beta type-6
	6	R3	2147.06	2147.0575	-3.7793	[17] Deamidation Q	Q9JLM8	Serine/threonine-protein kinase DCLK1
	6	R4	846.42	846.4316	-2.0313		E9Q309	Centrosome-associated protein 350
	6	R4	1015.54	1015.5419	0.6742		P28738	Kinesin heavy chain isoform 5C
	6	R4	1660.84	1660.8442	-0.2812		Q00493	Carboxypeptidase E
	6	R4	1688.82	1688.8238	0.5809		P62918	60S ribosomal protein L8
	6	R4	1712.82	1712.8238	-0.4174		P05480	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
	6	R4	1839.88	1839.8802	-1.6439	[6] Carbamidomethyl C	Q80TJ1	Calcium-dependent secretion activator 1
	6	R4	1896.94	1896.9419	-2.9820	[5] Carbamidomethyl C [7] Carbamidomethyl C	O35927	Catenin delta-2
Down-regulated in YAC128	12	R1	1009.50	1009.5061	4.8559		Q8K310	Matrin-3
	12	R1	1054.52	1054.5238	-0.3948		P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
	12	R1	1145.56	1145.5698	-1.6193		Q9ESF1	Otoferlin
	12	R1	1196.56	1196.5616	-4.9696		Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A
	12	R1	1207.58	1207.5875	1.9877		P14873	Microtubule-associated protein 1B
	12	R1	1233.56	1233.5634	0.5045		Q2PFD7	PH and SEC7 domain-containing protein 3
	12	R1	1251.60	1251.6077	1.6789	[N-term] Acetyl N-TERM	Q63844	Mitogen-activated protein kinase 3
	12	R1	1262.62	1262.6297	0.8335		Q03142	Fibroblast growth factor receptor 4
	12	R1	1377.66	1377.6645	3.8712		Q8JZN5	Complex I assembly factor ACAD9_mitochondrial
	12	R1	1403.68	1403.6761	-1.7765		O08788	Dynactin subunit 1
	12	R1	1684.84	1684.8482	0.7082		Q9DCX2	ATP synthase subunit d_mitochondrial
	12	R1	1872.94	1872.9484	4.9667		P63044	Vesicle-associated membrane protein 2
	12	R1	1983.98	1983.9770	-2.4747		Q80UG5	Septin-9
	12	R1	2009.96	2009.9597	-3.0901		P84075	Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin
	12	R2	1009.50	1009.5061	4.0191		Q8K310	Matrin-3
	12	R2	1054.53	1054.5238	-1.3874		P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
	12	R2	1061.50	1061.5109	-1.0350		P08551	Neurofilament light polypeptide
	12	R2	1077.52	1077.5187	-1.4003	[6] Carbamidomethyl C	Q9QUP5	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1
	12	R2	1085.52	1085.5222	1.6385		E9PUL5	Proline-rich transmembrane protein 2
	12	R2	1171.58	1171.5776	1.1489		P08553	Neurofilament medium polypeptide
	12	R2	1306.60	1306.6096	3.8907		P17426	AP-2 complex subunit alpha-1
	12	R2	1858.94	1858.9334	-4.9367		P17183	Gamma-enolase
	12	R2	2247.10	2247.1000	-2.9919		P31001	Desmin
	12	R2	3138.56	3138.5782	2.4694	[16] Deamidation N	Q8R191	Synaptogyrin-3
	12	R3	980.48	980.4796	-4.0181		P08553	Neurofilament medium polypeptide
	12	R3	1000.50	1000.5098	3.7231		P35293	Ras-related protein Rab-18
	12	R3	1034.50	1034.5054	1.2631		P31786	Acyl-CoA-binding protein
	12	R3	1078.52	1078.5164	-2.3640		Q9QXS1	Plectin
	12	R3	1097.54	1097.5408	1.1479	[1] Carbamidomethyl C	Q8BP67	60S ribosomal protein L24
	12	R3	1762.86	1762.8646	-1.6959		Q9Z2H5	Band 4.1-like protein 1
	12	R3	1779.88	1779.8867	2.6564	[1] Carbamidomethyl C	Q8K354	Carbonyl reductase [NADPH] 3
	12	R3	1987.96	1987.9679	-0.1508		D3YVF0	A-kinase anchor protein 5
	12	R3	2268.12	2268.1309	0.6875		Q6PFD5	Disks large-associated protein 3
	12	R3	2468.18	2468.1915	3.3427		P62908	40S ribosomal protein S3
	12	R4	979.48	979.4877	-2.8349		Q8BHE3	Caytaxin
	12	R4	989.48	989.4799	-0.4854		P28660	Nck-associated protein 1
	12	R4	1422.72	1422.7297	-2.2630		Q80ZJ1	Ras-related protein Rap-2a
	12	R4	1678.84	1678.8503	1.3632		Q05920	Pyruvate carboxylase_mitochondrial

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Up-regulated in YAC128	12	R1	1107.52	1107.5218	-3.9166	[N-term] Acetyl N-TERM	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A
	12	R1	1301.62	1301.6195	-1.2817		Q9WV80	Sorting nexin-1
	12	R1	1348.62	1348.6227	-2.8446		Q8VDD5	Myosin-9
	12	R1	1353.66	1353.6685	0.2487		P35283	Ras-related protein Rab-12
	12	R1	1399.66	1399.6700	0.8473		Q64324	Syntaxin-binding protein 2
	12	R1	1520.76	1520.7592	-0.2638	[N-term] Acetyl N-TERM	P43274	Histone H1.4
	12	R1	1575.76	1575.7609	-1.1573		Q8C437	PEX5-related protein
	12	R1	1746.84	1746.8617	0.6917		Q99104	Unconventional myosin-Va
	12	R1	1781.84	1781.8527	0.5792		P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A
	12	R1	1814.88	1814.8919	1.1371		Q9R111	Guanine deaminase
	12	R1	1886.94	1886.9389	-1.5693		Q8BYI9	Tenascin-R
	12	R1	1919.92	1919.9320	1.7268	[12]Carbamidomethyl C	P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform
	12	R1	2017.96	2017.9713	3.3600		Q80U28	MAP kinase-activating death domain protein
	12	R1	2063.00	2063.0139	1.6048		Q9QYX7	Protein piccolo
	12	R2	1348.63	1348.6227	-3.9064		Q8VDD5	Myosin-9
	12	R2	1428.72	1428.7190	-3.8088		Q8VHW2	Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit
	12	R2	1595.72	1595.7233	-4.4727		P08113	Endoplasmic
	12	R2	1647.82	1647.8272	2.8330	[6] Carbamidomethyl C	Q9QXL2	Kinesin-like protein KIF21A
	12	R2	1921.96	1921.9694	0.4510		Q9CYT6	Adenylyl cyclase-associated protein 2
	12	R2	1949.94	1949.9392	-2.5399		Q9CZ30	Obg-like ATPase 1
	12	R2	2169.08	2169.0856	-0.1697		P23242	Gap junction alpha-1 protein
	12	R2	2220.06	2220.0642	0.3829	[N-term] Acetyl N-TERM	Q80U28	MAP kinase-activating death domain protein
	12	R2	2406.28	2406.2796	-1.4610	[2] Oxidation M	Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein
	12	R3	887.44	887.4556	3.9454		Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6
	12	R3	1090.52	1090.5276	1.6041		Q91V92	ATP-citrate synthase
	12	R3	1294.64	1294.6525	-0.3185	[2] Deamidation Q	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
	12	R3	1301.62	1301.6195	-3.4933		Q9WV80	Sorting nexin-1
	12	R3	1399.67	1399.6700	-1.0786		Q64324	Syntaxin-binding protein 2
	12	R3	1405.64	1405.6594	4.5032		Q9CQI3	Glia maturation factor beta
	12	R3	1411.66	1411.6634	-3.2763	[7] Oxidation M	Q9Z0H8	CAP-Gly domain-containing linker protein 2
	12	R3	1431.72	1431.7162	-2.2416	[N-term] Acetyl N-TERM [1] Carbamidomethyl C	P55066	Neurocan core protein
	12	R3	1509.78	1509.7907	3.6908		P39054	Dynamin-2
	12	R3	1563.74	1563.7497	0.6494	[6] Deamidation Q	Q03517	Secretogranin-2
	12	R3	1606.84	1606.8435	2.1635		P67778	Prohibitin
	12	R3	1874.92	1874.9165	-1.6550	[N-term] Acetyl N-TERM	Q91XM9	Disks large homolog 2
	12	R3	1982.98	1982.9852	-0.2874		O08528	Hexokinase-2
	12	R3	2038.00	2037.9975	-2.8559	[13] Deamidation N	P52480	Pyruvate kinase PKM
	12	R3	2134.06	2134.0636	-0.4424		Q8JZP2	Synapsin-3
	12	R3	2179.08	2179.0812	-0.8574	[18]Carbamidomethyl C	Q61553	Fascin
	12	R3	2220.06	2220.0642	0.7350	[N-term] Acetyl N-TERM	Q80U28	MAP kinase-activating death domain protein
	12	R3	2301.12	2301.1245	-0.1722	[4] Deamidation N	Q9JKK7	Tropomodulin-2
	12	R3	2349.15	2349.1547	2.3878	[N-term] Acetyl N-TERM [1]Carbamidomethyl C [10]Carbamidomethyl C	P52480	Pyruvate kinase PKM
	12	R3	2523.24	2523.2375	-3.6244		P09671	Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial
	12	R4	968.48	968.4757	-3.0629		Q7TMB8	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
	12	R4	1210.54	1210.5408	-3.5503	[8] Deamidation N	Q9CQ69	Cytochrome b-c1 complex subunit 8
	12	R4	1289.62	1289.6267	-1.4293		P08226	Apolipoprotein E
	12	R4	1294.65	1294.6525	1.3131	[2] Deamidation Q	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2

Tablo 11. 3,6 ve 12 aylık YAC128 ve LM dokularının MALDI-MSI analizleri sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık gösteren proteinler (Devamı)

Up-regulated in YAC128	12	R4	1466.68	1466.6944	3.6877	[11]Carbamidomethyl C	Q99JY9	Actin-related protein 3
	12	R4	1489.70	1489.6951	-3.9851		P63328	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform
	12	R4	1491.80	1491.8053	-1.5203		Q3UHH0	AP2-associated protein kinase 1
	12	R4	2044.02	2044.0168	-1.3278		P26443	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial
	12	R4	2091.04	2091.0465	2.9056		Q9WV55	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
	12	R4	2281,12	2281,1129	-4,0041	[5]Carbamidomethyl C	Q99P72	Reticulon-4

9 ÖZGEÇMİŞ











