



**T.C.**  
**ACIBADEM**  
**MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞINA AİT BEYİN DOKUSUNDAKİ  
PROTEİN DEĞİŞİKLİKLERİN MALDI-MS GÖRÜNTÜLEME  
TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ**

**EMEL AKGÜN**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal**

**İSTANBUL-2018**





**T.C.**  
**ACIBADEM**  
**MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞINA AİT BEYİN DOKUSUNDAKİ  
PROTEİN DEĞİŞİKLİKLERİN MALDI-MS GÖRÜNTÜLEME  
TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ**

**EMEL AKGÜN**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal**

**İSTANBUL-2018**

## 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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

25.07.2018

Emel Akgün



## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından desteklenen, başlama tarihi 01.02.2015 olan 114S906 numaralı ve “Nörodejeneratif Beyin Dokusundaki Protein Değişikliklerin MALDI-MS görüntüleme Tekniği ile Belirlenmesi” başlıklı Uluslararası COST projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Sunulan tez çalışması, Alzheimer hastalığında gözlenen nörodejenerasyon süreci ve patolojisinin, hastalıkların modeli olarak sunulan transgenik hayvan modellerinde geliştirilerek incelenmesini ve alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacak bulguların MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi tekniği kullanılarak oluşturulması hedeflenmiştir.

Bu çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Tez danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal’a bilgi birikimi ve tecrübelerini benimle paylaştıkları için,

Sevgili arkadaşlarım BaykalLab üyelerinin her birine, laboratuvardaki profesyonel hayatımızın dışında ikinci ailem olup, ekip ruhunun ne demek olduğunu bana öğrettikleri için,

MALDI Görüntüleme deneyleri sırasında karşılaştığımız her türlü zorluğu birlikte aştığımız, arkadaşlığımızı ve desteğini eksik etmeyen sevgili arkadaşım Dr. Yasemin Furtun Uçal’a,

Her zaman koşulsuz sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim aileme, özellikle daha okuma yazma bile öğrenmeden önce beni bilimle tanıştıran babama,

Teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN .....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
TABLO LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	1
SUMMARY .....	2
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>5</b>
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması .....	5
2.2. 5XFAD Transgenik Deneysel Hayvan Modeli ve Morris Su Labirenti Testi .....	7
2.3. MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi .....	8
2.4. Alzheimer Hastalığı ve Proteomik .....	9
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>11</b>
3.1. Deneysel Hayvanlarının Bakımı ve Üretimi .....	11
3.2. Deneysel Hayvanlarının Genotiplenmesi .....	11
3.2.1. DNA İzolasyonu .....	12
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	12
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	14
3.3. Morris Su Labirenti Davranışsal Testi .....	15
3.4. Beyin Dokularının Eksizyonu, Saklanması ve Beyin Kesitlerinin Alınması .....	18
3.5. İmmunohistokimya Boyaması .....	19
3.6. Beyin Doku Kesitlerinden Protein Ekstraksiyonu, Peptid Eldesi ve nanoLC MS/MS Analizi .....	20
3.7. Beyin Doku Kesitlerinde MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Analizi .....	22
3.7.1. ITO Slaytların Poly-L-Lysine Solüsyonu ile Kaplanması .....	22

3.7.2. Dokuların Yıkanması .....	22
3.7.3. Tripsinizasyon .....	23
3.7.4. Matriks Uygulaması .....	23
3.7.5. MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Analizi .....	24
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>27</b>
4.1. 5XFAD Farelerin Morris Su Labirenti Testi Sonuçları .....	27
4.2. 5XFAD Farelerin Beyin Kesitlerinin İmmünohistokimya Boyaması .....	29
4.3. 5XFAD Fare Beyin Dokularının nanoLC MS/MS Analizi Sonuçları .....	30
4.4. 5XFAD Fare Beyin Dokularının MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Analizi Sonuçları .....	34
4.5. Hastalığa Özgü Ortak Protein ve Yolakların Belirlenmesi .....	47
4.6. Alzheimer Hastalığı Transgenik Fare Modeli 3-6-12'inci Ay Örnekleri İçin Özgün ve Ortak Proteinler .....	48
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>60</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>62</b>

## KISALTMALAR ve SİMGELER

5XFAD	: 5 mutasyonlu ailevi Alzheimer hastalığı fare modeli
A $\beta$	: Amiloid beta
ABC	: Amonyum bikarbonat
ACN	: Asetonitril
AH	: Alzheimer Hastalığı
ALZ	: Transgenik fare
ALM	: Transgenik olmayan litter mate fare
APP	: Amiloid prekürsör protein
CHCA	: A-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
FASP	: Filtre destekli örnek hazırlama kiti
IAA	: Iyodoasetamid
KCl	: Potasyum klorür
LC	: Sıvı kromatografisi
MALDI	: Matrix assisted laser desorption/ionization
MS	: Kütle spektrometresi
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
PFA	: Paraformaldehit
PBS	: Fosfat tampon salin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TOF	: Time of flight
UPX	: Universal protein extraction

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2-1. Alzheimer hastalığı patojenezi .....	6
Şekil 2-2. MALDI iyonlaşması .....	8
Şekil 3-1. Alzheimer hastalığı modeli hayvan dokularının agaroz jel elektroforezi ile PZR ürünlerinin analizi .....	15
Şekil 3-2. Morris su labirenti tankının kadran ve platform pozisyonları.....	17
Şekil 3-3. EthoVision XT 9 programı ile kamerada fare görünürlüğünün kontrolü .	17
Şekil 3-4. ITO lamaların tarayıcı ile görüntülerinin alınması .....	23
Şekil 3-5. CHCA matriksinin kristalizasyonu .....	24
Şekil 3-6. MALDI TOF/TOF cihazının kalibrasyonu .....	26
Şekil 4-1. Alzheimer hastalığı modeli farelerinde Morris su labirenti davranış testi öğrenme ve hafıza sonuçları .....	28
Şekil 4-2. Alzheimer hastalığı fare modeli beyin dokularında (hipokampus) IHC ile amyloid-beta proteininin görüntülenmesi .....	29
Şekil 4-3. Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 proteininin MALDI görüntüsü .....	35
Şekil 4-4. Syntaxin-binding protein 1 proteininin MALDI görüntüsü .....	36
Şekil 4-5. Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A proteininin MALDI görüntüsü .....	36
Şekil 4-6. Spectrin beta chain_ erythrocytic proteininin MALDI görüntüsü .....	37
Şekil 4-7. Vesicle-fusing ATPase proteininin MALDI görüntüsü .....	37
Şekil 4-8. Heat shock 70 kDa protein 4Lproteininin MALDI görüntüsü .....	38
Şekil 4-9. 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 proteininin MALDI görüntüsü.....	39
Şekil 4-10. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate proteininin MALDI görüntüsü.....	40

<b>Şekil 4-11.</b> Thioredoxin reductase 1_ cytoplasmic proteininin MALDI görüntüsü ..	40
<b>Şekil 4-12.</b> Kinesin-like protein KIF27 proteininin MALDI görüntüsü.....	41
<b>Şekil 4-13.</b> Lamin-B2 proteininin MALDI görüntüsü.....	41
<b>Şekil 4-14.</b> Spatacsin proteininin MALDI görüntüsü .....	42
<b>Şekil 4-15.</b> Synaptic vesicle glycoprotein 2A proteininin MALDI görüntüsü .....	42
<b>Şekil 4-16.</b> Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting proteininin MALDI görüntüsü	43
<b>Şekil 4-17.</b> Puromycin-sensitive aminopeptidase proteininin MALDI görüntüsü ....	43
<b>Şekil 4-18.</b> Gamma-enolase proteininin MALDI görüntüsü .....	44
<b>Şekil 4-19.</b> AP-2 complex subunit alpha-1 proteininin MALDI görüntüsü .....	44
<b>Şekil 4-20.</b> Malate dehydrogenase_ cytoplasmic proteininin MALDI görüntüsü ....	45
<b>Şekil 4-21.</b> Proteasome subunit beta type-7 proteininin MALDI görüntüsü .....	45
<b>Şekil 4-22.</b> Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase proteininin MALDI görüntüsü .....	46
<b>Şekil 4-23.</b> Ras-related protein Rab-3A proteininin MALDI görüntüsü .....	46
<b>Şekil 4-24.</b> Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B proteininin MALDI görüntüsü .....	47
<b>Şekil 4-25.</b> Alzheimer hastalığı farklı evrelerinde tanımlanan özgün ve ortak protein sayıları (A) ve proteinler ile ilişkili moleküler yollar (B). .....	49

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3-1.</b> Deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan primer dizileri .....	13
<b>Tablo 3-2.</b> Alzheimer hastalığı modeli hayvan DNA'larının PZR bileşenleri .....	13
<b>Tablo 3-3.</b> PZR aşamaları .....	14
<b>Tablo 3-4.</b> Morris su labirenti deney planı .....	16
<b>Tablo 3-5.</b> Peptide Calibration Standard II içeriği .....	25
<b>Tablo 4-1.</b> Alzheimer 5XFAD fare modeli 3 ay beyin kesiti LC-MS/MS analiz sonuçları .....	30
<b>Tablo 4-2.</b> Alzheimer 5XFAD fare modeli 12 Ay beyin kesiti LCMSMS analiz sonuçları .....	31
<b>Tablo 4-3.</b> 6 aylık Alzheimer fare modeli beyin dokularının MALDI görüntüleme sonuçları .....	35
<b>Tablo 4-4.</b> 12 aylık Alzheimer fare modeli beyin dokularının MALDI görüntüleme sonuçları .....	38
<b>Tablo 4-5.</b> Data indirgenme kriterleri.....	48
<b>Tablo 4-6.</b> Alzheimer Hastalığı'nda LC-MS/MS ve MALDI-TOF/MS'ten elde edilen ortak proteinler .....	48

## ÖZET

Nörodejeneratif hastalıklar, ilerleyici sinir sistemi fonksiyon bozukluğuna neden olan merkezi sinir sistemini etkilemektedir. Bu zayıflatıcı ve tedavi edilemeyen hastalıklar sinir hücresi fonksiyon kayıplarıyla karakterizedir ve etkilenmiş sinir sistem yapılarının atrofisi ile ilişkilidir. Alzheimer hastalığı, yaşlı popülasyonunda en yaygın görülen bunama hastalığıdır. Projenin amacı, Alzheimer hastalığında gözlenen nörodejenerasyon süreci ve patolojisinin, iki temel ve birbirini tamamlayan proteomik teknik ile araştırılmasıdır. Hastalık modeli olarak sunulan transgenik hayvan modellerinde geliştirilerek incelenmesidir. Hastalığa özgü transgenik hayvan modeli olan 5XFAD fareleri deney grubu olarak, aynı batından doğan transgenic olmayan yavrular ise kontrol grubu olarak kullanıldı. 3, 6 ve 12 aylarda yapılan davranış testleri ve IHC sonuçlarına göre, hayvanların hastalığın hangi evresinde olduğu tespit edildi. Pre-patolojik, gelişim ve hastalık evrelerindeki hayvanlardan disekte edilen beyinlerden, MALDI-Görüntüleme ve LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Her iki analizden elde edilen bilgi bir araya getirilerek değerlendirildi ve Alzheimer, transgenik hayvan modellerinde, hastalığın evrelerinde meydana gelen protein ekspresyon değişimleri tespit edilmiş, listelenmiş ve lokalizasyonları belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer, MALDI-görüntüleme, LC-MS/MS

## **SUMMARY**

Neurodegenerative diseases affect the central nervous system and cause progressive nervous system dysfunction. These disorders which have no absolute therapeutic solutions are generally characterized with nervous cell dysfunction and brain atrophy related to the affected regions of the nervous system. Alzheimer disease is the most common form of dementia among the elderly population. The aim of this project is investigating the neurodegenerative progresses and pathology of Alzheimer's disease by using two, complementary proteomics techniques; MALDI-Imaging and LC-MS/MS analysis. With this aim, 5XFAD transgenic mouse model of diseases were used as experimental group and their non-transgenic littermates were used as control groups. According to behavioral tests and immunohistochemistry analysis performed at 3, 6 and 12-months-old, the stages of the disease were determined. Whole brains were dissected from mice at pre-pathological, progression and pathological stages of the diseases and analyzed with MALDI-Imaging and LC-MS/MS. The data obtained from both proteomic analysis were combined and the alterations of protein expressions in addition to their localization images were determined and listed for each disease at different stages.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, MALDI-Imaging, LC-MS/MS

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar, beyin ve omur ilikteki sinir sistemi hücrelerindeki bozulmalarla oluşmaktadır. Hücrelerdeki bu değişiklikler, hücrenin normal olmayan fonksiyonlar sergilemesine ve sonunda hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Nöronların kötüleşmesiyle birlikte, bireyde koordinasyon bozukluğu ve isimleri hatırlayamama gibi semptomlar da görülebilmektedir. Ölen hücrelerin sayısı arttıkça, oluşan semptomlar daha da kötüleşmektedir. İlerleyen durumlarda, hastalar bağımsız yürüme yetisini kaybeder, düşünemez hal alır veya genel fonksiyonlarını yerine getiremez duruma gelmektedir. Sonunda, bu hastalıkların çoğu ölümle sonuçlanmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar için var olan tedaviler ise, sınırlıdır ve hastalığın sebeplerinden çok semptomlarına yöneliktir (1,2). Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığı, demansın en sık sebebidir. Demans ile yaşayan hastaların tanısı konularak, doğru tedaviye ulaşması yüksek gelirli ülkelerde bile ancak %50'lere ulaşabilmektedir. Bu rakamlar orta ve düşük gelirli ülkelerde %10'lara inmektedir. Hayat kalitesini değişmesiyle artan yaşlı nüfus sebebiyle, demans hastalığı oranının giderek artacağı öngörülmektedir. Global seviyede, demans hastası sayısı 2015 yılında yaklaşık 46,8 milyon olduğu bilinmekle birlikte bu sayıyı 2050 yılında 131,5 milyon olacağı tahmin edilmektedir (3).

Alzheimer hastalığında gözlenen nörodejenerasyon süreci ve patolojisini geliştiren transgenik hayvan modeli olarak 5XFAD üretimi ve genotiplemesini takiben 3, 6 ve 12 aylık olduklarında deneye tabi tutuldu. 5XFAD fare modeli yaşa bağlı motor fenotipi ve hafıza kayıpları, intranöral amiloid beta ( $A\beta$ ) birikimi ve yaşa bağlı aksonla dejenerasyon gösterdiği için Alzheimer çalışmalarında iyi bir *in vivo* model olma özelliğine sahiptir (4). 5XFAD transgenik fareler ve hem cins hem de yaş uyumlu kontrol farelerinin, doğumdan itibaren 3, 6 ve 12'inci aylarda Morris su labirenti davranış deneyleri ve beyin kesitlerinde yapılan  $A\beta$  IHC analizleri ile hastalığın evreleri belirlenmiş ve valide edilmiştir.

Hastalığa özgü patoloji öncesi, gelişim ve patolojik evrelerinin belirlenmesini takiben, alınan beyin kesitlerinden LC-MS/MS ve MALDI Görüntüleme analizleri yapıldı. LC-MS/MS analizi ile doku kesitlerinden elde edilen tüm triptik peptitlerin protein tanımlamaları yapıldı. MALDI Görüntüleme analizi ile doku üzerinde tarama

yapılarak elde edilen m/z değerleri, LC-MS/MS sonuçları ile çakıştırılarak protein tanımlamaları yapıldı. Tüm deneyler sonucunda her gruptaki dokulardan yaklaşık 2000 protein tanımlanmış olup, istatıksel olarak anlamlı ( $p>0,05$ ) ve ekspresyon değişimi minimum 1,2 kat olan proteinler listelenerek, lokasyon bilgileri elde edildi.

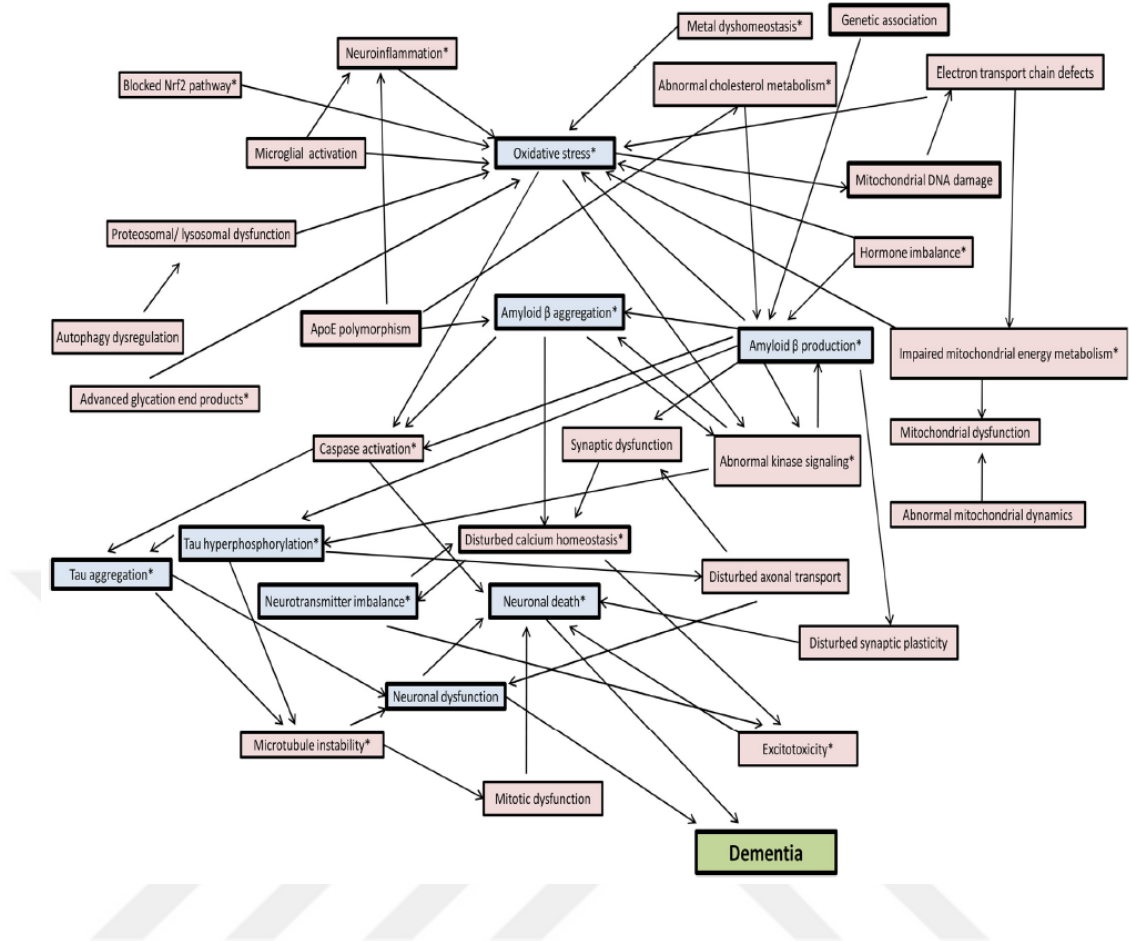


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması

Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar benzer histopatolojik özellikleri paylaşırlar ve hücrel ve bazı ortak moleküler mekanizmalara sahiptirler. Birçok yaş ilişkili nörodejeneratif hastalık beyinde mikroskobik seviyede görülebilir kümeler içerisinde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle ilişkilidir. Fibril yapıları içeren bu kümeler, hastalık spesifik yanlış katlanmış proteinlerden oluşmaktadır. Kümelenmenin rolü halen tartışmalı olsa da yaygın olan hipotez, onların, toksik kümeleneşmiş ara ürünlere karşı hücrenin korunma mekanizmalarını sunmalarıdır. Yanlış katlanmaların bir araya gelerek kümeleneşme eğilimi hastalığın oluşmasında etkili bir patolojidir. Hastalık proteinlerinin yanlış katlanmalarından başka, diğere kalıtsal faktörler bu ailesel yanlış katlanma hastalıklarının başlama yaşını değıştirdiğı sunulmuştur. Alzheimer hastalığı (AH) gibi nörodejeneratif hastalıkların ailesel olmayan formları tipik olarak geç yaşta gelişir. Ailesel olmayan formdaki patogeneş ve protein yanlış katlanmalarının sebebi halen anlaşılmazdır (5).

AH'nin patojenitesi, hücre dışı A $\beta$  peptitlerinin oluşturduğu plaklar, fosforilleneşmiş tau proteinlerini içeren nörofibril düğümler, sinaptik dejenerasyon ve limbik sistem ve neokortekste seçici nöronal ölüm, anormal endozom, lizozom ve mitokondrinin birikimi, glia aracılı inflamasyonu içermektedir (6, 7).



**Şekil 2-1.** Alzheimer hastalığı patojenezi (7)

Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiş en önemli nöropatolojik göstergelerden biri olan A $\beta$  birikimi APP'nin enzimler aracılığıyla proteolizi sonucu oluşmaktadır. Bu mekanizma proteoliz gama sekretaz, beta sekretaz ya da alfa sekretaz enzimleri aracılığıyla nöral aktivite tarafından regüle edilmektedir. Bu enzimlerin APP'yi farklı noktalardan kesmesi sonucu farklı uzunluklarda A $\beta$  peptidi oluşmasına yol açar. Bu mekanizma hasta olmayan kişilerde düzgün işlerken Alzheimer hastalarında A $\beta$  peptit oluşumu daha aktif olmakta ve temizleme mekanizmasında meydana gelen bozukluklarda dolayı birikimine sebep olmaktadır (8-10).

Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiş diğer nöropatolojik gösterge Tau proteindir. Hücre iskeleti proteinlerden olan mikrotübüllerin organizasyonunda görev alan Tau proteini hücre morfolojisinin korunması ve aksonal transport mekanizmalarında dolaylı olarak görevlidir. Tau proteini sentezlendikten sonra hiperfosforilasyona ya da nitrasyona uğradığında AH patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Proteinin modifiye olmuş hali mikrotübüllere bağlanamadığından

kendileriyle etkileşime geçerek agregat oluşumuna sebep olmaktadır (8-10). AH'da olduğu gibi benzer tau lezyonları, diğer birçok nörodejeneratif hastalığın karakteristiği olarak da tanımlanır. Bunlar arasında en iyi bilinenler; progressive supranuklear palsy (PSP), kortikobazal dejenerasyon (CBD) ve Pick's hastalığı (PiD)'dir. Uzun bir süre, nörodejeneratif süreçlerde, tau proteininin varlığını içeren hiçbir genetik kanıt bulunmamasına rağmen, daha sonra frontotemporal bilinç kaybı ve PH'nin ailesel formunda tau gen mutasyonlarının bulunmasıyla bu durum değişmiştir (11).

## **2.2. 5XFAD Transgenik Deney Hayvan Modeli ve Morris Su Labirenti Testi**

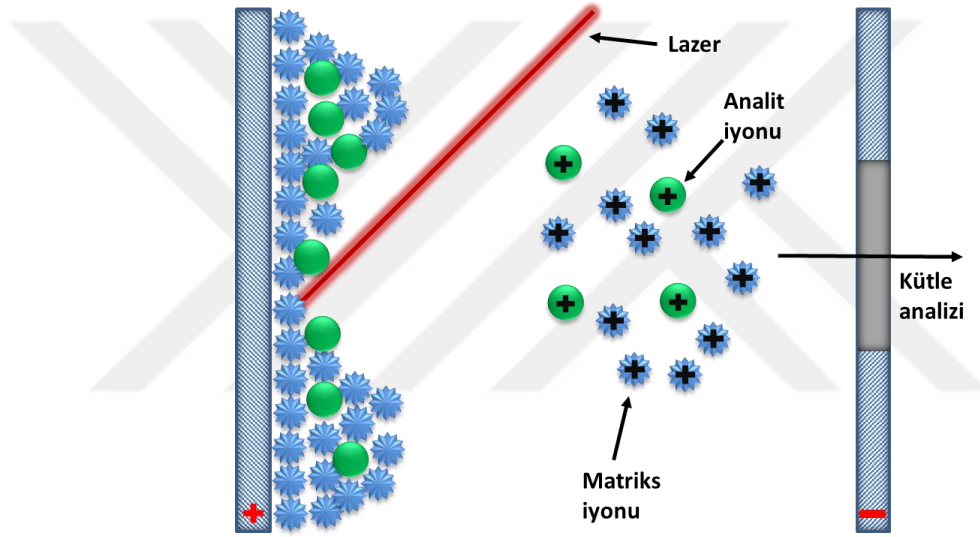
5XFAD fareler kontrol gruplarından farklı olarak, ailevi AH'na neden olduğu bilinen APP(695) (Amyloid Precursor Protein) geni üzerinde Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V) ve London (V717I) ve PS1 (Presenilin) geni üzerinde M146L ve L286V olmak üzere 5 adet mutasyon taşımaktadırlar (4). 5XFAD fareleri AH için patolojik ve davranışsal olarak karakteristik olan amilod plaklarını erken evrede gösterebilen bir modeldir. Özellikle, nörodejenerasyonda gözlenen nöron kaybı ve amiloid plak oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülen intranöral A $\beta$  birikimi 5XFAD farelerinde de görülmektedir. Bu fareler 4-5 aylık oldukları dönemde amilod plakları, intranöral A $\beta$  agregatları ve A $\beta$  oligomerleri de dahil olmak üzere A $\beta$ 'nın farklı formlarını sergileyebilmektedirler. Bu sebeple yapılan Morris su labirenti testlerinde hafıza kaybı gözlenmektedir (12).

Morris su labirenti testi kognitif disfonksiyon değerlendirmesi için Alzheimer hastalığında uygun bir davranışsal testtir. Çalışmamızda uygulanan test, Richard Morris tarafından 1980'li yıllarda oluşturduğu metottan modifiye edilerek (13), alıştırma, öğrenme fazı ve hafıza fazı deneyleri olmak üzere, üç aşamada gerçekleştirildi.

### 2.3. MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi

Matriks tabanlı lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) soft iyonizasyon- tekniği sınıfındadır. Bu özelliğiyle büyük biyomoleküllerin ve büyük organik moleküllerin analizine olanak sağlar. Matrix molekülleri lazerden iyonizasyon için gelen enerjiyi analite aktarır (Şekil 2.2).

- Pozitif iyonizasyon modu:  $M \xrightarrow[\text{Matrix}]{\text{Lazer enerjisi}} [M+H]^+$
- Negatif iyonizasyon modu:  $M \xrightarrow[\text{Matrix}]{\text{Lazer enerjisi}} [M-H]^-$



Şekil 2-2. MALDI iyonlaşması

Matriks moleküllerinin sayısı analit moleküllerine göre çok fazladır, böylece analit molekülleri kolayca ayrılır ve moleküler iyon oluşumunu engelleyen örnek kümelenmeleri önlenir. Matriks aynı zamanda lazer pulsundan gelen enerjinin büyük kısmını absorblamasıyla örneğin bozunmasını en aza indirir ve lazerden analite enerji transferinin verimli olmasını sağlar. Böylece duyarlılık büyük ölçüde artar (14).

MALDI kütle spektrometresinde, biyolojik moleküllerin doku kesitlerinde iyon görüntülemesi ilk kez Caprioli ve ark. 1997 yılında yapılmıştır (15). Bu çalışmadan sonra MALDI görüntüleme tekniğinin geliştirilmesi için daha iyi örnek hazırlama teknikleri, daha yüksek hassasiyetli analizler, yüksek çözünürlüklü görüntülerin eldesi gibi çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalara bağlı olarak kütle spektrometresi cihazlarında

ve örnek hazırlığında kullanılan sprayleme ve inkübasyon cihazlarında da gelişmeler artmıştır (16, 17). Tüm teknik ve yöntemsel gelişmeleri takiben MALDI Görüntüleme yöntemi diğer kütle spektrometresi teknikleri gibi birçok araştırma alanında (biyobelirteç keşfi, ilaç geliştirme vb.) başarılı bir uygulama tekniği haline gelmiştir (18, 19).

MALDI görüntüleme yöntemi doku kesitleri üzerinde gerçekleştirildiğinden elde edilen m/z değerlerinin aynı zamanda doku üzerinde bölgesel bilgisi de elde edilmiş olur. Dokularda biyolojik moleküllerin analizinde yaygın olarak kullanılan LC-MS/MS yöntemi oldukça geliştirilmiş bir yöntem olmasına rağmen doku homojenizatlarından yapıldığı için bölgesel bilgi kaybolmaktadır (20). MALDI görüntüleme yönteminin bölgesel bilgi avantajı olmasına rağmen özellikle protein, peptit analizlerinde deney sonucu elde edilen bilginin anlamlı hale getirilebilmesi için LC-MS/MS yöntemine bağımlıdır. Bu sebeple tez çalışmamızda her iki yöntem koordineli bir şekilde uygulanmıştır.

#### **2.4. Alzheimer Hastalığı ve Proteomik**

Objektif analiz yapabilen yeni proteomik teknikler protein ifade farklılıklarının hesaplanması için gelecek vadetmektedir. Proteomik, büyük örnek gruplarında protein yapı ve fonksiyonu konusunda geniş bilgi verebilecek bir çalışma alanıdır ve giderek daha fazla insan hastalıklarının araştırılması konusunda kullanılmaktadır. Son 15 yıl içerisinde protein ifade farklılıklarının belirlenmesi için proteomik araştırmaları yaygın olarak kullanılmışsa da tanımlanan proteinlerde tutarsızlıklar vardır ve çoğu zaman tanımlanan proteinler hastalığın ileri safhaları ile ilgili olup temelinde yatan patolojiler hakkında kısıtlı bilgi vermektedir. Proteomik analizlerin tutarsız ve tekrarlanabilir olmaması, örneğin heterojenliği ve örnek hazırlamadaki standardizasyonun olmamasının yanında, proteomik cihazların hassasiyetinin az olmasından da kaynaklanmaktadır. Bu nedenle her geçen gün ileri teknolojilere sahip kütle spektrometre cihazları geliştirilmektedir. Bu bağlamda, MALDI ve mikroprob teknolojilerinin birleştirilmesi ile direk doku üzerinde proteinlerin tanımlanması ve lokalizasyonuna ilişkin görüntünün elde edilmesi mümkün kılınmıştır.

AH' ye ilişkin beyin doku kesiti kullanılarak MALDI kütle spektrometre ile gerçekleştirilen birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genelde amiloid plakların

görüntülenmesini hedeflemektedir. Ayrıca, Alzheimer transgenik fare modeli beyin doku kesitlerinde  $\beta$ -amiloid plakların MALDI-MS görüntülemesi gösterilmiştir (21).

Bazı çalışmalarda, spesifik molekül veya peptitlerin beyin bölgelerinde lokalizasyonu gösterilmişse de (22), lipid ve fosfolipid lokalizasyonlarının belirlenmesini amaçlayan çalışmalar yoğunluktadır (23-25).

Literatürde, beyin kesiti üzerinde yapılmış olan total protein profili çıkarmaya yönelik bir analiz üç hastalık içinde henüz yapılmış değildir.



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. DeneY Hayvanlarının Bakımı ve Üretimi**

Tez çalışması süresince gerçekleştirilen hayvan deneyleri Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında Jackson Laboratuvarları'ndan (The Jackson Laboratory, US) temin edilen, AH fare modeli olan 5XFAD transgenik fareleri ve hem cins hem de yaş uyumlu kontrol farelerinin üretimi ve bakımı Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, DeneY Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. DeneY hayvanlarının refahı, ortam parametrelerini kontrol altında tutabilmek ve buldukları ortamdaki izole edebilmek için IVC (Individually Ventilated Cages) kafesler kullanılarak sağlandı.

Alzheimer Hastalığı'nın temel özelliklerini taşıyan transgenik 5XFAD fareler (B6SJL-Tg (APPSwF1L0n, PSEN1\*M146L\*L286V)6799Vas/J)), yeni transgenik farelerin üretilmesi amacıyla, hibrid B6SJL fareleri (B6SJL F1/J) ile çiftleştirildi. Her bir 5XFAD erkek fare, 3-4 adet dişi B6SJL fare ile; dişi 5XFAD farelerde, erkek B6SJL fareler ile üreme kafesine bırakıldı. Çiftleşme ve hamilelik dönemlerinin ardından, tüm hayvanlardan verimli şekilde yavrular elde edildi.

#### **3.2. DeneY Hayvanlarının Genotiplenmesi**

Deneylerde kullanılacak olan hastalık modeli farelerin üretimi sırasında tek batında hem heterozigot transgenik hem de transgenik olmayan (LM- Littermate) yavruların olması nedeniyle, yavruardan doku örneği alınarak genotiplenmesi yapıldı. Gerekli hayvan sayısına ulaşmak için fazla sayıda üretim kafesi oluşturularak, yeni doğanlardan alınan doku örneğinden genotiplenme yoluyla transgenik ve transgenik olmayan kardeşler ayırt edildi. Fare yavruları doğduktan sonra yaklaşık 3 hafta anneye bağımlı yaşadıkları için, genotiplenme incelemesi, doğdukları tarihten 20-21 gün sonra yapıldı. Genotiplenme sonrasında deneY grupları davranış deneyleri için 3,6 ve 12 ay fareleri transgenik ve LM olmak üzere her grupta 10 fare olacak şekilde oluşturulmuştur. Davranış testlerinden sonra LC-MS/MS ve MALDI görüntüleme deneyleri her grupta 3 fare olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Fare yavruları üretim kafeslerinden ayrılarak, isoflurane ile anestezi altına alındı. Yavruların ayırt edilebilmesi için paslanmaz metal kulak küpesi (Harvard Apparatus, USA) sol kulak kepçesine takıldı ve sağ kulak kepçesinden Harris Micro-Punch (Sigma-Aldrich) yardımıyla çapı yaklaşık 2mm olan dokular kesilerek tüplere alındı.

DNA izolasyonu için, genel olarak genotipleme de kullanılan “kirli” DNA izolasyonu yöntemi kullanıldı.

DNA izolasyon basamakları:

- Tüplere alınıp işaretlenen doku örnekleri üzerine 75 ul 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA eklendi.
- PZR cihazı içerisinde 1 saat boyunca 98 °C’de inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrası, örnekler 15°C’ye soğutuldu.
- Nötralizasyon amacıyla tüplere 75 ul 40 mM Tris/HCl (pH=5.5) eklendi.
- 4000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilen örneklerin üst sıvısından 4 ul alınarak, PZR analizinde template DNA olarak kullanıldı.

### 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen total DNA’larda hedef genlerin amplifikasyonu için standart PZR yöntemi kullanıldı.

PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere, kontrol ve mutant hayvanlarda amplifiye olması beklenen internal pozitif kontrol ve mutasyonları taşıyan genlerin amplifikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan primerler Tablo 3-1’deki gibi hedeflenen genlere göre sentezletirildi (Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti.,İstanbul).

**Tablo 3-1.** Deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Baz Dizisi (5' > 3')	Primer Baz Sayısı	T <sub>m</sub> (°C)	Ürün Beklenen Baz Sayısı
Kontrol-Forward	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	24	59,3	324
Kontrol-Reverse	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	25	61,3	324
APP-Forward	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	20	61,4	377
APP-Reverse	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	19	58,8	377
PS1-Forward	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	20	57,3	608
PS1-Reverse	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	20	57,3	608

Liyofilize halde gelen primerler, moleküler ağırlıklarına göre, gerekli miktarda ddH<sub>2</sub>O ile çözüldü ve 100 mM stok solüsyon elde edildi. PZR'u öncesinde, son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde dilue edildi. PZR karışımı, her bir doku örneği için Taq PZR Kiti (NEB, E5000S) yardımıyla hazırlandı. Hazırlanan PZR bileşenleri Tablo 3-2'te ve uygulanan PZR aşamaları Tablo 3-3'teki gibidir.

**Tablo 3-2.** Alzheimer hastalığı modeli hayvan DNA'larının PZR bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Negatif Kontrol	Test Grubu (1 örnek için)
ddH <sub>2</sub> O	9,3	9,2
10x Reaction Buffer	2,4	2,4
dNTP	0,5	0,5
Kontrol-Forward	1,2	1,2
Kontrol-Reverse	1,2	1,2
APP-Forward	1,6	1,6
APP-Reverse	1,6	1,6
PS1-Forward	1,6	1,6
PS1-Reverse	1,6	1,6
Template	4	4
Taq DNA polimeraz	-	0,125
Toplam	25	25

**Tablo 3-3.** PZR aşamaları

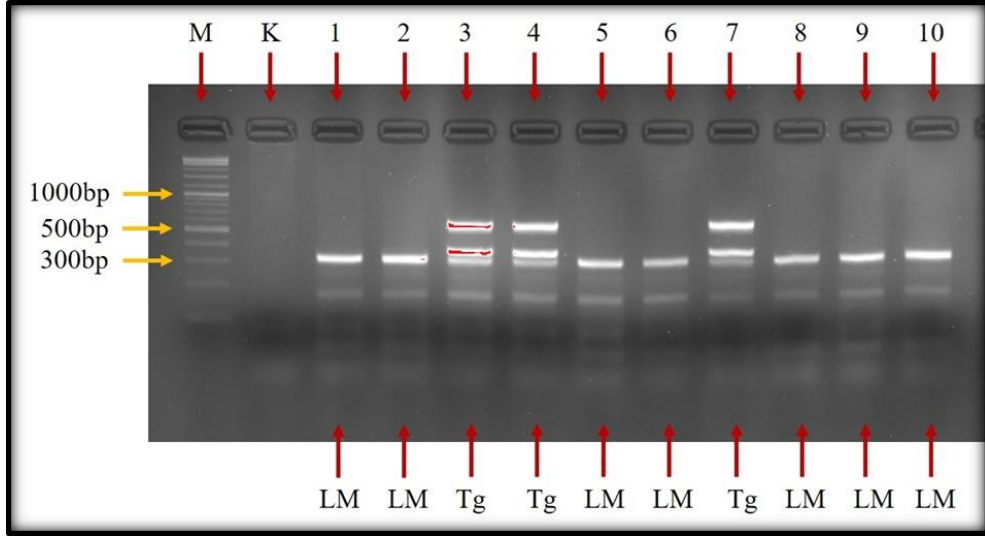
Derece (°C)	Süre (dk)	Döngü
94	3	1
94	00:30	35
57,3	1	
72	1	
72	2	1
10	∞	-

### 3.2.3. Agaroz Jel Elektrofözezi

Deney gruplarını oluşturacak olan transgenik olan ve olmayan farelerin ayırt edilebilmesi için PZR ürünlerinin değerlendirmesi, agaroz jel elektrofözezi yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla kullanılacak olan her bir jel için %3'lük agaroz jelin hazırlanması için 3 gr agaroz, 100 ml TAE tampon çözeltisi içerine karıştırıldı ve mikrodalga fırında 5 dk kaynatıldı. Nükleik asitleri UV ışık altında görünür hale gelebilmesi için 5ul boya (Safeview, ABM) eklendi ve boyanın jel içerisinde homojen dağılması sağlandı. Hazırlana solüsyon jel yürütme kasetine dökülerek, polimerize olması beklenildi.

PZR ürünleri, yükleme boyası ile (6X Gel Loading Dye, NEB B7021-S) ile 1:5 oranında karıştırılarak jele yüklenmeye hazır hale getirildi. Polimerize olan jele sırasıyla, DNA ladder (Quickload 2-log, NEB N0496), kontrol ve test edilecek örneklerden 10 ul yüklendi. Elektrofözezi 80V'da 45 dk'da gerçekleştirildi. ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (BioRad) kullanılarak jel görüntülemesi yapıldı.

AH modeli fareler için, jel görüntüsünde, Şekil 3-1'de gösterildiği gibi, tek bantın olduğu kuyularda yürütülen örnekler transgenik olmayan (LM) hayvanlara aitken, 3 bant gözlemlenen örnekler transgenik hayvanlarına (Tg) aittir.



**Şekil 3-1.** Alzheimer hastalığı modeli hayvan dokularının agaroz jel elektroforezi ile PZR ürünlerinin analizi

(*M*, marker; *K*, kontrol örneği; *LM*, transgenik olmayan fare; *Tg*, transgenik fare)

Genotiplenmesi yapılan hayvanlar, PCR sonuçlarına göre, dişi-erkek; transgenik-transgenik olmayan şekilde farklı kafeslere ayrılmıştır.

### 3.3. Morris Su Labirenti Davranışsal Testi

Kognitif disfonksiyon değerlendirmesi için AH fare modelinde uygulanan Morris su labirenti, Richard Morris tarafından 1980'li yıllarda oluşturulan metottan modifiye edilerek (Morris R.G.M., 1981), alıştırma, öğrenme fazı ve hafıza fazı deneyleri olmak üzere, üç aşamada gerçekleştirildi. Uygulanan testin özet bilgisi Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

**Tablo 3-4.** Morris su labirenti deney planı

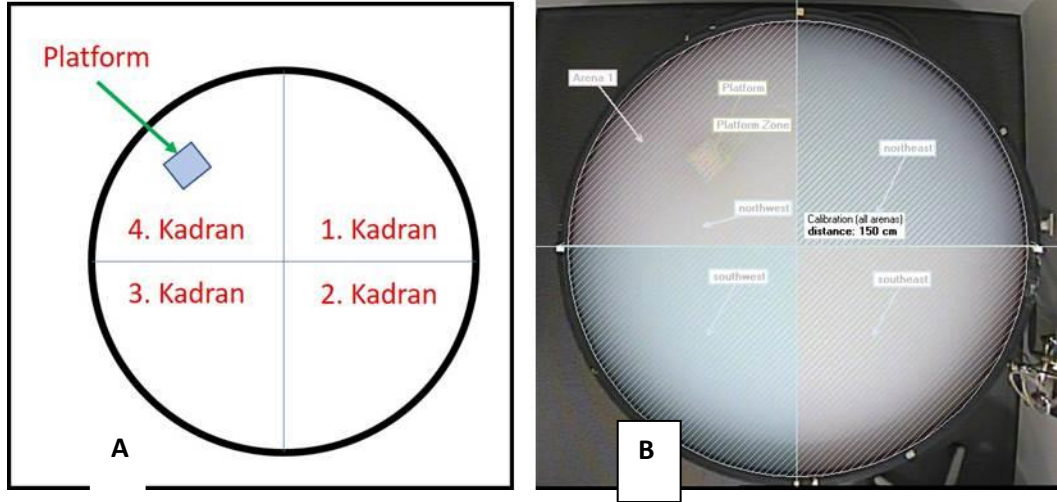
<b>Testin Uygulandığı Günler</b>	<b>Test Fazı</b>	<b>Testin Uygulaması</b>	<b>Test Aşamasından Beklenenler</b>
0.gün	Alıştırma	Platformsuz tankta 120 sn yüzdürme	Yüzme kabiliyetlerinin geliştirilmesi
1, 2, 3 ve 4. Gün	Öğrenme	Platformun bulunduğu tankta en fazla 120 sn yüzdürme. Platform bulunmadığı durumda 30 sn platform üzerinde bekletme	Farelerin görebileceği şekilde duvarlara asılan farklı renk ve şekillerdeki objelere göre, platform yerini hafızaya almaları
5.gün	Hafıza	Platformsuz tankta 60 sn yüzdürme	Farelerin boşluksal (uzaysal) bellek ölçümü için, platform havuzdan çıkarılarak, farelerin platformu aramalarının sağlanması

Deneyler için 144 cm çapı olan tank kullanıldı ve 230 cm yukarıya, bilgisayar sisteminde EthoVision XT 9 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) programına bağlı kamera sistemi kuruldu. Deney düzeneğinin bulunduğu odaya uygulamalar süresince değişmeyecek ve farenin görebileceği yerlerde olacak şekilde farklı renk ve şekillerde işaretler asıldı.

Deneylere başlamadan önce, doldurulan suyun sıcaklığı 22-24°C'ye ayarlandı. Fareler, deney düzeneğinin bulunduğu odaya 30 dk önce getirilerek, buldukları ortama uyumları sağlandı ve deneylere yaklaşık olarak günün aynı saatinde başlandı.

Deney protokolüne göre testi başlangıç günü 0. gün olarak kabul edildi ve farelere, 120 sn sadece yüzme alıştırmaları yapıldı. İlk denemede yüzemeyen fareler, 20 dk dinlendirildikten sonra tekrar yüzdürüldü. Bu denemelerde başarısız olan ve batma tehlikesi yaşayan fareler grup dışı bırakıldı.

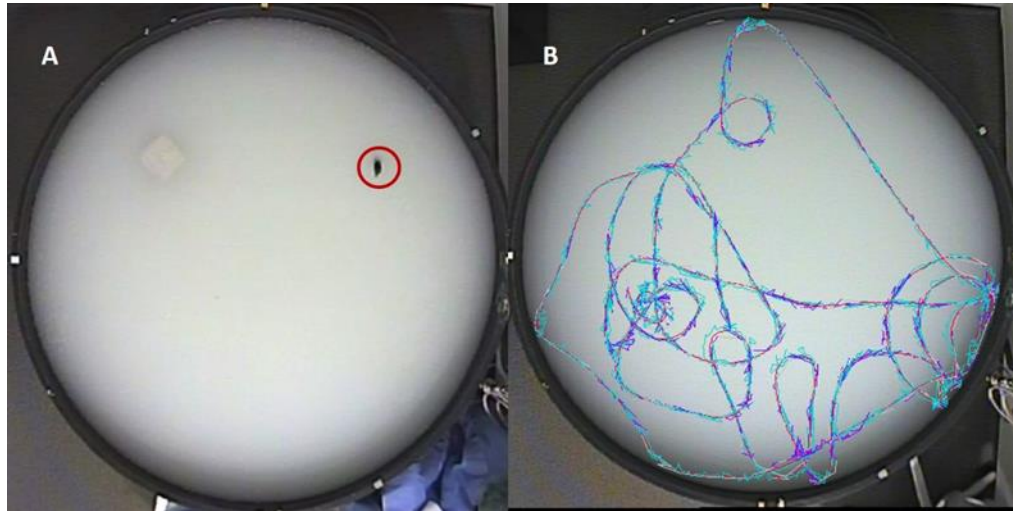
Öğrenme fazını oluşturan 1, 2, 3 ve 4. günlerde tank dört kadrana (kuzey, güney, doğu, batı) bölündü ve kadranslardan birine suyun 1 cm altında kalacak şekilde, yüksekliği 30 cm ve yüzey alanı 10 cm<sup>2</sup> olan platform konuldu (Şekil 3-2).



**Şekil 3-2.** Morris su labirenti tankının kadrant ve platform pozisyonları

A. Şematik olarak gösterilen su tankında 1, 2, 3 ve 4. kadrantlar kuzey, güney, doğu ve batı kadrantlarını temsil etmektedir. B. EthoVision XT 9 programı ile su tankı, deney planına uygun olarak düzenlenmekte ve kalibre edilmektedir.

Su içerisine süt tozu karıştırılarak suyun rengi beyaz hale getirildi ve hem farelerin platformu görmesi engellendi hem de koyu renkli olan farelerin kamera tarafından görülmesi kolaylaştırıldı (Şekil 3-3). Daha az sayıda olan açık renkli fareler ise toksik etkisi olmayan siyah boya ile boyadı.



**Şekil 3-3.** EthoVision XT 9 programı ile kamerada fare görünürlüğünün kontrolü

A'da süt tozu ile beyaz renge boyanan suda farenin (kırmızı çember içerisinde) kamera tarafından görünürlüğü, B'de gösterildiği şekilde oluşturulan fare izleme işaretleriyle kontrol edildi.

Deney protokolüne göre fareler 1. kadrandan başlayarak sırasıyla her bir kadrandan 20 dk ara ile suya bırakılarak, 120 sn yüzdürüldü ve duvara asılan şekillere göre gizli platformu bulmaları beklendi. 120 sn içinde platformu bulamayan fare, araştırmacı tarafından sudan alınıp platform üzerine bırakıldı ve 30 sn platform üzerinde bekletilerek etrafını görmesi sağlandı. Farelerin her bir kadranda yüzdürüldükten sonra, diğer kadrana test edilmek üzere bırakılmadan önce kuruması beklenildi. Bu fazda farelerin platformu bulma süresi ölçüldü ve dört ayrı kadrandan elde edilen verilerin ortalamaları alındı.

Hafıza fazını oluşturan 5. günde ise farelerin boşluksal bellek fonksiyonları incelendi. Bu fazda deney düzeneğinde platform su tankından çıkarıldı ve fareler daha önce platformun bulunduğu kadranın (4. kadrana) karşısındaki kadrandan (2. kadrana) suya bırakılarak 60 sn yüzdürüldü ve platformun bulunması gereken 4.kadranda ne kadar vakit geçirdiği ölçüldü.

### **3.4. Beyin Dokularının Eksizyonu, Saklanması ve Beyin Kesitlerinin Alınması**

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

Beyin doku kesiti bölgeleri, Paxinos ve Franklin' in beyin atlası ("The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates") referans alınarak seçildi. Dokular cryostat (Thermo) yardımıyla, immunohistokimya için Poly-L-Lysine (PLL) kaplı cam lamalar (Thermo) üzerine 18 µm, LC-MS/MS analizleri için Lo-Bind 1,5 ml'lik eppendorf tüplere 10 µm ve MALDI görüntüleme kütle spektrometresi (MALDI IMS) deneyleri içinse, PLL kaplaması yaptığımız, Indium tin oxide (ITO) Glass Slide (Bruker, #8237001) üzerine 8 µm'lik koronal kesitler alındı.

İmmunohistokimya için alınan kesitlerin fikse olması amacıyla, lamalar 30 dk boyunca 40°C'de ısıtıcı üzerinde inkübe edildi.

ITO lamalar, kesit alınmadan önce cryostat içerisine yerleştirilerek soğutuldu. Doku kesiti alınarak fırçalar yardımıyla kıvrılması engellenecek şekilde ITO lam yüzeyine taşındı, dokunun kıvrılmayacağından emin olduktan sonra el üzerinde yaklaşık 30sn beklendi ve dokunun tamamen kuruyarak lama yapışması sağlandı.

### 3.5. İmmünohistokimya Boyaması

Fare modelinin, hastalık patolojisi immünohistokimya deneyleri ile Anti-beta-Amiloid, 17-24 antikoru (BioLegend, 800710) 1:500 kullanılarak gösterildi.

Deneyde kullanılan kit: Vectastain Kit (PK 7800)

DAB Solüsyonu Hazırlama: 5 mL dH<sub>2</sub>O içerisine 2 damla Buffer Stok Solüsyonu eklenerek vortex yapıldı. Üzerine 4 damla DAB Stok Solüsyonu eklenerek vortex yapıldı. Son olarak 2 damla Hydrogen Peroxidase Solüsyonu eklenerek vortex yapıldı.

İmmünohistokimya ile boyanacak kesitler, boyama öncesinde kuruması için 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, %4 paraformaldehit çözeltisi içerisinde 15 dk çalkalanarak inkübe edildi. PFA inkübasyonu sonrasında, PFA'nın tamamen uzaklaştırılması için lamaların dizili olduğu şale yatağı değiştirilerek 5 dk su ile ardından 3 kere de 5'er dk 100 rpm'de PBS içerisinde çalkalandı. Doku etrafındaki fazla PBS süzülerek hidrofobik kalem ile doku çevresi çizildi ve nemlendirilmiş bir kutu içerisinde, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 10 dk blok solusyonu ile inkübe edildi. Blok solusyonu olarak, kit içerisindeki 1'inci solüsyon yani "Horse serum" %1,5 olacak şekilde PBS ile her deney için taze olarak hazırlandı. Bloklama işleminden sonra herhangi bir yıkama olmaksızın primer antikor ile muamele edildi. Primer antikorlar, %1,5 horse serum içeren PBS içerisinde kendilerine özgü oranda seyreltilerek Alzheimer ve Parkinson hastalığı için kullanılan antikorlar 4°C'de gece boyu, Huntington hastalığı için kullanılan antikor 24 saat inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonunu takiben, 5 dk PBS içerisinde yıkandı. Kit içerisindeki 2'inci solüsyon (Biotinylated-biyotinlenmiş) ile nemlendirilmiş bir kutu içerisinde, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 5 dk PBS ile yıkama yapıldı. Kit içerisindeki 3'üncü solüsyon (Streptavidin/Peroxidase) dokuların üzerini kapatacak şekilde 2 damla damlatıldı ve nemlendirilmiş bir kutu içerisinde, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 5 dk inkübe edildi. İnkübasyonunu takiben, 5 dk PBS içerisinde yıkandı. Doku üzerine 30 µl DAB solüsyonu eklendi ve 5-7 dk bekletildi. Yeterli derecede renklenme gerçekleştiğinde, reaksiyonu durdurmak için, lam soğuk PBS'e daldırılıp çıkartıldı ve kurutuldu. Doku kesiti üzerine 'Mounting medium' damlatıldı ve lamel ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde doku kapatıldı.

### 3.6. Beyin Doku Kesitlerinden Protein Ekstraksiyonu, Peptid Eldesi ve nanoLC MS/MS Analizi

MALDI görüntüleme yöntemi ile yapılan peptit analizleri sonrasında protein tanımlaması yapılamadığından destekleyici yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple, çalışmamızda doku kesitlerinin LCMSMS analizi MALDI görüntüleme çalışmalarında doku kesitinden elde edilen m/z değerlerinin karşılaştırılması için gereklidir ki bu aşama protein tanımlamasını mümkün kılmaktadır. İkinci amaç ise LC-MSMS ve MALDI görüntüleme metotlarında istatistiksel olarak anlamlı değişen protein sayılarının karşılaştırılmasıdır.

MALDI görüntüleme yöntemi için alınan beyin kesitlerinin hemen ardından nanoLC MS/MS analizi için alınan beyin kesitleri protein ekstraksiyonu için Universal Protein Extraction (UPX) Kit (Expedeon) ile karıştırılarak 4x10 sn döngü ve döngüler arası 30 sn buz üstünde soğutma yapılacak şekilde sonike edildi. Sonikasyon ardından örnekler buz üstünde bekletilerek soğutuldu ve 95°C'de 10 dk bekletildi. +4 °C'de bir saat soğumaya bırakılan örnekler, 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant alınarak, örnekler yeni tüplere aktarıldı.

Peptit eldesi FASP Protein Digestion Kit (Expedeon) kullanılarak yapıldı.

#### FASP Protein Digestion Kit Solüsyonları:

- Üre Solüsyonu (6M): 1 tüp içerisindeki üreye 1 mL Tris Hidroklorid Solüsyonu eklenerek çözüldü.
- 10X İyodoasetamid Solüsyonu (100mM): 1 tüp IAA, 100 µL üre solüsyonu ile çözüldü.
- Digestion Solüsyonu: 20 µg tripsin (Promega), 1000 µL 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözüldü.

Örnek 200 µL üre solüsyonu ile karıştırılarak 30 kDa cut-off kolonlara transfer edildi ve 14.000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Bu işlem toplam 2 defa tekrar edildi. Alt tüpe geçen solüsyon boşaltıldı. 10 µL 10X IAA solüsyonu ve 90 µL üre solüsyonu kolonlara eklendi, ısı bloğunda 1000rpm'de oda sıcaklığında 1dk çalkalandı ve örnekler 20 dk karanlıkta inkübe edildi. Örnekler 14.000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Kolonlara 100 µL üre solüsyonu eklenerek 14.000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa tekrar edildikten sonra alt tüpe geçen solüsyon boşaltıldı. Kolonlara 100

$\mu\text{L}$  50 mM amonyum bikarbonat eklenerek 14.000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa tekrar edildi. Kolonlara 50  $\mu\text{L}$  digestion solüsyonu eklendi. Örnekler ısı bloğunda, 1000 rpm'de ve oda sıcaklığında 1dk karıştırıldıktan sonra gece boyu (~16-18 saat) 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Kolonlar temiz ependorflara transfer edildi ve örneklerin üzerine 40  $\mu\text{L}$ , 50 mM amonyum bikarbonat eklenerek 14.000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 defa tekrar edildi. Kolonlara 50  $\mu\text{L}$  NaCl solüsyonu eklenerek 14.000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Alt tüpe geçen peptidler Proten-LoBind tüplere alındı ve peptid konsantrasyonu Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo) ile ölçüldü. Örneklerin son konsantrasyonu 200 ng/ $\mu\text{L}$  olacak şekilde %0,1 formik asit ile dilue edildi ve cihaza uygun tüplere aktarıldı.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS QToF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapıldı. Metod SONAR ve sensitivite moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlandı. Asetonitril %5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı. Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki fareye ait protein sekans bilgisi kullanıldı. ProgenesisQI yazılımı kullanarak ekspresyon farklılıklarının istatistiksel analizi yapıldı.

### **3.7. Beyin Doku Kesitlerinde MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Analizi**

MALDI görüntüleme için yapılan deneyler genel olarak, doku kesitlerinin hazırlamasından sonra endojen bileşiklerin ortamdan arındırılması için yıkama, doku üzerinde peptit eldesi için tripsinizasyon, dokuların yüzeyinin matrix ile kaplanması ve son olarak MALDI TOF/TOF (Bruker, rapiflex) cihazında analiz basamakları şeklindedir. Tüm deney setlerinden elde edilen dokuların MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi'ndeki analizleri aşağıdaki başlıklar altında açıklandı.

#### **3.7.1. ITO Slaytların Poly-L-Lysine Solusyonu ile Kaplanması**

Poly-L-Lysine solüsyonu (Sigma-Aldrich) 1:1 oranda dH<sub>2</sub>O ile dilue edilir ve 1:1500 oranında Igepal CA-630 (Sigma) eklenir. Hazırlanan solüsyondan 20 µl ITO lam üzerine damla şeklinde bırakılır. Cam karıştırıcı yardımıyla lam üzerindeki damla ince bir tabaka şeklinde yayılır. Lam ısıtıcı üzerinde 80°C'de 10-15 dk kurumaya bırakılır.

#### **3.7.2. Dokuların Yıkaması**

MALDI IMS'de, yıkama prosedürü on-tissue digestion ile elde edilen peptidleri gölgeleyen tüm endojen bileşikleri ortadan kaldırmak için uygulanır.

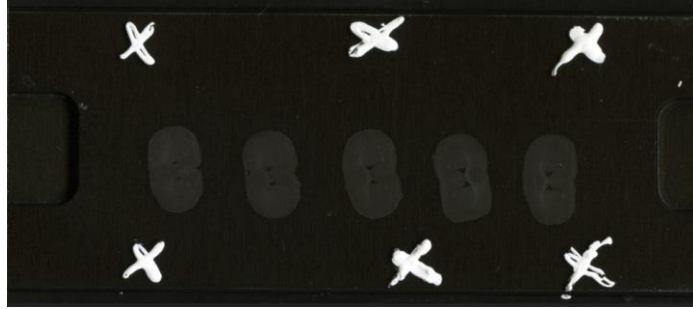
Tüm kesitler alındıktan sonra ITO lamlar desikatörde 45 dk bekletildi. Yıkama aşamasında örnekler Coplin jar'a alındı. Yıkama aşama ve süreleri; %70 etanolde 30 saniye, %100 etanolde 30 saniye, Carnoy solüsyonunda (Etanol:kloroform:asetik asit 6:3:1) 2 dakika, %100 etanolde 30 saniye, %0.2 TFA'lı H<sub>2</sub>O'de 30 saniye, %100 etanolde 30 saniye, 50mM amonyum bikarbonatta 30 saniye, %100 etanolde 30 saniye şeklindedir. Yıkama aşaması tamamlandıktan sonra lamlar tekrar desikatörde bekletildi.

### 3.7.3. Tripsinizasyon

Tripsin enzimi (Trypsin Gold, MS Grade, Promega) 100 ng/μl konsantrasyonda olacak şekilde, 50 mM amonyum bikarbonat ile çözüldü. Tripsin enzimi çözeltisi doku bulunan lam üzerine SunCollect Sprayer (SunCrom) ile nuzzle yüksekliği(z) 30 mm, akış hızı 10 μl/dk ve 8 döngü olacak şekilde püskürtüldü. Tripsin uygulamasını takiben, SunDigest (SunCrom) cihazında 50°C'de %100 nemlilik oranında 2,5 saat inkübasyona bırakıldı.

### 3.7.4. Matriks Uygulaması

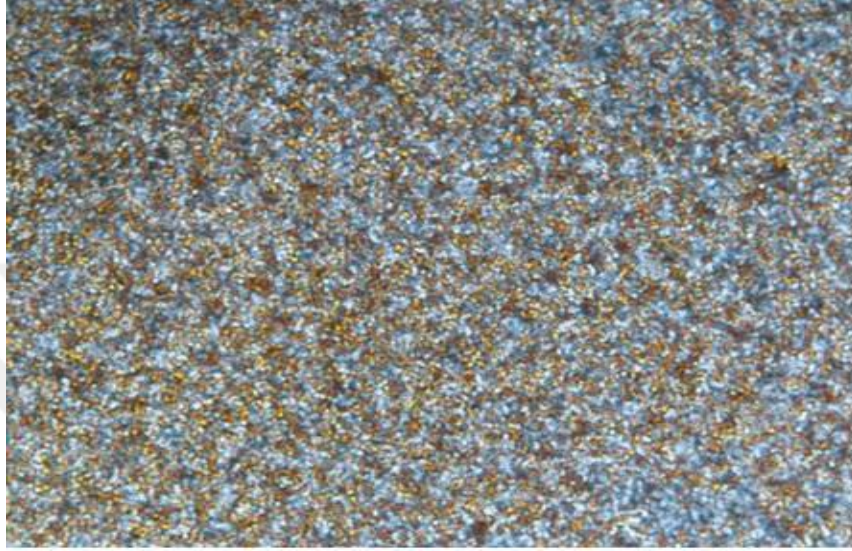
MALDI TOF/TOF cihazında lam üzerinde istenen bölgelere lazer atışı yapabilmesi için, lamın lokalizasyon bilgisinin cihaza tanıtılması gerekmektedir. Bu sebeple lama matriks kaplaması yapılmadan önce, organik solventte çözülmeyen bir işaretleyiciyle lam işaretlenerek, yüksek çözünürlükteki bir tarayıcı ile 4800 dpi'da tarandı (Şekil 3-4). Dijital ortama alınan lam görüntüsü, MALDI TOF/TOF bilgisayarına aktarıldı. FlexImaging programı aracılığıyla ve lam üzerindeki X işaretleri kullanılarak, cihaz kontrolünü sağlayan FlexControl programına lamın lokalizasyon bilgisi tanıtıldı.



**Şekil 3-4.** ITO lamaların tarayıcı ile görüntülerinin alınması

Yapılacak MALDI görüntüleme uygulamasında peptit analizi yapılacağından uygun matriks olarak  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) kullanıldı. CHCA, 7mg/ml konsantrasyonda %50 asetonitril (ACN) ve %0,1 Trifluoroasetik asit (TFA) içerisinde, kısa bir vorteks işlemi sonrası, 30 dk sonik banyoda çözdürüldü.

Matriks uygulaması, tripsinizasyon işlemi uygulanan lam üzerine SunCollect (SunChrom) cihazı yardımıyla, z pozisyonu 20 mm olacak şekilde, 10 µl/dk, 20 µl/dk, 30 µl/dk, 40 µl/dk püskürtme hızları sırasıyla uygulandı ve matriks görüntüsü mikroskopta kontrol edildi (Şekil 3-5). Matriks uygulanan lam kütle spektrometresi cihazında analiz edilmek üzere, cihaz hazırlığı yapılanaya kadar desikatörde bekletildi.



**Şekil 3-5.** CHCA matriksinin kristalizasyonu

Matriks uygulamasında dikkat edilecek en önemli iki parametre ekstraksiyon ve difüzyondur. Bunun için matriks partiküllerinin homojen dağılmasına ve püskürtme sırasında lam üzerinde oluşan ıslaklığa oldukça dikkat edilmelidir.

### **3.7.5. MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Analizi**

MALDI görüntüleme analizleri kurumumuzda bulunan Bruker rapifleX MALDI TOF/TOF cihazında yapıldı. Bu cihaz FlexControl programı ile kontrol edilmektedir. Analizler sırasında cihazın ayarları için MTP 384 polished steel target (Bruker), ITO lamalar için de MTP Slide Adapter II (Bruker) kullanıldı.

Örneklerin analizine başlamadan önce, cihazın iyon source temizliği, optik ve lazer ayarları, dedektör kontrolü ve kalibrasyonu kontrol edilerek gerekli ayarlamalar her analiz öncesi yapıldı. Cihazın kalibrasyonunda “Peptide Calibration Standard II” (CARE Products, Bruker) kullanıldı. İçeriğindeki peptitler Tablo 3-5’te gösterildi.

Kalibrantın ticari olarak gelen bir tüpü 125 µl %0,1 TFA ile kısa bir vorteks işlemi ile çözüldü. Sürekli dondurup çözme işlemlerinden zarar görmemesi için 2 µl'lik alikotlara bölündü.

**Tablo 3-5.** Peptide Calibration Standard II içeriği

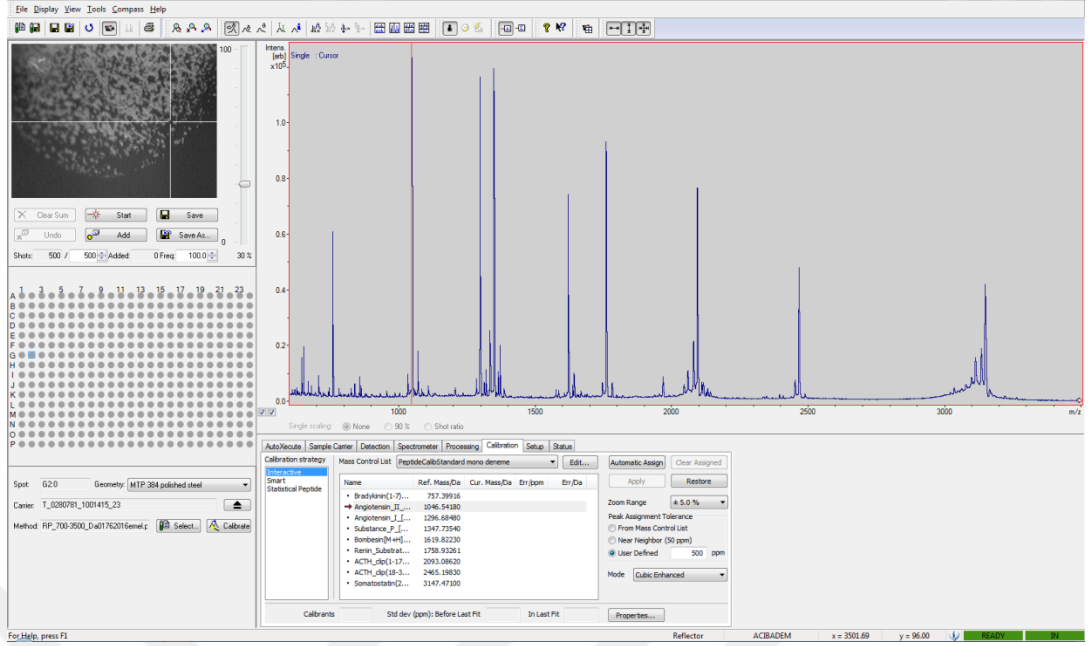
Yapılan analizler 700-2600Da aralığından olduğundan kullanılan standart peptidleri de bu aralıkta seçilmiştir.

Peptit	[M+H] <sup>+</sup> Mono izotopik	[M+H] <sup>+</sup> ortalama
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

Kalibrasyon işlemi için MTP 384 polished steel target kullanıldı. Target üzerinde kuyucuklara 1 µl Peptide Calibration Standard II pipetlenerek kurutuldu. Üzerine CHCA matriksi konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlandı, 1 µl pipetlendi ve kuruması beklendi.

FlexControl programında kullanılacak olan metod reflector modda, 700-2600 Da şeklinde ayarlandı. Bu metod hem kalibrasyon hem de örnek analizleri için kullanıldı.

FlexControl'de metod seçildikten sonra 'Calibration' sekmesine gelerek arka arkaya lazer atışı yapıldı. Metodta hata aralığı 10/-10(Err/ppm) olarak alınarak kalibrasyon yapıldı (Şekil 3-6.).



**Şekil 3-6.** MALDI TOF/TOF cihazının kalibrasyonu

Cihazın tüm ön ayarlamaları yapıldıktan sonra lamlar “MTP Slayt Adaptor II” adaptörüne yerleştirilerek cihaza verildi. FlexImaging programıyla lam üzerindeki bölgeler FlexControl’e tanıtılarak analiz başlatıldı.

MALDI görüntüleme analiz sonuçlarının nanoLC MS/MS analizi sonuçları ile karşılaştırılabilmesi için FlexAnalysis Batch Process programı ile ham datalar tekrar kalibre edildi ve ImageID ve SCiLs Lab programları kullanılarak sonuçlar karşılaştırıldı.

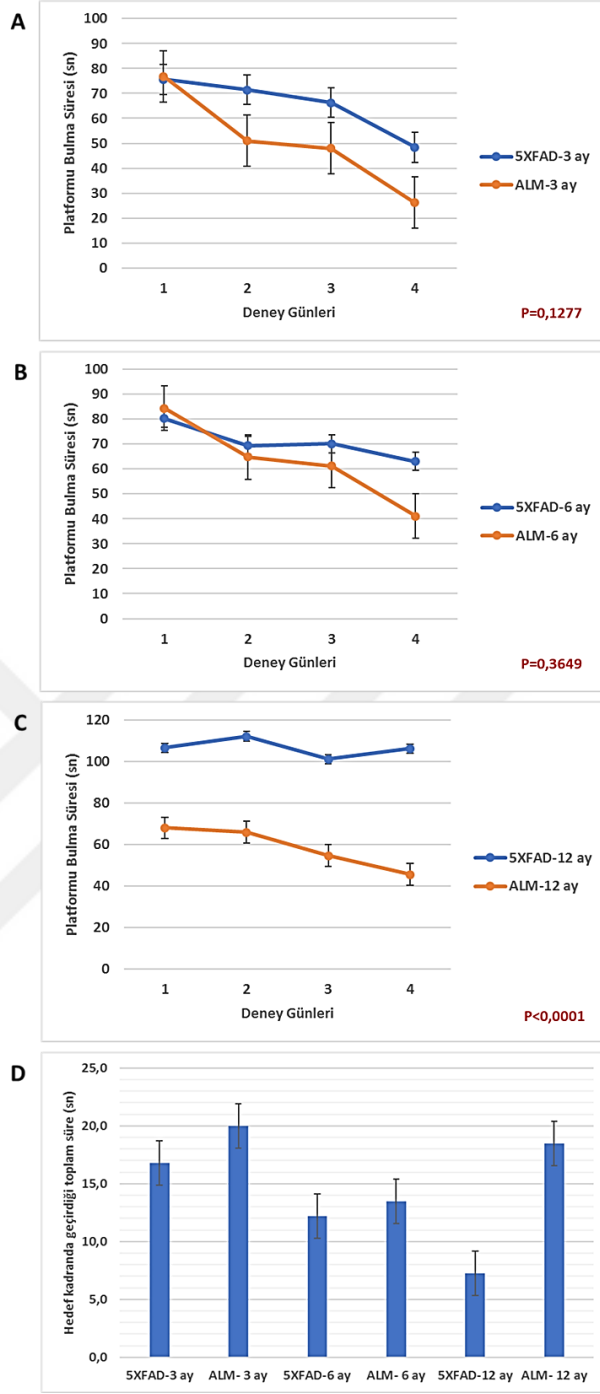
Sonuçların değerlendirilmesi için FlexImaging ve SCiLs Lab (Bruker) programları kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. 5XFAD Farelerin Morris Su Labirenti Testi Sonuçları

Alzheimer hastalığı fare modelinin kontrolü için planlanan Morris su labirenti davranış testinin değerlendirmesinde, gruplar arası karşılaştırma student t-test ile gerçekleştirildi. Grup içi değişim ise tek yönlü varyans analizi kullanılarak yapıldı.  $p<0,05$ 'in altında kalan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. 3, 6 ve 12 aylık hayvanların, grup arası karşılaştırmaları için, ilk 4 gün boyunca platform ulaşma süresi (Şekil 4-1) ve platformun kaldırıldığı deneyin son günü olan hafıza fazında hedef kadranın bulunduğu alandan geçme süresi (Şekil 4-1.D) parametreleri kullanıldı.

Alzheimer hastalığı fare modelinin Morris su labirenti sonuç grafikleri, Şekil 10.A-D'de gösterildi. 3 aylık farelerde bilişsel bozukluğun erken dönemi olduğundan 4'üncü günde öğrenme fazındaki farklılık azalmaktadır (Şekil 4-1.A). 6 aylık 5XFAD fare modeli amiloid beta plak oluşumundaki artışa paralel olarak 3 aylık fare modelinden farklılaşmaya başlamıştır (Şekil 4-1.B). 6 aylık 5XFAD grubunda platformu bulma süreleri artış göstermektedir. 12 aylık 5XFAD fare modelinde kontrole karşılık büyük fark gözlemlenmiştir (Şekil 4-1.C). 5XFAD modelinde platformu bulma süresi kontrole nazaran iki kat artmıştır. Aynı şekilde deney gruplarının 5'inci gününde hedef kadranda geçirilen sürelerine bakıldığında en büyük farkın 12 aylık grupta olduğu görülmektedir.

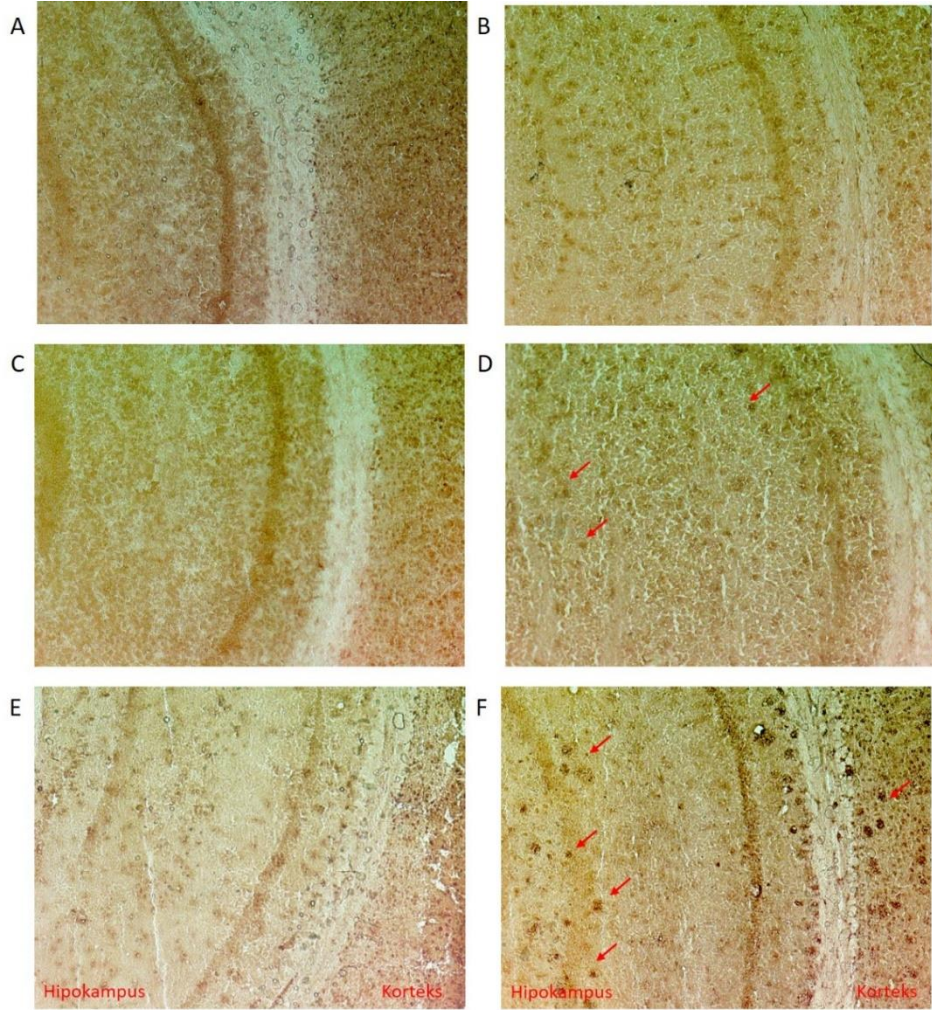


**Şekil 4-1.** Alzheimer hastalığı modeli farelerinde Morris su labirenti davranış testi öğrenme ve hafıza sonuçları

A) 3 aylık kontrol (ALM) ve transgenik (5XFAD) deney grupları öğrenme fazı sonuçları B) 6 aylık kontrol (ALM) ve transgenik (5XFAD) deney grupları öğrenme fazı sonuçları C) 12 aylık kontrol (ALM) ve transgenik (5XFAD) deney grupları öğrenme fazı sonuçları D) 3, 6 ve 12 aylık kontrol (ALM) ve transgenik (5XFAD) deney grupları hafıza fazı sonuçları

#### 4.2. 5XFAD Farelerin Beyin Kesitlerinin İmmünohistokimya Boyaması

Alzheimer hastalığı fare modeli beyin dokularında yapılan immunohistokimya sonuçlarına göre amiloid-beta birikiminin görüntülenmesi Şekil 4-2’de gösterildi. 3 aylık dönemde kontrol ve deney grupları arasında belirgin fark gözlenmedi (Şekil 4-2.A-B). 6 aylık (Şekil 4-2.C-D) ve 12 aylık (Şekil 4-2.E-F) dönemlerde ise plak artışı görülmektedir.



**Şekil 4-2.** Alzheimer hastalığı fare modeli beyin dokularında (hipokampus) IHC ile amiloid-beta proteininin görüntülenmesi

- A) AH fare modeli 3 aylık kontrol grubu B) AH fare modeli 3 aylık transgenik grubu  
C) AH fare modeli 6 aylık kontrol grubu D) AH fare modeli 6 aylık transgenik grubu  
E) AH fare modeli 12 aylık kontrol grubu F) AH fare modeli 12 aylık transgenik grubu

### 4.3. 5XFAD Fare Beyin Dokularının nanoLC MS/MS Analizi Sonuçları

Doku kesitlerinden yapılan LC-MS/MS analizleri sonucunda, toplam 2175 protein tanımlanmıştır. İstatistiksel testler sonucu, ekspresyonu hasta grubunda kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde değişen ( $p < 0,05$ ) proteinlerin sayısı 372'dir.

5XFAD Alzheimer hastalığı transgenik fare modelinde toplam 2175 protein tanımlanmış olmasına rağmen 3'üncü ay beyin kesitlerinde gerçekleştirilen LC-MS/MS protein ekspresyon çalışmasında 18 istatistiksel olarak anlamlı değişen protein saptanmıştır (Tablo 4-1).

**Tablo 4-1.** Alzheimer 5XFAD fare modeli 3 ay beyin kesiti LC-MS/MS analiz sonuçları

Oran: ALZ / ALM

Erişim Numarası	p-değeri	Oran	Protein Tanımı
Q3UHA3	0.001	1.41	Spatacsin
Q9CYZ2	0.002	1.87	Tumor protein D54
Q7M6Z4	0.004	1.30	Kinesin-like protein KIF27
Q99MR8	0.013	1.44	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha_mitochondrial
Q8BGZ7	0.017	1.35	Keratin_type II cytoskeletal 75
Q9DB73	0.039	1.64	NADH-cytochrome b5 reductase 1
E9Q6P5	0.046	2.01	Tetratricopeptide repeat protein 7B
P20612	0.048	1.41	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1
P50171	0.004	0.83	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8
Q8R4C2	0.005	0.73	RUN and FYVE domain-containing protein 2
Q9JMH6	0.017	0.76	Thioredoxin reductase 1_cytoplasmic
P70195	0.022	0.27	Proteasome subunit beta type-7
Q60829	0.028	0.60	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B

**Tablo 4-1.** Alzheimer 5XFAD fare modeli 3 ay beyin kesiti LC-MS/MS analiz sonuçları (devamı)

Q8CA95	0.040	0.69	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3'_5'-cyclic phosphodiesterase
Q3UGC7	0.041	0.62	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A
P40240	0.042	0.82	CD9 antigen
Q9JHD1	0.044	0.83	Histone acetyltransferase KAT2B
Q9DBF1	0.044	0.81	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase

Alzheimer hastalığı 5XFAD transgenik fare modelinde 6'ncı ay doku kesitlerinden elde edilen triptik peptitlerin LC-MSMS analizi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı protein farklılığı bulunamamıştır. 5XFAD Alzheimer hastalığı transgenik fare modelinde toplam 2175 protein tanımlanmış ve 12'inci ay beyin kesitlerinde gerçekleştirilen LC-MSMS protein ekspresyon çalışmasında 77 istatistiksel olarak anlamlı değişen protein farklılığı bulunmuştur (Tablo 4-2).

**Tablo 4-2.** Alzheimer 5XFAD fare modeli 12 Ay beyin kesiti LCMSMS analiz sonuçları

Oran: ALZ / ALM

Erişim Numarası	p-değeri	Oran	Protein Tanımı
P28738	0.0005	1.21	Kinesin heavy chain isoform 5C
Q62167	0.0008	1.92	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
Q9D4J1	0.001	1.21	EF-hand domain-containing protein D1
P60202	0.001	1.25	Myelin proteolipid protein
Q8R4C2	0.0024	1.31	RUN and FYVE domain-containing protein 2
P54726	0.0024	1.20	UV excision repair protein RAD23 homolog A
Q99KK7	0.0045	1.25	Dipeptidyl peptidase 3
Q61016	0.0087	1.26	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7
Q9CR95	0.0092	1.20	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1

**Tablo 4-2.** Alzheimer 5XFAD fare modeli 12 Ay beyin kesiti LCMSMS analiz sonuçları (devamı)

Q00898	0.0155	1.97	Alpha-1-antitrypsin 1-5
Q8R0S2	0.019	1.22	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1
P01831	0.0199	1.23	Thy-1 membrane glycoprotein
Q9DAC9	0.0222	1.47	POU domain_ class 5_ transcription factor 2
Q8CG50	0.0243	1.36	Ras-related protein Rab-43
Q8BGX2	0.0314	1.21	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim29
P01864	0.0366	1.67	Ig gamma-2A chain C region secreted form
Q9JKD3	0.0379	1.23	Secretory carrier-associated membrane protein 5
O35310	0.0411	1.64	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 1
Q9D5K4	0.0476	1.73	S100P-binding protein
Q61411	0.0001	0.74	GTPase HRas
Q8BU31	0.0002	0.77	Ras-related protein Rap-2c
Q9R118	0.0003	0.22	Serine protease HTRA1
Q9D7M1	0.0005	0.58	Glucose-induced degradation protein 8 homolog
Q9WV02	0.0005	0.83	RNA-binding motif protein_ X chromosome
O70492	0.0011	0.82	Sorting nexin-3
O35639	0.0016	0.65	Annexin A3
Q9ERT9	0.0026	0.47	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A
P20060	0.0027	0.50	Beta-hexosaminidase subunit beta
Q80TJ1	0.0031	0.68	Calcium-dependent secretion activator 1
O35874	0.0035	0.71	Neutral amino acid transporter A
O08709	0.0035	0.66	Peroxiredoxin-6
P52760	0.0036	0.68	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase
O89086	0.0037	0.63	RNA-binding protein 3
P28667	0.0042	0.78	MARCKS-related protein
Q61490	0.0042	0.80	CD166 antigen

**Tablo 4-2.** Alzheimer 5XFAD fare modeli 12 Ay beyin kesiti LCMSMS analiz sonuçları (devamı)

Q99J99	0.0051	0.83	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
P23242	0.006	0.79	Gap junction alpha-1 protein
Q06890	0.0061	0.46	Clusterin
P56564	0.0062	0.78	Excitatory amino acid transporter 1
Q9D1C8	0.0062	0.70	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog
P60229	0.0071	0.82	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
P21460	0.0075	0.73	Cystatin-C
Q99KP6	0.008	0.61	Pre-mRNA-processing factor 19
Q61102	0.0087	0.80	ATP-binding cassette sub-family B member 7_ mitochondrial
P10605	0.0092	0.81	Cathepsin B
P08226	0.0093	0.28	Apolipoprotein E
Q3TEA8	0.0109	0.83	Heterochromatin protein 1-binding protein 3
Q3UYK3	0.0118	0.76	TBC1 domain family member 9
P03995	0.0124	0.35	Glial fibrillary acidic protein
Q9CZ04	0.0126	0.27	COP9 signalosome complex subunit 7a
P20152	0.0127	0.56	Vimentin
Q9D0M1	0.0131	0.81	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1
Q9JJU8	0.0134	0.80	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein
Q6P9K8	0.0143	0.48	Caskin-1
P55088	0.0143	0.61	Aquaporin-4
Q91VE0	0.0145	0.81	Long-chain fatty acid transport protein 4
P31786	0.0166	0.66	Acyl-CoA-binding protein
P12023	0.017	0.57	Amyloid-beta A4 protein
Q9CPY7	0.0172	0.83	Cytosol aminopeptidase

**Tablo 4-2.** Alzheimer 5XFAD fare modeli 12 Ay beyin kesiti LCMSMS analiz sonuçları (devamı)

Q8CI43	0.0196	0.79	Myosin light chain 6B
P36536	0.0213	0.75	GTP-binding protein SAR1a
O54734	0.0219	0.77	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
P29391	0.0226	0.68	Ferritin light chain 1
Q91V76	0.0232	0.78	Ester hydrolase C11orf54 homolog
P60824	0.0253	0.56	Cold-inducible RNA-binding protein
Q9D379	0.026	0.81	Epoxide hydrolase 1
Q99JX3	0.0263	0.46	Golgi reassembly-stacking protein 2
Q00493	0.0313	0.80	Carboxypeptidase E
Q8R127	0.0344	0.82	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase
P56565	0.0351	0.70	Protein S100-A1
Q9D1X0	0.0359	0.80	Nucleolar protein 3
P23198	0.0361	0.77	Chromobox protein homolog 3
O35127	0.0372	0.81	Protein C10
Q3LAC4	0.0376	0.77	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein
Q9Z331	0.0379	0.79	Keratin_ type II cytoskeletal 6B
P70202	0.0447	0.81	Latexin
Q920N7	0.0493	0.20	Synaptotagmin-12

#### **4.4. 5XFAD Fare Beyin Dokularının MALDI Görüntüleme Kütle Spektrometresi Analizi Sonuçları**

Hastalık fare modellerinin 3, 6 ve 12 aylık beyin dokularında MALDI görüntüleme analizi sonrasında her grup için 40.900 m/z değeri elde edilmiştir. Tanımlanan m/z değerlerine gruplar arası *t* testi uygulandıktan sonra  $p < 0,05$  değerinden aşağıda kalan değerler ileriki analizlere dahil edilmiştir. Bu m/z değerlerine karşılık gelen MALDI görüntüsü sayısı fazla olduğundan raporda hasta ve

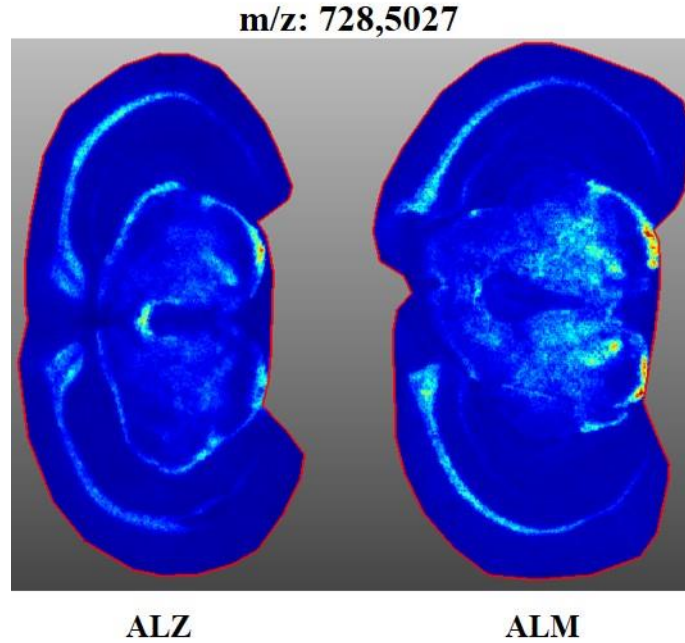
kontrol arasındaki fark skoru en fazla ve hastalık patolojisine en uygun olan proteinler seçilerek sunulmuştur

5XFAD fare modelinin 3 aylık beyin dokularında MALDI görüntüleme analizi sonrasında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

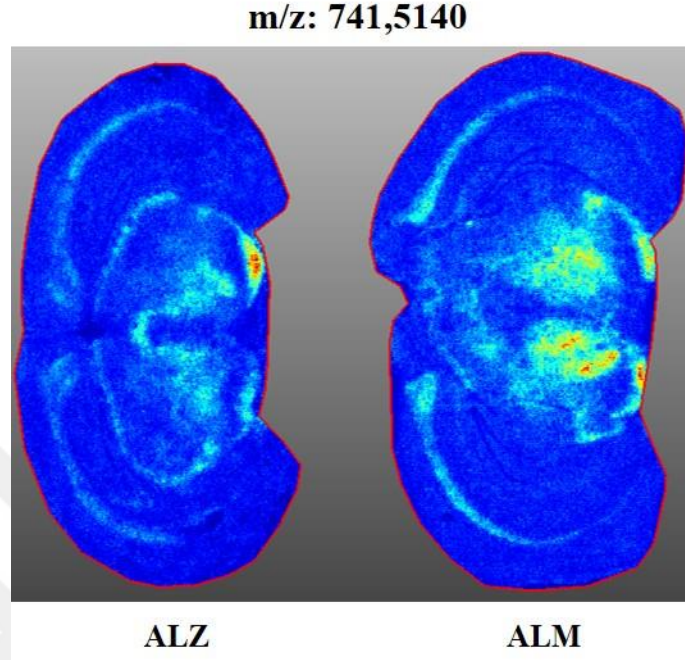
5XFAD fare modelinin 6 aylık beyin dokularında MALDI görüntüleme analizi sonrasında tanımlanan m/z değerlerine gruplar arası *t* testi uygulandıktan sonra  $p < 0,05$  değerinin altında kalan 2581 m/z değeri analizlere dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı beyin dokuları arasındaki farklılığın en belirgin görüldüğü MALDI görüntüleri, hangi proteinlere ait olduğu aşağıda verilmiştir (Tablo 4-3).

**Tablo 4-3.** 6 aylık Alzheimer fare modeli beyin dokularının MALDI görüntüleme sonuçları

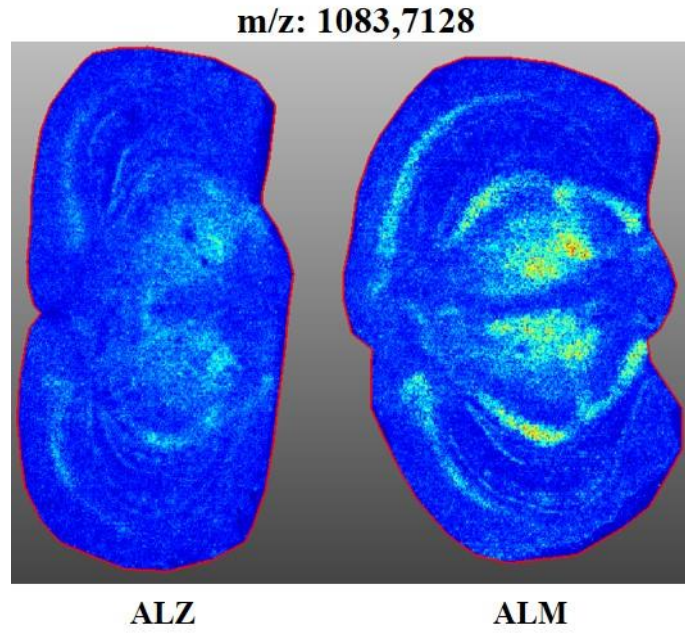
m/z	Erişim Numarası	Protein Adı
728,5027	G5E829	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
741,5140	O08599	Syntaxin-binding protein 1
1083,7128	P46460	Vesicle-fusing ATPase
1159,7362	P48722	Heat shock 70 kDa protein 4L
1256,7638	O35381	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A
1362,8064	P15508	Spectrin beta chain_ erythrocytic



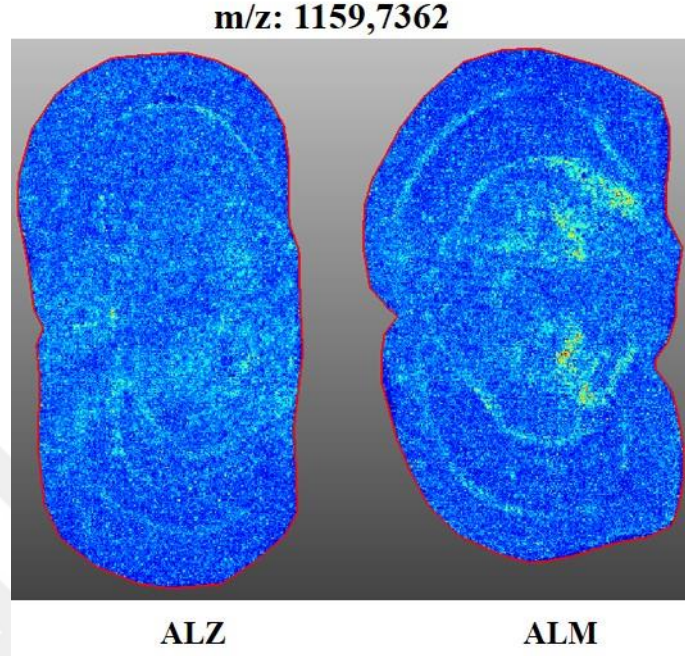
**Şekil 4-3.** Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 proteininin MALDI görüntüsü



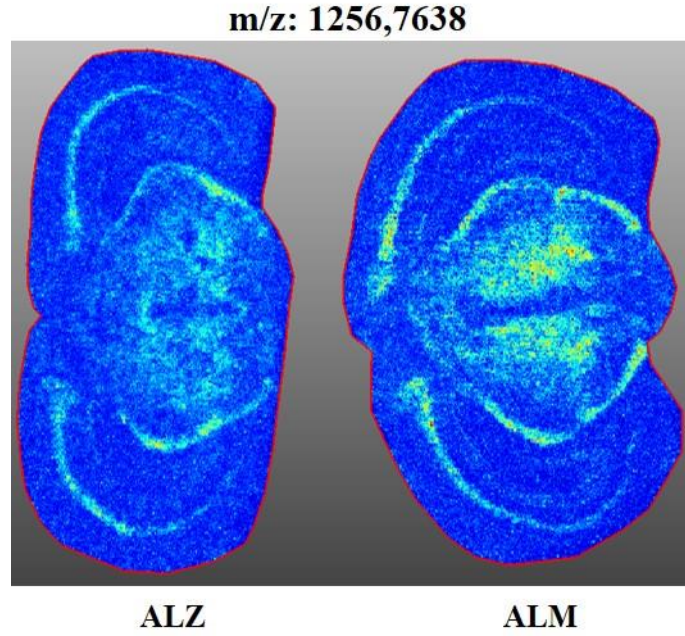
**Şekil 4-4.** Syntaxin-binding protein 1 proteininin MALDI görüntüsü



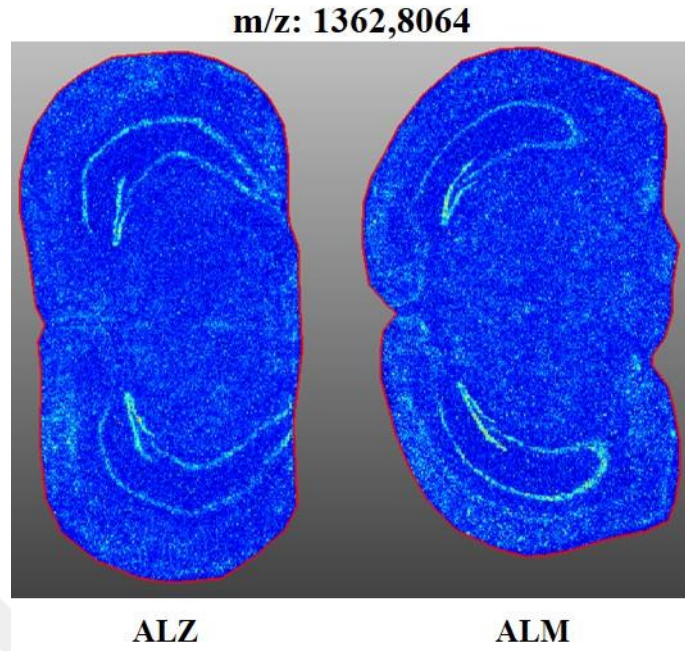
**Şekil 4-5.** Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A proteininin MALDI görüntüsü



**Şekil 4-6.** Spectrin beta chain\_ erythrocytic proteininin MALDI görüntüsü



**Şekil 4-7.** Vesicle-fusing ATPase proteininin MALDI görüntüsü



**Şekil 4-8.** Heat shock 70 kDa protein 4Lproteininin MALDI görüntüsü

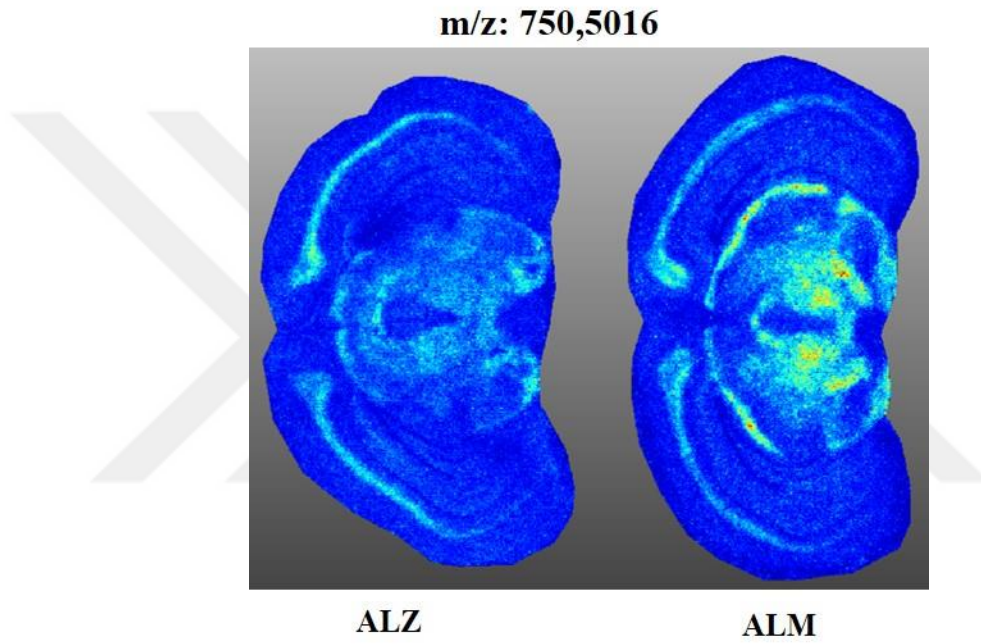
5XFAD fare modelinin 12 aylık beyin dokularında MALDI görüntüleme analizi sonrasında tanımlanan m/z değerlerine gruplar arası *t* testi uygulandıktan sonra  $p < 0,05$  değerinin altında kalan 1405 m/z değeri analizlere dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı beyin dokuları arasındaki farklılığın en belirgin görüldüğü MALDI görüntülerinin, hangi proteinlere ait olduğu aşağıda verilmiştir.

**Tablo 4-4.** 12 aylık Alzheimer fare modeli beyin dokularının MALDI görüntüleme sonuçları

<b>m/z</b>	<b>Erişim Numarası</b>	<b>Protein Adı</b>
750,5016	O35593	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14
768,4849	P26645	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
862,5368	Q9JMH6	Thioredoxin reductase 1_ cytoplasmic
970,6687	Q7M6Z4	Kinesin-like protein KIF27
1016,4400	P21619	Lamin-B2
1029,5441	Q3UHA3	Spatacsin
1057,5181	Q9JIS5	Synaptic vesicle glycoprotein 2A
1095,4827	Q8K0S0	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein
1213,6517	Q11011	Puromycin-sensitive aminopeptidase
1308,5400	P17183	Gamma-enolase

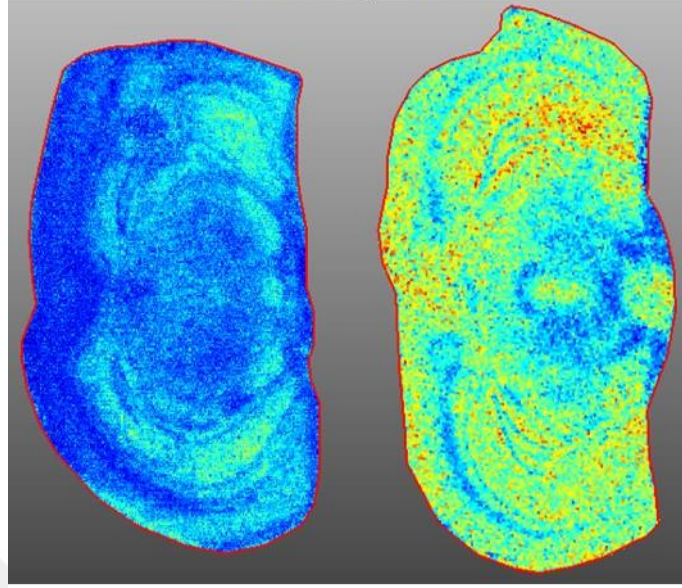
**Tablo 4-4.** 12 aylık Alzheimer fare modeli beyin dokularının MALDI görüntüleme sonuçları(devamı)

1320,8077	P17426	AP-2 complex subunit alpha-1
1371,6906	P14152	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic
1508,7257	P70195	Proteasome subunit beta type-7
1537,6755	Q9DBF1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase
1608,8650	P63011	Ras-related protein Rab-3A
1715,8816	Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B



**Şekil 4-9.** 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 proteininin MALDI görüntüsü

**m/z: 768,4849**

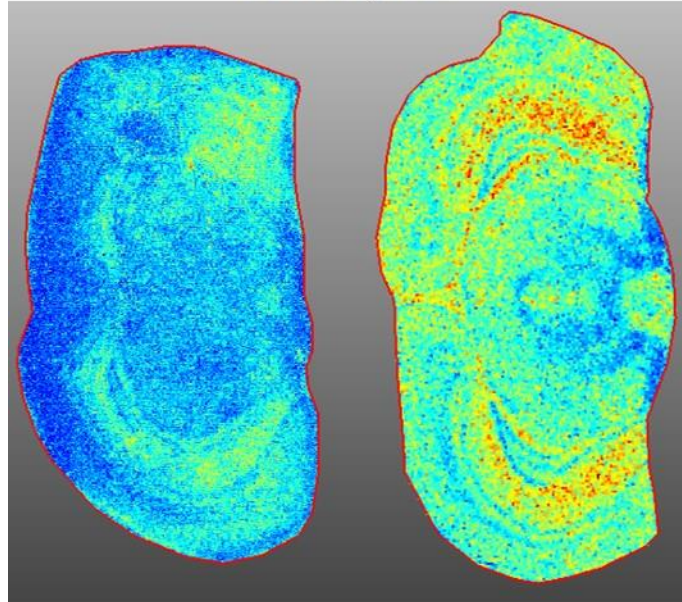


**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-10.** Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate proteininin MALDI görüntüsü

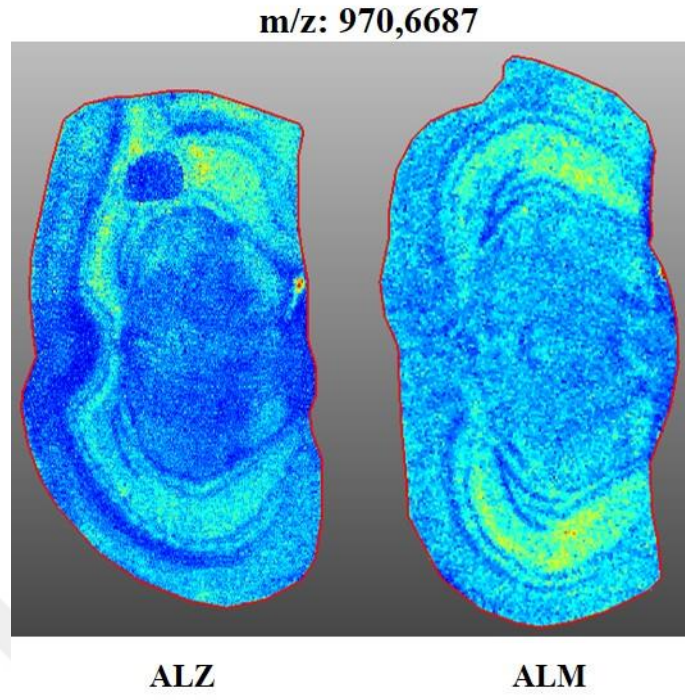
**m/z: 862,5368**



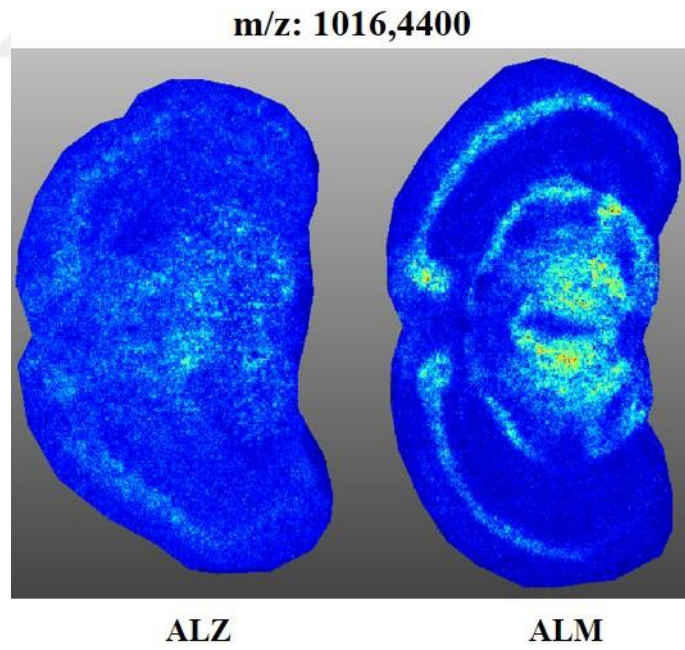
**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-11.** Thioredoxin reductase 1\_cytoplasmic proteininin MALDI görüntüsü

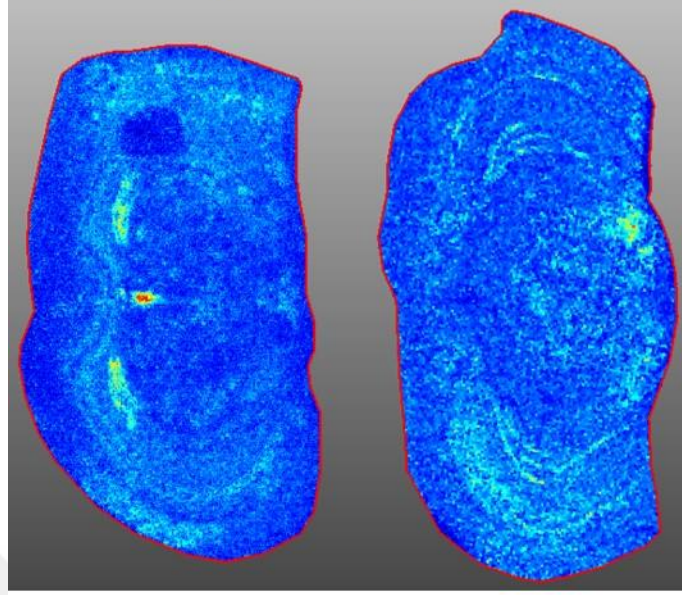


**Şekil 4-12.** Kinesin-like protein KIF27 proteininin MALDI görüntüsü



**Şekil 4-13.** Lamin-B2 proteininin MALDI görüntüsü

**m/z: 1029,5441**

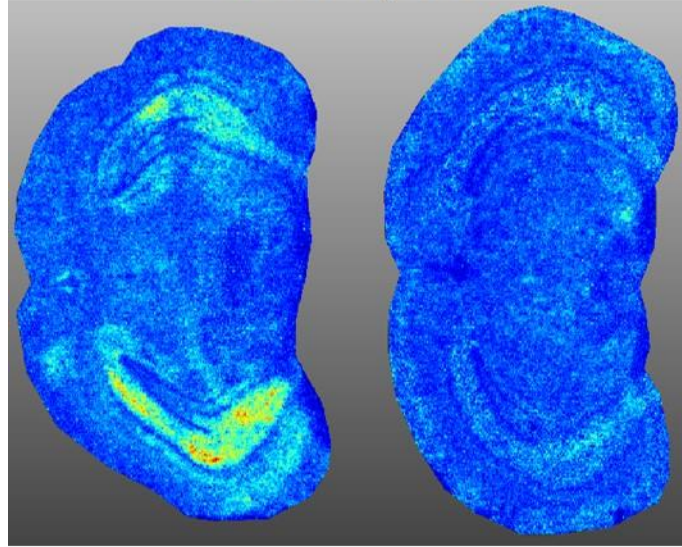


**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-14.** Spatacsin proteininin MALDI görüntüsü

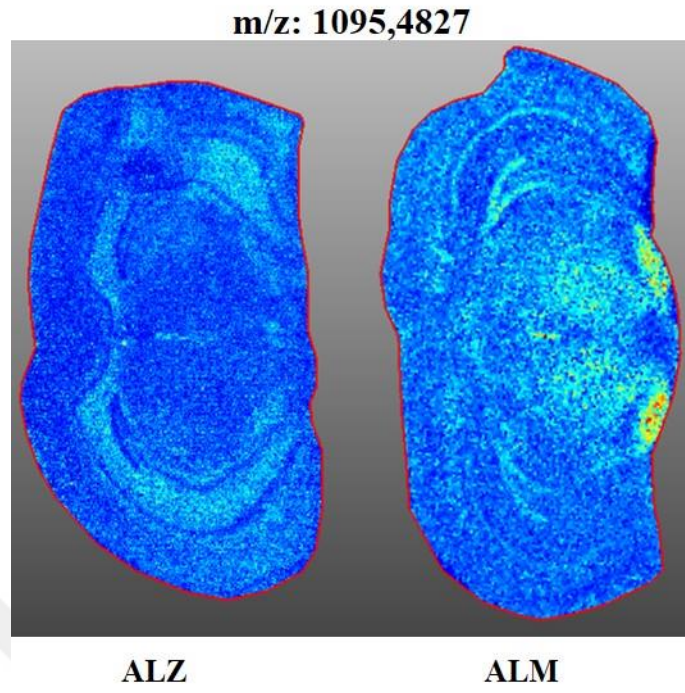
**m/z: 1057,5181**



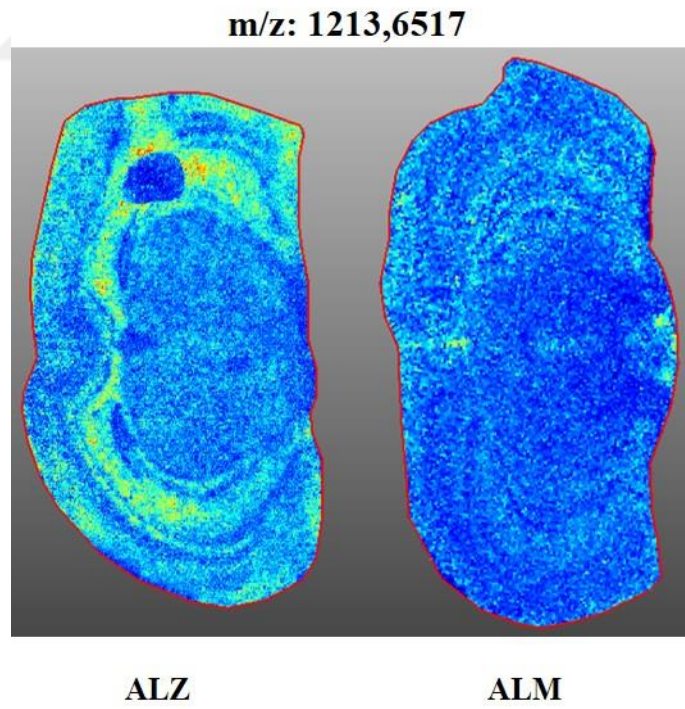
**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-15.** Synaptic vesicle glycoprotein 2A proteininin MALDI görüntüsü

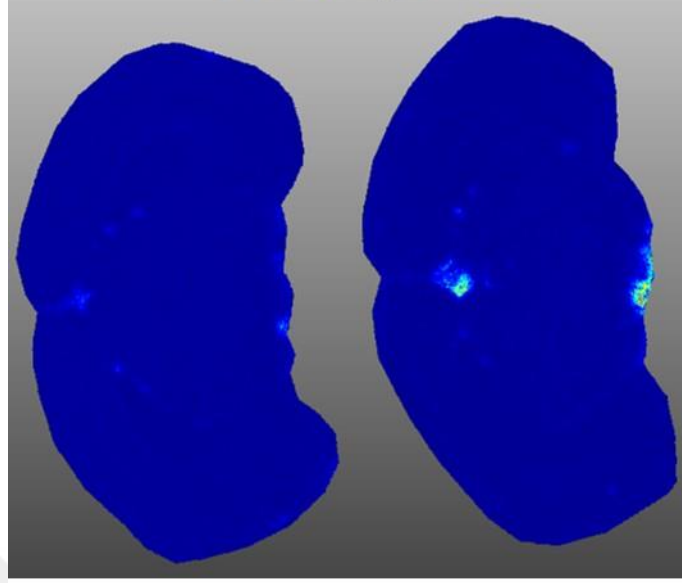


**Şekil 4-16.** Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting proteininin MALDI görüntüsü



**Şekil 4-17.** Puromycin-sensitive aminopeptidase proteininin MALDI görüntüsü

**m/z: 1308,5400**

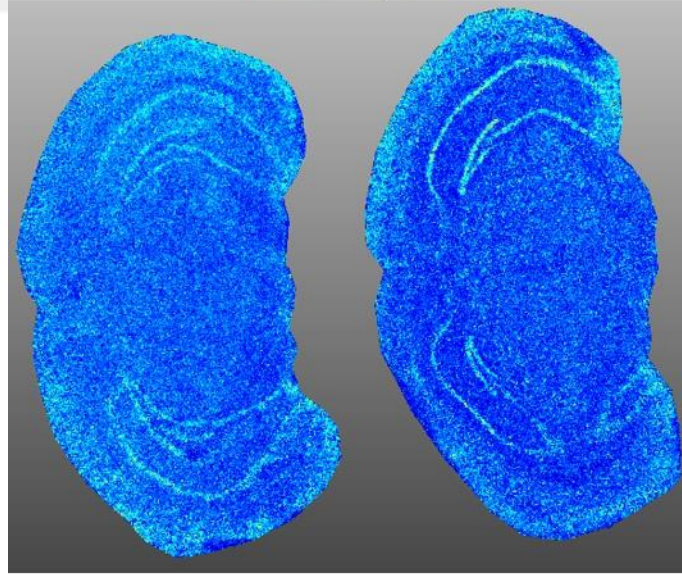


**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-18.** Gamma-enolase proteininin MALDI görüntüsü

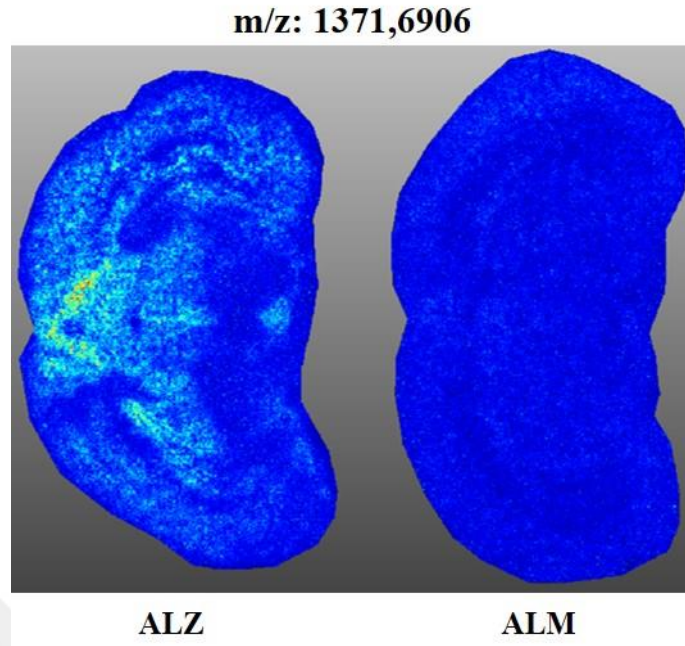
**m/z: 1320,8077**



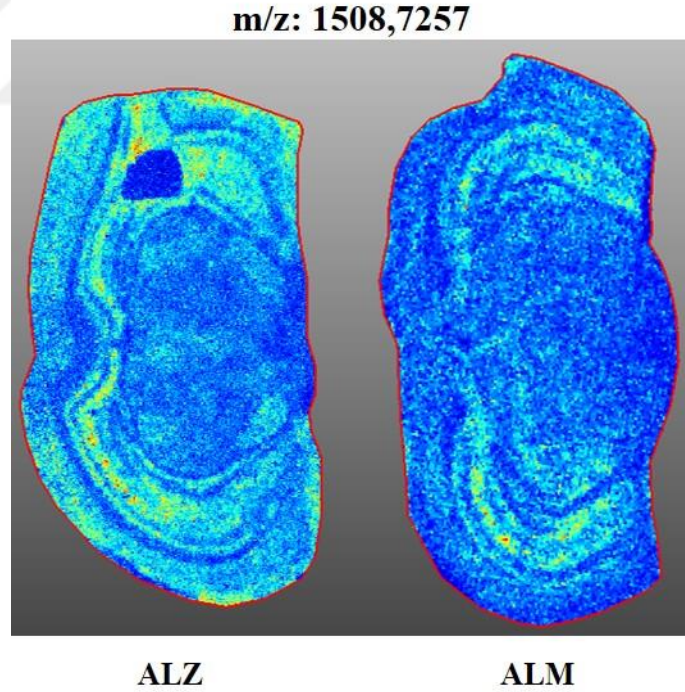
**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-19.** AP-2 complex subunit alpha-1 proteininin MALDI görüntüsü

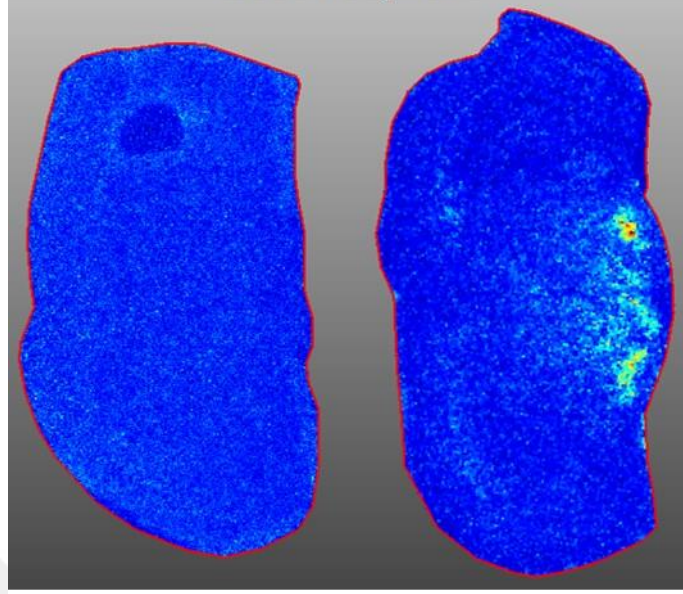


**Şekil 4-20.** Malate dehydrogenase\_cytoplasmic proteininin MALDI görüntüsü



**Şekil 4-21.** Proteasome subunit beta type-7 proteininin MALDI görüntüsü

**m/z: 1537,6755**

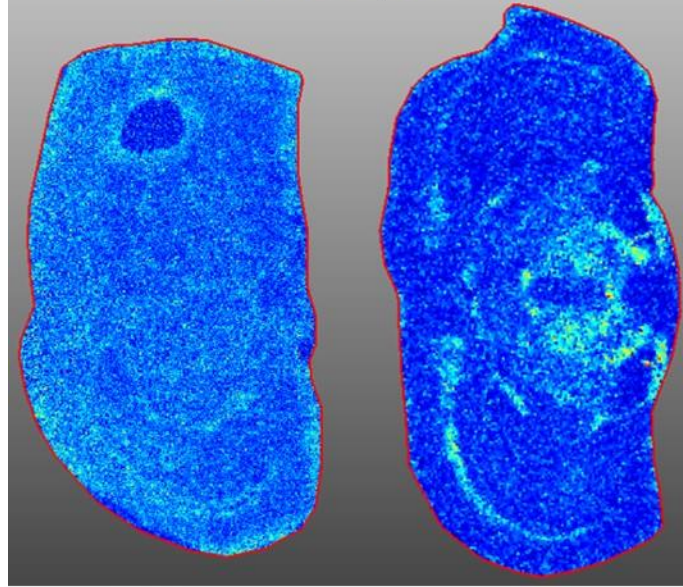


**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-22.** Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase proteininin MALDI görüntüsü

**m/z: 1608,8650**

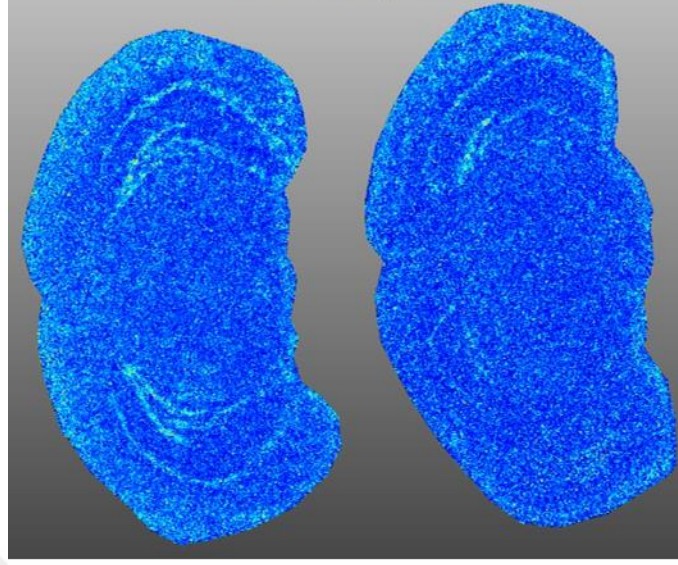


**ALZ**

**ALM**

**Şekil 4-23.** Ras-related protein Rab-3A proteininin MALDI görüntüsü

m/z: 1715,8816



ALZ

ALM

**Şekil 4-24.** Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B proteininin MALDI görüntüsü

#### 4.5. Hastalığa Özgü Ortak Protein ve Yolakların Belirlenmesi

MALDI görüntüleme analizleri ile elde ettiğimiz verilerin boyutu beklenenin çok üstündedir. Alzheimer hastalığı transgenik fare modelleri ve transgenik olmayan sağlıklı kontrol farelerden elde edilen doku taramaları sonucu tespit edilen toplam m/z sayıları Tablo 4-5'te gösterildiği gibidir. Verinin anlamlı şekilde indirgenmesi için hasta ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık ve ekspresyon değişim oranları kriter olarak belirlendi. Tablo 4-5'te, istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) değişen m/z sayısı ve farklı oranlarda değişim oranlarıyla (%10, %20, %30, %40) filtrelendiğinde kalan m/z sayısı belirtilmiştir. MALDI görüntüleme ile bölgesel protein ifade farklılıkları tespit edilirken, LC-MS/MS ile total beyin lizatından protein ifade farklılıkları belirlenmiştir. Tablo 4-5'te gösterilen MALDI görüntüleme ile tespit edilmiş m/z sayıları'na karşılık gelen protein sayıları ( $p < 0.05$ ), LC-MSMS ile tespit edilen protein sayıları ( $p < 0.05$ ) ile karşılaştırıldığı zaman çok daha fazla sayıda istatistiksel olarak anlamlı protein sayısına ulaşılmıştır. Bunun temel nedeni daha önce de belirttiğimiz üzere total doku analizi çalışıldığı zaman peptit bilgisinin normalize olması ve dokunun tamamında anlamlı bir şekilde değişmemesidir.

**Tablo 4-5.** Data indirgenme kriterleri

	<b>MALDI IMS m/z değerleri toplamı</b>	<b>t-Test <math>p&lt;0,05</math> m/z toplamı</b>	<b>t-Test <math>p&lt;0,05</math> ve oran&gt;%10 m/z toplamı</b>	<b>t-Test <math>p&lt;0,05</math> ve oran&gt;%20 m/z toplamı</b>	<b>t-Test <math>p&lt;0,05</math> ve oran&gt;%30 m/z toplamı</b>	<b>t-Test <math>p&lt;0,05</math> ve oran&gt;%40 m/z toplamı</b>
ALZ-3ay	40900	0	0	0	0	0
ALZ-6ay	40900	2581	1194	533	214	61
ALZ-12ay	40900	1405	1294	919	485	252

İstatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) değişen ve ekspresyon değişim oranı %10 olarak filtrelenen m/z'ler ile tanımlanan proteinlerin sayıları 6 aylık fareler için 713, 12 aylık fareler için 784'tür.

Alzheimer hastalığı'na ait örneklerle yapılan LC-MS/MS ve MALDI-TOF/MS analizinden elde edilen verilere göre sadece 12. ayda 23 adet protein ortak olarak bulunmuştur (Tablo 4-6).

**Tablo 4-6.** Alzheimer Hastalığı'nda LC-MS/MS ve MALDI-TOF/MS'ten elde edilen ortak proteinler

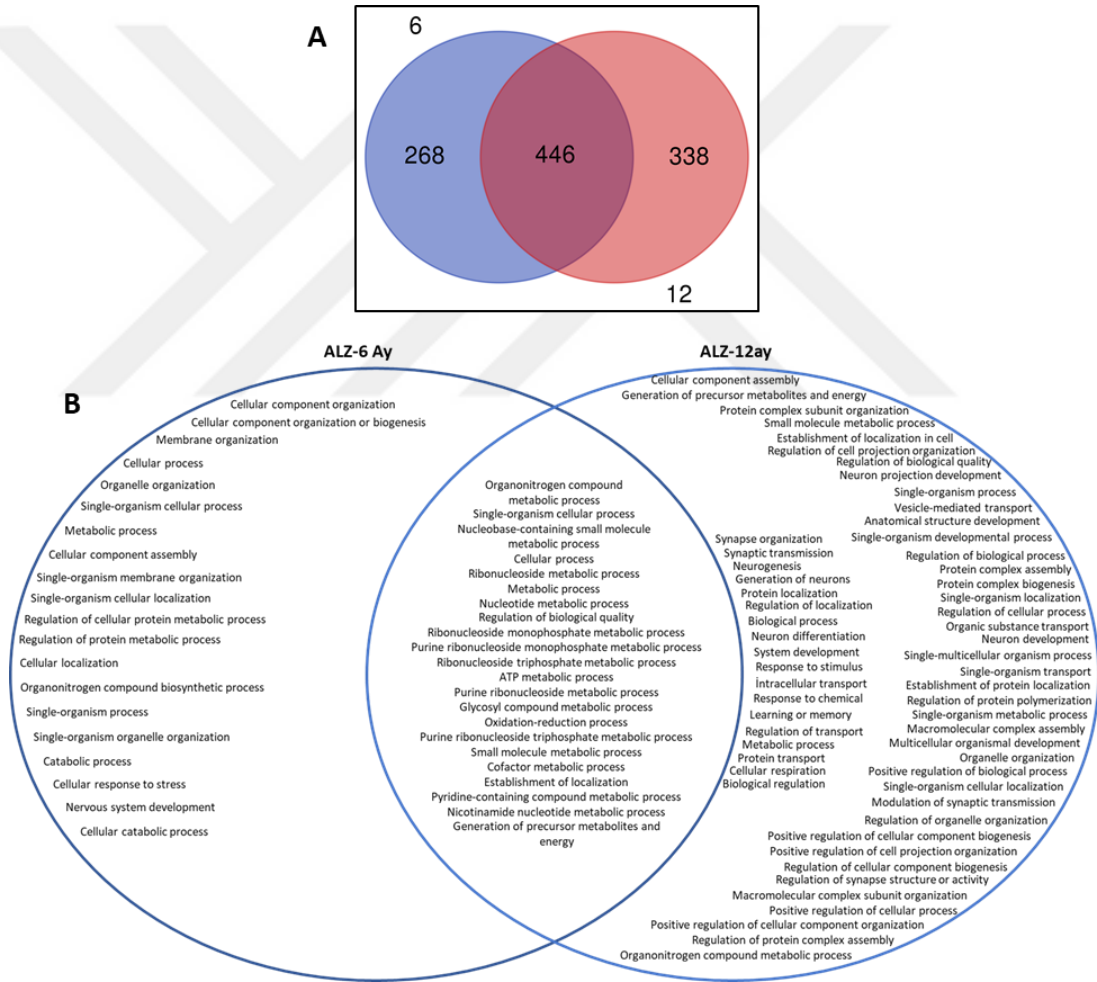
		<b>LC-MS/MS ile elde edilen proteinler</b>		
		3 Ay	6Ay	12 Ay
<b>MALDI- Görüntüleme ile elde edilen proteinler</b>	3 Ay	-		
	6 Ay		-	
	12 Ay			23

Tanımlanan proteinlerin hastalık gelişim sürecinde hangi moleküler yolları etkilediğini belirlemek amacıyla biyoinformatik analizler yapılmıştır.

#### **4.6. Alzheimer Hastalığı Transgenik Fare Modeli 3-6-12'inci Ay Örnekleri İçin Özgün ve Ortak Proteinler**

Alzheimer hastalığının 6 ve 12'inci aylarında anlamlı olarak değişen özgün ve ortak protein sayılarını göstermektedir. Alzheimer hastalığı transgenik fare modelinde 3'üncü ay örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı protein ifadesi değişimi görülmemiştir. 6'ıncı ay örneklerinde 268 özgün protein değişimi ve 12'inci ay

örneklerinde 338 özgün protein değişimi saptanmıştır. 6-12 ay döneminde 446 proteinin ortak olarak yer aldığı görülmektedir. Dolayısıyla döneme özgü proteinlerin varlığı ile birlikte 446 proteinin gelişim döneminde de rol aldığı görülmüştür (Şekil 4-25.A). Alzheimer grubunun MALDI görüntüleme veri analizi sonucunda, anlamlı olarak değişen proteinler için STRING yazılımı kullanılarak yolak analizi yapılmıştır (Şekil 4-25.B). 3. Aya özgü anlamlı protein ifadesi değişimi görülmediğinden yolak analizi yapılamamıştır. Alzheimer’da 6. aya özgü 20 farklı yolak bulunurken, 12. aya özgü 58 yolak tanımlanmıştır. 6. ay ve 12. ay arasında ise ortak olan 22 yolakta değişimler olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen yolakların içerik ve biyolojik anlamlılığı daha sonra tartışma bölümünde detaylandırılacaktır.



**Şekil 4-25.** Alzheimer hastalığı farklı evrelerinde tanımlanan özgün ve ortak protein sayıları (A) ve proteinler ile ilişkili moleküler yolaklar (B).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Progresif nörodejeneratif hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması için hala pek çok çalışma yürütülmektedir. Gelişen teknoloji ile yeni yöntemlerin, bu hastalıkların gerek *in vitro* gerek *in vivo* çalışmalarında uygulanması, moleküler mekanizmaları aydınlatılmakta ve tedaviye yönelik çalışmalara da temel oluşturmaktadır. Literatür araştırmaları sonucu, tez konusu kapsamında yapılan çalışmanın benzerine daha önce rastlanmamıştır.

Alzheimer hastalığına özgü transgenik hayvan modelinde yapılan Morris su tankı davranış testi sonucunda elde edilen verilere göre, hayvan modelinin 3. ayda hastalığın pre-patolojik evrede, 6. ayda hastalığın gelişim evresinde ve 12. ayda patolojik evre de olduğu gözlemlenmiştir. Bulgular, literatürde daha önce yapılmış davranış testi sonuçları ile örtüşmektedir (26). Ek olarak, 3, 6 ve 12. aylarda alınan beyin kesitlerinde yapılan immünohistokimya analizlerinde, A $\beta$  boyamalarının, belirlenen evreleri pozitif yönde desteklediği gösterilmiştir (Şekil 4-2).

nanoLC-MSMS etiketsiz protein ekspresyon analizi, yüksek çözünürlük kuadropol uçuş zamanı tüpü kütle spektrometresinde (QTOF-MSMS) kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. AH transgenik fare modelinde doku kesitlerinden ekstrakte edilen proteinler tripsinizasyon sonrasında LC-MS/MS sistemi üzerinde ters faz kromatografisi uygulanarak analiz edilmiş ve 2175 adet protein tanımlanarak kantite edilmiştir. LC-MS/MS analizleri ile gerçekleştirilen çalışmalardan gördüğümüz kadarıyla binlerce protein tanımlanabilmekte fakat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişen protein sayısı onlar düzeyinde kalmaktadır. Bunun en temel nedeni de doku kesitinden lizat hazırlanırken elde edilen protein karışımının bölgesel protein ifade farklılıklarını elimine etmesidir. Yani belirli bir protein dokuda sadece hipokampüste, kortekste ya da striatumda ifadesi değişebilmekte fakat dokunun tamamı homojenize edildiğinde bu bilgi kaybolmaktadır. MALDI görüntüleme analizi için yüksek çözünürlük kütle spektrometresi olmayan laboratuvarlar doku kesitlerinden spesifik bölgeleri laser mikrodiseksiyon cihazı ile izole edip ardından LC-MS/MS analizi gerçekleştirilebilir. MALDI kütle spektrometresi ile doku görüntüleme çalışmaları bize gösteriyor ki *in vivo* protein düzeyi değişiklikleri peptit m/z değerlerindeki farklılaşma ile takip edilebilmekte ve moleküler düzeyde

derinlemesine bilgi sağlayabilmektedir. Buradaki bir önemli husus elde edilen bilginin boyutudur. Yürütülen çalışmada gördük ki 600-2600 m/z değeri aralığında 40,000'den fazla farklı m/z değeri saptanabilmekte ve istatistiksel analizler sonucunda anlamlı olarak değişen m/z sayısı da LC-MS/MS çalışmalarına göre çok daha fazla olmaktadır. Her bir m/z değerine karşılık gelen doku görüntü sayısı da bundan ötürü binlerce olmaktadır. Çalışmamız çoklu biyolojik tekrarlar üzerinden gerçekleştirilmiştir fakat binlerce doku görüntüsü rapor formatına yerleştirilemediğinden dolayı her hastalık modelinde biyolojik olarak önem arz edebilecek bölgelere tekabül eden m/z farklılıkları gösterilecek şekilde m/z değerleri seçilmiştir ve tartışma kısmı düzenlenmiştir.

AH fare modelinde gerçekleştirilen MALDI görüntüleme analizleri sonucunda, 3. ayda bir farklılık bulunmazken, 6. ayda ekspresyon farklılığı gösteren proteinlerden bazıları; plasma membran kalsiyum transport ATPaz 1, syntaxin bağlayıcı protein 1, N-etilmaleimid füzyon proteini (NSF, vesicle-fusing ATase), ısı şoku 70 proteini 4L, ANP32 ve spectrin beta zinciri şeklindedir. AH nörodejeneratif işleyişte etkili olan mekanizmalardan biri Ca<sup>2+</sup> regülasyonundaki bozukluktur. PMCA1, Ca<sup>2+</sup> iyonunun plazma membranına transportundan sorumludur. AH post-mortem çalışmalarında PMCA ekspresyon ve aktivitesinde sonuçlarımıza uyuşan şekilde düştüğü gösterilmiştir (27). Munc-18 olarak da bilinen syntaxin bağlayıcı protein 1, vezikül docking ve ekzositozda görev alır. Özellikle pre-sinaptik sinir terminallerinde bulunur ve syntaxin-1'e bağlıdır. Munc-18'in CDK-5 ile fosforilasyonu, munc-18 ve syntaxin-1'in ayrılmasına sebep olarak veziküler docking'e izin verir ve nörotransmitter salınımını sağlar. Ayrıca Munc-18 fosforilasyonu Munc interacting (Mint) protein 1 ve 2'nin Munc-18'e bağlanabilmesine olanak sağlar. Bu oluşan komplekslerin nörotransmisyonu arttırdığı ve APP prosesinde ve amiloid beta üretiminde rol oynadığı varsayılmaktadır (28). APP salınımında regülatör görevi gören bir diğer protein vesicle-fusing ATPaz diğer adıyla N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF)'dir. NSF'nin tirozin fosfataz PTP-MEG2 tarafından tirozin 83 ile fosforilasyon/defosforilasyon durumu vezikül füzyon regülasyonunda önemli yer tutar (29). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre bu iki proteinin de hastalıklı farelerde azaldığı görülmüştür. MALDI görüntüleme sonuçlarına göre hastalıklı farelerde ekspresyonunda düşüş görülen, ANP32A, çeşitli oral patofizyolojik

süreçlerde görevlidir. AH tau fosforilasyonunda görev yaptığı düşünülmektedir. ANP32A ekspresyonundaki düşüş anormal nörit morfolojisine de sebep olmaktadır (30). Amilod-beta yolakları ile ilgili post-mortem bir çalışmada multifonksiyonel kortikal membran iskelet proteini olan spectrinin beta-alt ünitesi amiloid beta plakları içinde görülmüştür (26). Elde ettiğimiz sonuçlara göre 6. ay AH farelerde spectrin beta ekspresyonunun düştüğü gözlenmektedir.

5XFAD transgenik fare modelinde 3. ay doku kesitlerinde farklılık gözlemlenmemiş olması bu fare modelinde 3. ayında bilişsel olarak da farklılığın gözlemlenmemiş olması olabilir (Şekil 4-1). 3'üncü ayda henüz istatistiksel olarak anlamlı *in vivo* değişiklikler belirlenemeyecek düzeyde olabilir. AH 12. ayında ekspresyon farklılığı gösteren proteinlerden, MARCKS, nörit uzaması ve sinaptik plastisite gibi hafıza gelişiminde önemli olan mekanizmalarda görevlidir ve nörodejenerasyona sürecinde etkili olduğu gösterilmiştir (31). Ayrıca, A-beta üretimi, aktivasyonu ve plakların oluşumunda da etkileri olduğu öngörülmektedir (32-34). PSMD14 ve PSMA5 ubiquitin-bağımlı degradasyon sisteminin bir parçasıdır ve AH tedavisinde potansiyel bir hedef özelliğini taşımaktadır (35-36). Ekspresyonu azaldığı tespit edilen TRXR enzimi, ROS üretimi sebebiyle okside olan proteinlerin redüksiyonundan sorumludur ve AH için nöroprotektif bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Sistemin devre dışı kalması ile oksidatif stres etkisinin arttığı ve nörodejenerasyon gözlemlenmeye başladığı ihtimali oldukça yüksektir (37). Aksonal transportta görevli bir motor protein olan KIF ve nöronal migrasyondan sorumlu lamin-B'nin AH'de ekspresyonlarının düştüğünü, literatürdeki bilgiyle doğrularak tespit ettik (38-39). PSA, nörodejeneratif süreçlerde koruyucu etkisi olduğu düşünülen bir enzimdir. Taupati geliştiren hayvan modellerinde de ekspresyonun değiştiği gösterilmiştir (40). AP-2, retrograde ve anterograde aksonal taşımada görevli bir proteindir. AH ve ALS gibi pek çok nörodejeneratif hastalıkta ekspresyon ve regülasyonun bozulduğu tespit edilmiştir (41). Yaptığımız analizler kapsamında, AP-2 ekspresyonunun değiştiğini tespit edilmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda ekspresyonun değiştiği tespit edilmiş ve verilerimizle uyum gösteren proteinler, MDH, AASA ve ENOG'dir (42-44).

AH grubundaki 3, 6 ve 12 aylık doku kesitlerine ait MALDI-Görüntüleme analizi sonucunda anlamlı olarak değişen proteinler için STRING yazılımı kullanılarak yolak

analizi yapılmıştır (Şekil 4-25). Pre-patolojik dönemde (3. ay) anlamlı olarak değişiklik gösteren ( $p < 0.05$ ) protein tespit edilmemiştir. Fakat 6 ay ile 12 ay arasında önemli proteomik değişimler gözlemlenmiştir. 6. ayda temel değişimler; ‘cellular component organization’, ‘membrane organization’, ‘cellular localization’ gibi hücre içi yapısal değişimler ile ‘regulation of protein metabolic process’ gibi metabolizmada değişiklik gösteren yolları kapsamaktadır. 12 ayda ise yine hücre yapısıyla ilgili değişimler görülmekle beraber, direkt nöron yapısı ve nöronal iletişimle ilgili olan ‘synapse organization’, ‘synaptic transmission’, ‘neuron differentiation’ gibi yollar ve protein yapısal değişimleri ile ilgili olan ‘protein complex assembly’, ‘macromolecular complex assembly’ benzeri yollar görülmektedir. AH ileri dönemlerinde, hafıza ve zihinsel güçte azalma görüldüğü bilinmektedir (45). Yapılan yola analizinde de ‘learning and memory’ yolağının etkilendiği görülmektedir. Bunlardan başka ‘positive regulation of cell protection organization’, ‘neuron protection development’ gibi nöron hücrelerinin korunmasına yönelik yolların aktive edildiği görülmektedir. Bu durum AH patolojisiyle beraber, protektif mekanizmalarında da aktifleştirdiğini düşünebilir (46).

Sonuç olarak söyleyebiliriz ki MALDI kütle spektrometresi ile doku görüntüleme araştırmaları LC-MS/MS analizine göre daha kapsamlı ve daha anlamlı sonuçlar üretmektedir. Fakat aynı zamanda belirtmeliyiz ki LC-MS/MS çalışmalarına göre çok daha külfetli ve karmaşık bir araştırma alanıdır. MALDI görüntüleme çalışmalarında tespit edilen m/z değerlerinin hangi proteine ait olduğunun tespiti için yüksek çözünürlük kütle spektrometresine ihtiyaç vardır. Dolayısıyla bu alanda araştırma yapacak grupların her iki sisteme de ihtiyacı olacaktır. Transgenik fareler *in vitro* çalışmalara göre daha fazla bilgi sunabilmekte ve ülkemizde de artık yaygın olarak erişim sağlanabilmektedir. Alzheimer hastalığı için kullandığımız 5XFAD transgenik fareleri kullanışlı *in vivo* model olmaktadır ve bu fare modelinden elde edilen doku kesitlerinde yürütülen MALDI görüntüleme çalışmaları bize gösteriyor ki hastalıkların nörodejeneratif süreçleri proteinlerin farklılaşmasından kaynaklanmaktadır.

Daha detaylı bilgi elde edebilmek amacıyla çalışmanın devamı niteliğinde olacak deneyler planlanmaktadır. Gerçekleştirilen çalışma neticesinde elde edilen tüm verilere dayanarak farklılaşma gösteren proteinlerin öncelikli olarak validasyon deneyleri gerçekleştirilecektir. Bu deneyleri takiben tanımlamalar sonucu elde edilen

protein profillerinden hastalık için kilit rol oynayan proteinler ve biyokimyasal yolaklar ile ilgili deneyler yapılacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Kovacs GG. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: Turning towards precision medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(2), 189.
2. Agrawal M, Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci.* 2015, 2:54.
3. World Alzheimer Report 2016, <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>  
Erişim Tarihi: 20.05.2018
4. The Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/006554> Erişim Tarihi: 20.05.2018
5. van Ham TJ, Breitling R, Sweertz MA, Nollen EAA. Neurodegenerative diseases: Lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO Mol Med.* 2009. 1(8-9), 360–370.
6. Huang Y and Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies, *Cell.* 2012.148(6): 1204-22
7. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer’s disease: Past, present and future. *Neuropharmacology.* 2014. 76, pp27-50
8. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Human Molecular Genetics.* 2010. 19(1), pp12–20.
9. Ciechanover A, Kwon YT. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: Therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine.* 2015. 47,147
10. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine.* 2004. 10 Suppl: S10-7
11. Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2004.15:45-49.
12. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Eldik LV, Berry R, Vassar R. Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer’s Disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. 2006. 26(40):10129 –10140.
13. Morris RGM, Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 1981. 12, 239–260.

14. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition. 2006
15. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*. 1997. 1;69(23) pp4751-4760
16. Schober Y, Guenther S, Spengler B, Rompp A. High resolution matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of tryptic peptides from tissue. *Rapid Commun Mass Spectrom: RCM*. 2012. 26(9):1141–1146.
17. Spraggins JM, Caprioli RM. High-speed MALDI-TOF imaging mass spectrometry: rapid ion image acquisition and considerations for next generation instrumentation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011. 22(6):1022–1031.
18. McDonnell LA, Corthals GL, Willems SM, van Remoortere A, van Zeijl RJ, Deelder AM. Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J Proteome*. 2010. 73(10):1921–1944.
19. Nilsson A, Fehniger TE, Gustavsson L, Andersson M, Kenne K, Marko-Varga G, Andren PE. Fine mapping the spatial distribution and concentration of unlabeled drugs within tissue micro-compartments using imaging mass spectrometry. *PLoS One*. 2010. 5(7):e11411.
20. Blonder J, Chan KC, Issaq HJ, Veenstra TD. Identification of membrane proteins from mammalian cell/tissue using methanol-facilitated solubilization and tryptic digestion coupled with 2D-LC-MS/MS. *Nat Protoc*. 2006. 1, 2784-2790.
21. Seeley EH and Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105(47):18126-31.
22. Esteve C, Jones EA, Kell DB, Boutin H, McDonnell LA. Mass spectrometry imaging shows major derangements in neurogranin and in purine metabolism in the tripleknockout 3×Tg Alzheimer mouse model. *Biochim Biophys Acta*. 2017. 1865(7):747-754.
23. González de San Román E, Manuel I, Giralt MT, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R. Imaging mass spectrometry (IMS) of cortical lipids from preclinical to severe stages of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2017. 1859(9 Pt B):1604-1614
24. Tong M, Leão R, Vimbela GV, Yalcin EB, Kay J, Krotow A, de la Monte SM. Altered temporal lobe white matter lipid ion profiles in an experimental model of sporadic Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2017. 82:23-34

25. Kaya I, Brinet D, Michno W, Syvänen S, Sehlin D, Zetterberg H, Blennow K, Hanrieder J. Delineating Amyloid Plaque Associated Neuronal Sphingolipids in Transgenic Alzheimer's Disease Mice (tgArcSwe) Using MALDI Imaging Mass Spectrometry. *ACS Chem Neurosci*. 2017. 15;8(2):347-355.
26. Schneider F, Baldauf K, Wetzel W, Reymann K.G. Behavioral and EEG changes in male 5XFAD mice. *Physiol Behav*. 2014. 135, p25-33.
27. Stafford N, Wilson C, Oceandy D, Neyses L, Cartwright EJ. The Plasma Membrane Calcium ATPases and Their Role as Major New Players in Human Disease, *Physiol Rev*. 2017. 97(3), pp1089-1125.
28. Donovan LE, Higginbotham L, Dammer EB, Gearing M, Rees HD, Xia Q, Duong DM, Seyfried NT, Lah JJ, Levey AI. Analysis of a membrane-enriched proteome from postmortem human brain tissue in Alzheimer's disease. *Proteomics Clin Appl*. 2012, 6(3-4), pp201-211.
29. Ikin AF, Causevic M, Pedrini S, Benson LS, Buxbaum JD, Suzuki T, Lovestone S, Higashiyama S, Mustelin T, Burgoyne RD, Gandy S. Evidence against roles for phorbol binding protein Munc13-1, ADAM adaptor Eve-1, or vesicle trafficking phosphoproteins Munc18 or NSF as phospho-state-sensitive modulators of phorbol/PKCactivated Alzheimer APP ectodomain shedding. *Molecular Neurodegeneration*, 2007. 2, 23.
30. Wang S, Wang Y, Lu Q, Liu X, Wang F, Ma X, Cui C, Shi C, Li J, Zhang D. The expression and distributions of ANP32A in the developing brain. *Biomed Res Int*. 2015, 207-347.
31. Sihag RK, Cataldo AM. Brain beta-spectrin is a component of senile plaques in Alzheimer's disease" *Brain Res*. 1996. 743(1-2), 249-57.
32. Brudvig JJ and Weimer JM. MARCKS the spot: myristoylated alanine-rich C kinase substrate in neuronal function and disease. *Front Cell Neurosci*. 2015. 9: 407.
33. Su R, Han ZY, Fan JP, Zhang YL. A possible role of myristoylated alaninerich C kinase substrate in endocytic pathway of Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull*. 2010. 26, 338-344.
34. Kimura T, Yamamoto H, Takamatsu J, Yuzuriha T, Miyamoto E, Miyakawa T. Phosphorylation of MARCKS in Alzheimer disease brains. *Neuroreport* 2000. 11, 869-873.
35. Sunohara JR, Ridgway ND, Cook HW, Byers DM. Regulation of MARCKS and MARCKS-related protein expression in BV-2 microglial cells in response to lipopolysaccharide. *J. Neurochem*. 2001. 78, 664-672.

36. Gadhave K, Bolshette N, Ahire A, Pardeshi R, Thakur K, Trandafir C, Istrate A, Ahmed S, Lahkar M, Muresanu DF, Balea M. The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2016. 20(7): 1392–1407.
37. Wu Y, Deng Y, Zhang S, Luo Y, Cai F, Zhang Z, Zhou W, Li T, Song W. Amyloid- $\beta$  precursor protein facilitates the regulator of calcineurin 1-mediated apoptosis by downregulating proteasome subunit  $\alpha$  type-5 and proteasome subunit  $\beta$  type-7. *Neurobiol Aging.* 2015. 36(1):169-77
38. Lovell MA, Xie C, Gabbita SP, Markesbery WR. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med.* 2000. 1;28(3):418-27.
39. Hashimoto M1, Bogdanovic N, Nakagawa H, Volkmann I, Aoki M, Winblad B, Sakai J, jernberg LO. Analysis of microdissected neurons by 18O mass spectrometry reveals altered protein expression in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2012. 16(8):1686-700.
40. Ramasamy VS, Islam MI, Haque MA, Shin SY, Park IS.  $\beta$ -Amyloid induces nuclear protease-mediated lamin fragmentation independent of caspase activation. *Biochim Biophys Acta.* 2016. 1863(6 Pt A):1189-99.
41. Karsten SL, Sang TK, Gehman LT, Chatterjee S, Liu J, Lawless GM, Sengupta S, Berry RW, Pomakian J, Oh HS, Schulz C, Hui KS, Wiedau-Pazos M, Vinters HV, Binder LI, Geschwind DH, Jackson GR. A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron.* 2006. 7;51(5):549-60.
42. Kononenko NL, Claßen GA, Kuijpers M, Puchkov D, Maritzen T, Tempes A, Malik AR, Skalecka A, Bera S, Jaworski J, Haucke V. Retrograde transport of TrkB-containing autophagosomes via the adaptor AP-2 mediates neuronal complexity and prevents neurodegeneration. *Nat Commun.* 2017. 7;8: 14819.
43. Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol.* 2005. 57(5):695-703.
44. Hondius DC, van Nierop P, Li KW, Hoozemans JJ, van der Schors RC, van Haastert ES, van der Vies SM, Rozemuller AJ, Smit AB. Profiling the human hippocampal proteome at all pathologic stages of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2016. 12(6):654-68.
45. Polcyn R, Capone M, Hossain A, Matzelle D, Banik NL, Haque A. Neuron specific enolase is a potential target for regulating neuronal cell survival and death:

implications in neurodegeneration and regeneration. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017. 4:254-257.

46. Grober E, Hall CB, Lipton RB, Zonderman AB, Resnick SM, Kawas C. Memory impairment, executive dysfunction, and intellectual decline in preclinical Alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society.* 2008. 14(2). 266-278



## EK - DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU BELGESİ



SAYI: HDK-2016/42  
KONU: ACU-HADYEK 2016/42 sayılı başvurunuz

23.12.2016

Sn. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

ACU-HADYEK 2016/42 sayılı **“Nörodejeneratif Mekanizmaların Başlangıcının 5XFAD Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Proteomik Yöntemlerle Araştırılması”** isimli projeniz Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun **19.12.2016** tarihli **30.** toplantısında incelenmiş ve etik olarak uygun bulunmuştur.

ACU-HADYEK 2016/43 sayılı karar ektedir.



Prof. Dr. Güldal SÜYEN

Acıbadem Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı



**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
KARAR FORMU**

<b>BAŞVURU TARİHİ:</b> 15.12.2016	<b>KARAR TARİHİ:</b> 19.12.2016
<b>BAŞVURU SAYISI:</b> 2016/42	<b>KARAR SAYISI:</b> 2016/43

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ahmet Tarkan Baykal'ın yürütücüsü olduğu "Nörodejeneratif Mekanizmaların Başlangıcının 5XFAD Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Proteomik Yöntemlerle Araştırılması" isimli proje başvurusu Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun "19.12.2016" tarih ve "30" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan

Uygun  Düzeltilmesi Gerekir  Koşullu Olarak Uygun  Uygun Değil

olarak değerlendirilmiştir.

Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		(X)	( )
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		(X)	( )
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		(X)	( )
Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		(X)	( )
Prof. Dr. Yeşim İşıl Ülman		( )	( )
Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		(X)	( )
Yrd. Doç. Dr. Figen Demir		(X)	( )
Sabiha Turgut Genç		( )	( )
Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)		(X)	( )

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Emel	<b>Soyadı</b>	Akgün
<b>Doğum Yeri</b>	Edirne	<b>Doğum Tarihi</b>	26/06/1985
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Telefon</b>	5386429283
<b>E-mail</b>	emelc.akgun@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
Yüksek Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	2015-Halen
Lisans	Haliç Üniversitesi	2003-2007
Lise	Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi	1999-2003

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
Moleküler Biyolog	Acıbadem Labmed AR-GE Merkezi	2017-Halen

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	İyi	İyi	iyi

Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

<b>Yabancı Dil Sınav Notu</b>									
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	DiĞER
									72,5

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
ALES	82,47354	79,65177	64,00428

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Microsoft Office	Çok iyi

