



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKIM SİTOMETRİ TEKNİĞİ İLE YENİ DOĞAN FARE  
BEYNİNDEN BÖLGESEL OLARAK İZOLE EDİLMİŞ SPESİFİK  
HÜCRELERİN PROTEİN PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

EMRE VATANDAŞLAR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. DENİZ DURALI

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2017

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin (REMER) sağladığı üstün teknolojik araç gereç ve kimyasal malzemelerle yapılmıştır. Merkez'in Müdürü ve aynı zamanda Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e , Danışmanım Sayın Hocam Y. Doç. Dr. Deniz Duralı'ya ve İkinci Danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a çalışmam sırasında tüm yardım, destek ve sabırları için,

Tez savunma jürimde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM ve Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersan KERMAN'a

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Dr. Mehmet Şerif Aydın, Ayşegül Sümeyye ARZUMAN, Esra EKMEKÇİOĞLU, Betül POLAT, İhsan YOZGAT, Dr. Neşe AYŞİT ve REMER bünyesinde çalışan tüm arkadaşlarıma,

Destegini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Burcu Kurt VATANDAŞLAR'a,

Akademik hayatıma yön veren, hayatı boyunca sadece öğrenmek ve öğretmek arzusuyla yaşamış, oğlu ve öğrencisi olma şerefine nail olduğum canım babam Prof. Dr. Fikret VATANDAŞLAR'a, her zaman desteklerini aldığım canım annem Nuran VATANDAŞLAR ve ağabeyim Hakan VATANDAŞLAR'a

Teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
KISALTMA VE SİMGE LİSTESİ .....	vi
RESİM, ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ .....	vii
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT .....	2
3.GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
4.GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Sinir Sistemi .....	4
4.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Gelişimi.....	4
4.1.2. MSS Anatomisi.....	6
4.1.3. Hipokampus Anatomisi .....	7
4.1.4. Hipokampus Histolojisi .....	7
4.1.5. Hipokampus Fonksiyonları.....	8
4.1.6. Serebral Korteks Anatomisi.....	8
4.1.7. Serebral Korteks Histolojisi.....	8
4.1.7.1. Katman1 (Eksternal Pleksiform, Moleküler, Yüzeysel).....	8
4.1.7.2. Katman 2/3 (Supragranüler Piramidal).....	9
4.1.7.3. Katman 4 (Granüler).....	9
4.1.7.4. Katman5 (Derin Piramidal) .....	9
4.1.7.5. Katman6 (Polimorfik).....	9
4.1.7.6. Katman 7 (Alt Griseal) .....	10
4.1.8. Serebral Korteks Fonksiyonları .....	10
4.1.9. Hipokampal Nöronlar .....	10
4.1.10. Serebral Korteks Nöronları.....	11
4.1.11. Radial Glia Hücreler .....	12
4.1.12. Astrositler.....	12
4.1.13. Oligodendrositler .....	13
4.1.14. Polidendrositler / Oligodendrosit Öncü Hücreler .....	13
4.1.15. Mikroglialar .....	13
4.1.16. Ependimal Hücreler .....	14
4.2. Akım Sitometri (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS).....	14
4.3. Proteomik Ekspresyon Analiz Yöntemi .....	15

<b>5. MATERYAL ve METOD</b> .....	16
5.1. Materyal.....	16
5.1.1 Ekipmanlar.....	16
5.1.1 Deneyde kullanılan materyaller .....	17
5.2. Metod.....	20
5.2.1. Deney Grupları .....	20
5.2.2. Kültürde kullanılan besiyeri.....	20
5.2.2.1. Diseksiyon besiyeri.....	20
5.2.2.2. Kültür besiyeri .....	21
5.2.2.3. Re-ekspresyon besiyeri .....	21
5.2.3. Hücrelerin elde edilmesi .....	21
5.2.4. Akım Sitometrisi Analizi .....	21
5.2.5. İmmünsitokimyasal Boyama .....	23
5.2.6. Mikroskopik İnceleme .....	23
5.2.7. Protein Profili Analizi.....	23
5.2.7.1. Örnek Hazırlama.....	23
5.2.7.2. Hücrelerden protein eldesi .....	24
5.2.7.3. Mikrodiyaliz.....	24
5.2.7.4. Protein konsantrasyon tayini.....	24
5.2.7.5. Proteinlerden triptik peptid eldesi.....	24
5.2.7.6. Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi.....	25
<b>6. BULGULAR</b> .....	27
6.1. Akım Sitometrisi .....	27
6.2. Mikroskopik İncelemeler .....	46
6.3. Protein Profili Analizi .....	47
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	57
<b>8. KAYNAKLAR</b> .....	61
<b>10. ETİK KURUL ONAYI</b> .....	66
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	68

## KISALTMA VE SİMGE LİSTESİ

<b>Semboller</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>SSS</b>	Santral Sinir Sistemi
<b>PSS</b>	Periferik Sinir Sistemi
<b>MS</b>	Kütle Spektrometresi
<b>LC</b>	Sıvı Kromatografisi
<b>RGc</b>	Radial Glial Hücreler
<b>VZ</b>	Ventriküler Bölge
<b>SVZ</b>	Subventriküler Bölge
<b>GLAST</b>	Astrosit Spesifik Glutamatat Taşıyıcı
<b>UPX</b>	Universal Protein Ekspresyon Kiti
<b>PIC</b>	Proteaz İnhibitör Kokteyl
<b>FASP</b>	Filtre Yardımı İle Örnek Hazırlama Kiti
<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>FACS</b>	Floresan İle Aktive Hücre Ayırıştırma
<b>AmBic</b>	Amonyum Bikarbonat
<b>BLBP</b>	Beyin Lipid Bağlayıcı Protein
<b>BPc</b>	Bazal Öncü Hücreler
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>oIPC</b>	Oligodendrosit Ara Öncü Hücreler
<b>CA</b>	Cornu Ammonis
<b>IAA</b>	İyodoasetamid
<b>UPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>GABA</b>	Gamma Amino Bütirik Asit
<b>NG2</b>	Nöron/Glia Antijen 2
<b>FSC</b>	İleri Saçılan Işık
<b>SSC</b>	Dik Yana Saçılan Işık

## RESİM, ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

### Resim Listesi

Resim 5.2.1.1. Yeni doğan fareden hipokampus ve korteks dokularının çıkarılması	20
Resim 6.2.1. . Sort sonrası GLAST ile pozitif boyanan astrositler (40X büyütme)	46
Resim 6.2.2. . Negatif seçilim yöntemi ile ayrıştırılan hücreler 72 saatlik kültür sonrası (20X büyütme)	47

### Şekil Listesi

Şekil 4.1.1.1. Kortikal nöron ve gliaların gelişim ve farklılaşması	5
Şekil 4.1.1.2. Hipokampus embriyonik gelişimi ve anatomisi	6
Şekil 6.1.1. Dissosiyasyonu sonucu boyutsal (FSC) ve granülaritelerine (SSC) göre serebral korteksteki hücre ve hücre parçalarının dağılımı	28
Şekil 6.1.2. Negatif kontrol (Çekirdek boyası bulunmayan)	28
Şekil 6.1.3. Kapılama işlemi ile popülasyon içinden çekirdekli hücre ve hücre parçalarının ayrımı	29
Şekil 6.1.4. Trypsin ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı	29
Şekil 6.1.5. Accutase ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı	30
Şekil 6.1.6. TrypLE ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı	30
Şekil 6.1.7. Papain ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı	31
Şekil 6.1.8. Boyutsal (FSC) ve granülarite (SSC) grafiğine göre canlı hücre (mavi renk), ölü hücre (kahverengi) ve hücre parçalarının (kırmızı renk) ayrımı	31
Şekil 6.1.9. Akım sitomerisinde hücre parçalarının boyutsal dağılımı	32

Şekil 6.1.10. Akım sitometrisinde ölü hücrelerin boyutsal dağılımı .....	32
Şekil 6.1.11. Akım sitometrisinde canlı hücrelerin boyutsal dağılımı) .....	33
Şekil 6.1.12. Boyutsal (FSC) histogram grafiğinde canlı hücre (mavi renk), ölü hücre (kahverengi) ve hücre parçalarının (kırmızı renk) ayrımı .....	33
Şekil 6.1.13. Kapılama işlemi ile FSC ve SSC grafiğinde canlı hücrelerin çekirdekli ölü hücrelerden ve hücre partiküllerinden ayrımı. ....	34
Şekil 6.1.14. Dissosiyasyonu sonucu FSC ve SSC göre serebral korteksteki hücre ve hücre parçalarının dağılımı .....	35
Şekil 6.1.15. Fiziksel parametreler (FSC ve SSC) ile canlı hipokampal hücre kapısının alınması .....	35
Şekil 6.1.16. Hipokampal hücreler PECy7 ve AF488 izotip kontrol.....	36
Şekil 6.1.17. Hipokampal hücreler NG2 ve A2B5 pozitif hücreler .....	36
Şekil 6.1.18. Hipokampal hücreler APCCy7 ve PE izotip kontrol .....	37
Şekil 6.1.19. Hipokampal hücreler CD45 ve GLAST pozitif hücreler .....	37
Şekil 6.1.20. Hipokampal hücreler APC ve PerCPCy5.5 izotip kontrol.....	38
Şekil 6.1.21. Hipokampal hücreler O4 ve CD31 pozitif hücreler .....	38
Şekil 6.1.22. Hipokampal hücreler BV605 ve BV421 izotip kontrol .....	39
Şekil 6.1.23. Hipokampal hücreler quadrant ayrımı .....	39
Şekil 6.1.24. Fiziksel parametreler (FSC ve SSC) ile canlı kortikal hücre kapısının seçimi .....	40
Şekil 6.1.25. Kortikal hücreler PECy7 ve AF488 izotip kontrol .....	40
Şekil 6.1.26. Kortikal hücreler NG2 ve A2B5 pozitif hücreler .....	41
Şekil 6.1.27. Kortikal hücreler APCCy7 ve PE izotip kontrol.....	41
Şekil 6.1.28. Kortikal hücreler CD45 ve GLAST pozitif hücreler .....	42
Şekil 6.1.29. Kortikal hücreler APC ve PerCPCy5.5 izotip kontrol .....	42
Şekil 6.1.30. Kortikal hücreler O4 ve CD31 pozitif hücreler .....	43

Şekil 6.1.31. Kortikal hücreler BV605 ve BV421 izotip kontrol) .....	43
Şekil 6.1.32. Kortikal hücreler quadrant ayrımı.....	44
Şekil 6.3.1. Hipokampüs ve Korteks hücrelerinin PCA analizi.....	48
Şekil 6.3.2. Hipokampüs ve korteksten elde edilen protein dağılımı .....	49
Şekil 6.3.3. Proteinlerin bölgesel ve hücresele sınıflandırılması ile fonksiyon farklılığı; .....	56

### **Tablo Listesi**

Tablo 5.1.1.1. Deneyde kullanılan ekipmanlar .....	16
Tablo 5.1.2.1. Deneyde kullanılan materyal listesi.....	17
Tablo 6.1.1. Canlılık ile boyutsal kapılama arasındaki ilişki.....	34
Tablo 6.1.2. Negatif eliminasyon yöntemi ile elde edilen kortikal canlı nöron oranı	44
Tablo 6.1.3. Negatif eliminasyon yöntemi ile elde edilen hipokampal canlı nöron ..	45
Tablo 6.1.4. Hipokampal canlı astrosit ayırım analizi .....	45
Tablo 6.1.5. Kortikal canlı astrosit ayırım analizi.....	45
Tablo 6.3.1. Hipokampüs ve kortekstele ortak proteinler.....	49
Tablo 6.3.2. Hipokampüs ve kortekstele ortak proteinler.....	50



## 1. ÖZET

### AKIM SİTOMETRİ TEKNİĞİ İLE YENİ DOĞAN FARE BEYNİNDEN BÖLGESEL OLARAK İZOLE EDİLMİŞ SPESİFİK HÜCRELERİN PROTEİN PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Memeli santral sinir sistemi (SSS) yapısal ve işlevsel organizasyonu ile yaşayan organizmalar arasında en karmaşık yapıya sahip olan sistemdir. Bu kompleks sistemin işleyiş mekanizması ise ancak beyni oluşturan hücrelerin, uzaysal ve zamansal konumları ile birlikte ele alınmasıyla anlaşılabilir. Çalışmamızda bu hücrelerin protein profillerinin çıkarılarak tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla; öncelikle yenidoğan farelerdeki hipokampus ve korteks bölgelerine ait hücreler antikolar ile işaretlenerek akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu tespit edilen astrositler ile negatif seçim yöntemi ile analize dâhil edilen nöronlar Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) tekniği ile ayrıştırılarak saflaştırılmıştır. Hipokampus ve korteks bölgelerinden izole ettiğimiz nöron ve astrositlerdeki proteinlerin tanımlanması ve ekspresyonlarının belirlenmesi için kütle spektrometresi tabanlı proteomik teknolojisi kullanılmıştır. Yenidoğan fare hipokampusundan toplam 67, korteksten ise 107 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 45 tanesi hipokampüste, 85 tanesi kortekste bulunurken 22 tanesi her iki bölgede de tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, biyoinformatik yazılımlar kullanılarak tanımlanan proteinlerin sınıfları ve fonksiyonları incelenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada tanımlanan 22 ortak protein arasından 5 proteinin hipokampus bölgesinde astrositlerde, korteks bölgesinde ise nöronlarda daha çok eksprese edildiği gözlenmiştir. Bu 5 proteinden 3'ünün özellikle migrasyon, bölünme ve maturasyon sürecinde rol oynadıkları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akım Sitometrisi, FACS, Hipokampus, Korteks, Proteomiks

## **2. ABSTRACT**

### **IDENTIFICATION OF PROTEIN PROFILES OF REGIONALLY ISOLATED SPECIFIC CELLS FROM NEWBORN MICE BRAIN BY FLOW CYTOMETRY**

Central nervous system (CNS) of mammals constitutes the most complex architecture among other living organisms in terms of structural and functional organization. The operation mechanism of this complex system could solely be deciphered by addressing the spatial and time-wise state of cells that compose brain. In our study, we aimed comprising protein profiles of these cells, along with obtaining their fulfilled identification. For this purpose, hippocampus and cortex cells of newborn mice were tagged with antibodies and analyzed by flow cytometry. Astrocytes that were detected by the analysis and neurons that were included in the analysis by negative selection method were both separated and purified by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). In order to identify the proteins of neurons and astrocytes isolated from hippocampus and cortex regions and define their expression levels, mass spectrometry based proteomic technology was used. Total of 67 proteins from hippocampus and 107 proteins from cortex of newborn mice were identified. Among these proteins, 45 of them were detected in hippocampus, 85 of them were found in cortex and 22 of them were observed in both regions. In addition, identified proteins were screened in terms of their classes and functions by bioinformatics software. In conclusion, among 22 mutual proteins identified in this study, 5 were expressed densely in astrocytes in hippocampus and neurons in cortex. 3 of these 5 proteins were found to play crucial role in migration, division and maturation process.

**Key Words:** Cortex, FACS, Flow Cytometry, Hippocampus, Proteomics

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Memeli santral sinir sistemi (SSS) yapısal ve işlevsel organizasyonu ile yaşayan organizmalar arasında en karmaşık yapıya sahip olan sistemdir. Son yirmi yılda gen teknolojileri ve moleküler biyoloji alanlarında yaşanan gelişmeler ile nöral gelişim esnasında bu karmaşık sistemin nasıl oluştuğu anlaşılmaya çalışılmıştır. Birçok özelleşmiş hücre tipinden oluşan SSS'nin işlevlerini nasıl yerine getirdiğini anlamak için farklı hücre tiplerinin özelliklerini ve bu hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerini anlamak önemlidir. Son yıllarda nöral gelişim sürecinde nöron oluşumu ile nöron-glia dönüşüm sürecini, beyin bölgesel ve zamansal çeşitliliği ile birlikte ele alan çalışmalar önem kazanmaktadır (1). Buna ek olarak bu bölgelerdeki gelişim ve farklılaşma süreçlerinin hücresel boyutta incelenmesi büyük önem taşımaktadır (2).

Beyin; nöron, astrosit, oligodentrosit, mikroglia ve ependimal olmak üzere 5 temel hücre tipinden oluşmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalığı gibi SSS ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda nöronlar en çok incelenen hücre tipi olmuştur. Diğer hücre tipleri ise ürettikleri sinyal molekülleri aracılığıyla veya direkt fiziksel etkileşimlerden dolayı nöronlarla birlikte incelenmesi gereken hücre gruplarıdır (3).

Erişkin farelere nazaran yeni doğan fare beyinde bölünme, migrasyon ve farklılaşma süreçleri aynı anda gözlenebildiği gibi bu süreçler hücresel ve bölgesel farklılıklar da göstermektedirler (4).

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) tekniği spesifik hücre tiplerinin anlık ve canlı olarak izole edilmesine olanak vermektedir. Buna ek olarak hızlı bir şekilde gelişen proteomik teknikleri ile elde edilen hücrelerin protein profillerinin çıkarılarak bu süreçteki analizlerin yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızda yeni doğan fare beyninin korteks ve hipokampus bölgelerindeki spesifik hücreler FACS tekniği ile anlık ve canlı olarak izole edilecek ve proteomik profilleri incelenecektir. Böylelikle fare model çalışmaları öncesinde FACS tekniği ile proteomik tekniklerinin birlikte kullanılarak güvenilir hücresel proteomik verilerinin alınması amaçlanmıştır.

## **4.GENEL BİLGİLER**

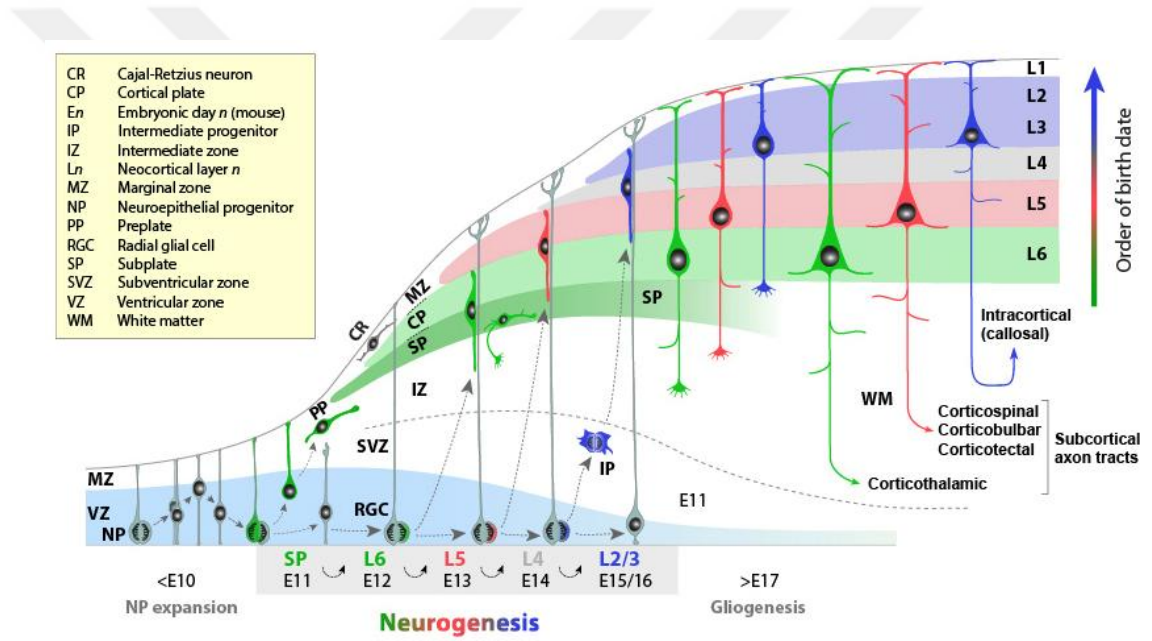
### **4.1. Sinir Sistemi**

Sinir sistemi, vücudun iç ve dışında oluşan değişimlere yanıt vermesini sağlar. Organların ve organ sistemlerinin fonksiyonel aktivitelerini kontrol eder. Sinir sistemi anatomik olarak merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölümde incelenir. Santral sinir sistemi (SSS), kraniyal kavite ve spinal kanal içerisinde yer alan beyin, beyincik ve medulla spinalisten oluşur. Periferik sinir sistemi (PSS), SSS'ye gelen ve SSS'den giden impulsları ileten kraniyal, spinal ve periferik sinirlerden, SSS dışında sinir hücre topluluklarını içeren gangliyonlardan ve özelleşmiş sinir sonlanmalarından oluşmaktadır.

#### **4.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Gelişimi**

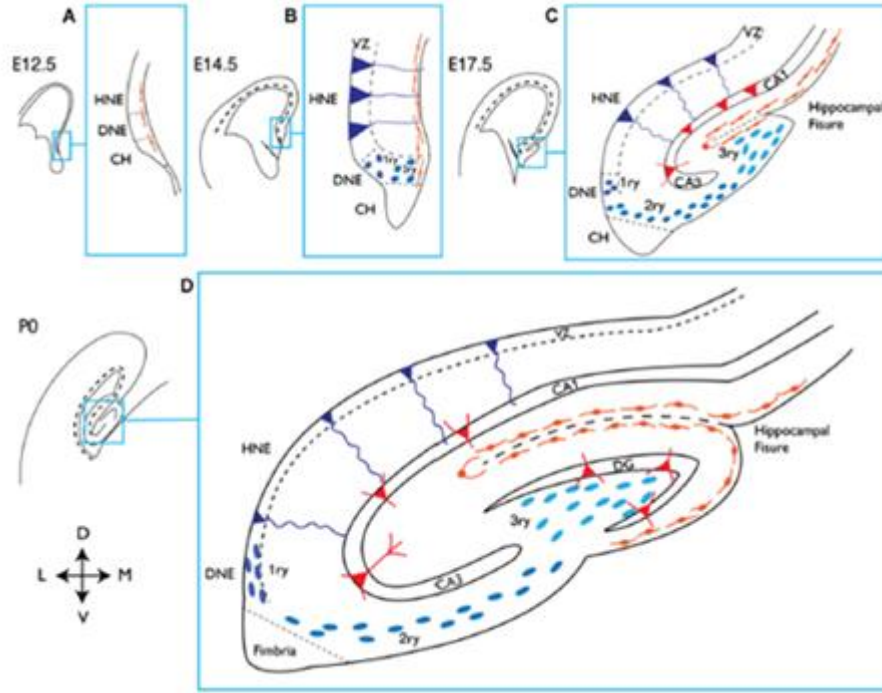
SSS'nin ilk taslağı olan nöral plak, ektodermden köken almaktadır. Nöroepitelyal hücrelerden oluşan nöral plak, simetrik bölünmeler ile genişleyerek nöral tüpü oluşturmaktadır (5). Serebral ventriküle sıralanmış psödostratifiye nöroepitelyumdaki ektodermal kökenli nöroepitelyal hücreler, glial hücre özellikleri taşımaya başlamasıyla radyal glial hücre (RGc) adını alırlar (6). Hücre gövdeleri ventriküler bölgede (VZ) olan radyal glial hücreler pial yönde ışınsal uzantılar yaparak korteksin kalınlaşmasında rol oynarlar. Radyal glialar apikal ve bazal polarite gösterirler. Apikal bölgeleriyle ventrikül ile temas halindeyken bazal bölgeleri ışınsal uzantıları ile meninks, bazal lamina ve kan damarları ile temas halindedir (7). Ayrıca radyal glial hücreler astrosit spesifik glutamat taşıyıcı (GLAST), beyin lipid bağlayıcı protein (BLBP) ve Tenascin C gibi astrositlere özgü işaretleyicileri ifade etmeye başlarlar (8). Nöroepitelyal öncül hücreler farklı bir RG hücre tipini oluşturmak üzere asimetric olarak bölünerek nöronal farklılaşmayı başlatan bazal öncü hücreleri (BP) meydana getirirler. Embriyonik dönemin ortalarında (E9-E10) SSS'de ilk nöronlar oluşmaya başlar (9). BP'ler embriyonik evrede gelişmekte olan telensephalonun alt ventriküler bölgesinde üretilirler (10). BP hücreler dorsal telensefalonda kortikal nöronları, ventral telensefalonda ise bazal ganglia nöronları ve internöronları oluştururlar (11). RG hücrelerden bir kısmı asimetric bölünme ile farklılaşarak bazal öncüller üzerinden özellikle serebral

korteks nöronlarını oluştururlar. Embriyonik dönemin sonlarına doğru (E18,5) RG öncülleri nöron üretimini durdurur ve ilk astrositler görülmeye başlar (12). RG hücrelerin radial (ışınsal) uzantıları kaybolur ve çok kutuplu astrosit morfolojisine dönerler. RG hücreler, yalnızca iki bölge olan lateral ventriküllerin alt ventriküler bölgesi ile (SVZ) hipokampusün dentate girusunda nöron üretiminden sorumlu olurlar (5). Sonuç olarak RG hücrelerin astrositlere dönüşmesi ile nörogenez sonlanmaktadır (13). Oligodendrositler de radyal glial hücrelerin asimetrik bölünmesi sonucu oligodendrositleri veren ara öncü hücreler (oIPC) üzerinden oluşurlar.



Şekil 4.1.1.1. Kortikal nöron ve gliaların gelişim ve farklılaşması (14).

Korteksteki ventriküler germinal katmanların aksine hipokampal germinal alanda subventriküler alan bulunmaz. Böylece çoğalan nöronlar ventriküler alandan hedef bölgelerine direkt olarak giderler.



Şekil 4.1.1.2. Hipokampus embriyonik gelişimi ve anatomisi (15).

Hipokampus ve kortekste hücre katmanları içten dışa doğru oluşur. Böylece erken gelişen nöronlar derin katmanda kalırken geç gelişen nöronlar yüzeye doğru göç ederler. Gelişimsel süreçte marjinal bölgeye göç eden ilk nöronlar reelin sekrete ederler. Reelin sonradan gelen nöronlar için durdurucu etki gösterir. Bunun sonucunda sonradan göç eden nöronlar erken göç eden nöronları geçtikten sonra durarak korteksteki içten dışa katmanlı karakteristik yapı sağlanmış olur (16).

#### 4.1.2. SSS Anatomisi

SSS, omurilik, medulla oblongata, pons, serebellum, orta beyin, diensefalon ve serebral hemisferler olmak üzere yedi ana bölümden oluşur. SSS, duyu bir girdinin uygun bir motor çıktıya dönüştürüldüğü bir sistem olarak düşünülür. SSS'nin en kaudal kısmı olan omurilik deri, eklem ve kaslardan gelen duyu bilgisini alır, gövde ve ekstremitelerin hareketlerini kontrol eder. Omurilik, medulla ve ponsun oluşturduğu beyin sapı ile kafatasına doğru devam eder. Beyin sapı ile direk bağlantılı olan serebellum, hareketin kuvveti ve aralığının kontrolünün yanı sıra motor becerilerin öğrenilmesine katılır. Orta beyin, göz hareketleri, görsel ve işitsel refleksler gibi pek çok duyu ve motor fonksiyonun kontrolünü sağlar.

Diensefalon; SSS'inin geri kalanından beyin korteksine ulaşan bilgiyi işleyen talamus ve otonomik endokrin ve iç organ fonksiyonlarını düzenleyen hipotalamustan oluşmaktadır. İçte motor performansı düzenleyen bazal ganglionlar, bellekten sorumlu hipokampus ve duygusal durumların otonomik ve endokrin tepkilerini düzenleyen amigdala, dışta ise serebral korteks serebral hemisferleri oluşturur.

#### **4.1.3. Hipokampus Anatomisi**

Hipokampus beynin gri cevherinde bulunmaktadır. Hipokampusun uzun eksenini (septotemporal eksen), beynin orta hattındaki septal çekirdekten başlayarak talamusun üzerinden ve arkasından uzanarak temporal lobun başladığı yere kadar ulaşır. Hipokampusun karmaşık anatomik şekli hipokampal bölgeleri doğru tanımlamada yetersiz kalmıştır ve hipokampusun enine eksenini tanımlarken dentat girus proksimal uç, entorinal korteks ise distal uç olarak belirtilir. Hipokampus koronal kesitlerde tipik 'C' harfi şeklinde olup denizatına benzerliğinden dolayı Latince karşılığı olan hipokampus adını almıştır, ayrıca koçboynuzuna benzediği için ise cornu ammonis (CA) adını almıştır.

#### **4.1.4. Hipokampus Histolojisi**

Hipokampal formasyon sitoarkitektonik olarak üç alt bölüme ayrılır. Bunlar dentat girus, hipokampus ve subikulum. Bu üç hipokampal bölüm karakteristik olarak 3 katlı görüntüye sahip olup allokorteks olarak da adlandırılır (17). Bu bölgedeki bağlantılar tek yönlülük gösterir. Parahipokampal bölge ise beş farklı alandan oluşur. Bu alanlar peririnal, entorinal ve postrinal korteksler ile presubikulum ve parasubikulumdur.

Terminolojik olarak hipokampal formasyon ve hipokampus birbirinden farklıdır. Hipokampal formasyon, dentat girus, hipokampus, subikulum, presubikulum, parasubikulum ve entorinal korteksten oluşur. Hipokampal formasyondaki bu temel düzen ve lif yolları tüm memelilerde ortaklık gösterir. Güncel terminolojide CA terimi ise Hipokampusun alt bölgelerini tanımlarken kullanılmaktadır. Hipokampus CA3, CA2 ve CA1 olarak 3 alt bölüme ayrılır (18).

Laminar organizasyon genel olarak tüm hipokampüste benzerlik gösterir. Esas hücresel katmana piramidal hücre katmanı denir. Bu hücre katmanı CA1 bölgesinde daha yoğun iken CA2 ve CA3 bölgelerinde daha seyrek.

#### **4.1.5. Hipokampus Fonksiyonları**

Hipokampus, singulat girus, hipotalamus ve amigdala ile birlikte limbik sistemi oluşturur. Hipokampus, öğrenme ve bellek fonksiyonlarından sorumlu olduğu inanılan, kendine has yapısı ve gelişimi ile beyinde en çok çalışılan bölgelerden biridir.

#### **4.1.6. Serebral Korteks Anatomisi**

Fare serebral korteks ortadan medial pallium(arkikorteks), yanlardan ise lateral pallium (allokorteks) ile sınırlı olup, telensefalonun dorsal palliumundan gelişir (19). Serebral korteksin en büyük kısmını oluşturur.

#### **4.1.7. Serebral Korteks Histolojisi**

Korteks katmanlı bir yapıya sahiptir. kortekse ana nöronlar hakimdir. Bu hücreler eksitator (uyarıcı) özellikte olup dendritlerini saran dikensi yapılar ile uyarıcı verileri alır ve aksonları ile yatay ve dikey yönlerde korteks boyunca yayar. Eksitator nöronlar dışında çok çeşitli inhibitör bulunur. Bu hücreler kortikal aktiviteleri biçimlendirerek ve koordine ederek kompleks modeller oluştururlar.

##### **4.1.7.1. Katman1 (Eksternal Pleksiform, Moleküler, Yüzeysel)**

Korteksin en dış kısmını oluşturan ince pleksustan oluşur. Bu katman piamaterin ve glia limitansın (piamaterin iç yüzünü kaplayan astrosit ayakları) hemen altında yer alır. Bu katmanda neredeyse hiç nöron bulunmaz, bunun yerine kortikal yüzeye uzanan aksonlar, seyrek dağılımlı inhibitör ve Cajal-Retzius nöronlar, glialar ve hücre gövdeleri daha derin tabakada bulunan piramidal nöronların apikal dendritleri bulunur. Bu katmanı diğer katmanlardan ayıran özelliği inhibitör nöron oranının eksitator nöronlara göre çok daha fazla olmasıdır. Burada inhibitör nöronların aksonları eksitator nöronların apikal dendritleri ile sinaps yapar (20).



#### **4.1.7.2. Katman 2/3 (Supragranüler Piramidal)**

Bu katmanda ağırlıklı olarak küçük piramidal hücreler ve çeşitli nöronlar bulunur. Bu hücreler özellikle lokal ve kortikokortikal bağlantılarda görev alır. Her ne kadar farede tek bir katman olarak kabul edilse de katman içinde fonksiyonel ayrılmalara ait işaretler bulunur (21). Piramidal hücreler kendilerine bitişik hücrelere, yakındaki korteks bölgelere ve hatta korpus kallozum üzerinden karşı kortekse projekte olur (22). Bu katmandaki nöronlar dendritik dallanma ve sinaptik oluşumun kontrolünden sorumlu transkripsiyon faktörü olan Cux2'yi eksprese etmeleri ile tanınırlar. (23).

#### **4.1.7.3. Katman 4 (Granüler)**

Özellikle duysal bölgelerde katman 4 öne çıkmaktadır ve talamokortik liflerin ana güzergahı konumundadır(24). Bölge yoğun olarak dikensi stellat hücrelerin sıkı paketlenmiş çekirdeklerinden bant şeklini oluşturması ile granüler korteks adını alır. Çok sayıda talamik afferentler katman 4 e girerek katmanın şeklini değiştirmiştir. Katman 4 ise katman 6 ya ait piramidal nöronların apikal dendritleri bulunur. Böylece talamusa hızlı geri bildirim sağlanabilmektedir (25).

#### **4.1.7.4. Katman5 (Derin Piramidal)**

Bu katmanda korteksin en büyük piramidal nöronları bulunur. Bu nöronların aksonları çeşitli kortikal ve alt kortikal hedeflere uzanır. Daha az sayıda bulunan kortikokortikal kallozal projektör nöronlar tüm katmana yayılmıştır. Bu katmandan çıkan aksonlar striatum, orta beyin ve pontin nukeusa, beyin köküne ve spinal kord gibi alt kortikal alanlara uzanır.

#### **4.1.7.5. Katman6 (Polimorfik)**

Bu katmanda özellikle veri çıkışının yapıldığı yerdir. Çok sayıda kortikotalamik lif bulunur ve yine güçlü bir cevap buraya ulaşır (26). Katman 6 diğer katmanlardan farklı olarak talamik etkileşimi çift yönlü olmasıdır. Talamus üzerinden diğer kortikal bölgeleri etkilemesi ile bu projeksiyonlar kemirgenlerde en önemli kortikokortikal iletişim yolağı olabilir (27). Katman 6 tipik olarak kalın olup

fare korteks derinliğinin büyük bir kısmını oluşturur. Nöron morfolojilerinin çeşitliliği nedeniyle polimorfik katman da denilmektedir (28).

#### **4.1.7.6. Katman 7 (Alt Griseal)**

İnce bir katmandır. Katman 6 dan hücre yoğunluğu az olması ile ayrılır. Katman 7 nin rostral lateral uçları farede claustrum ile birleşir (29). Diğer katmanlardan farklı olarak buradaki nöronlar konnektif doku büyüme faktörlerini eksprese ederler.

#### **4.1.8. Serebral Korteks Fonksiyonları**

Telensefalon gelişen sinir sisteminin ön uç segmentini oluşturur ve santral sinir sistemindeki segmental kalıptan bağımsız olarak gelişen en büyük bölgedir. Bu ilave köken SSS'deki daha basit fonksiyonlardan sorumlu alanlardan ayırarak korteksin bilişsel ve analitik rolünü yansıtmaktadır. Korteks, motor ve duysal afferentleri doğrudan almaz. Bunun yerine talamusta önceden işlenmiş bilgileri alır ve SSS'deki diğer diğer bölgeleri düzenleyerek davranışı kontrol eder. SSS genel olarak duysal ve motor aktiviteleri etkin olarak işler ve yönlendirirken korteksin görevi daha soyuttur. Korteks duysal bilgileri eski tecrübeler ışığında irdeler, birleştirir ve analiz ederek en uygun cevabı oluşturur. Bu soyutsal işlemler korteks (izokorteks) tarafından işlenir.

#### **4.1.9. Hipokampal Nöronlar**

Hipokampüsteki başlıca nöronlar piramidal hücrelerdir ve piramidal hücre katmanının büyük kısmını oluştururlar. Piramidal hücrelerin bazal dendritik saçakları stratum oriense, apikal dendritik saçakları ise hipokampal yarığa uzanır. CA3 ve CA2 bölgesindeki piramidal hücreler CA1 bölgesindeki piramidal hücrelere göre dendritik uzunlukları ve organizasyon açısından farklılıklar gösterir. Dentat girusa en yakın olan CA3 piramidal hücreler 20um çapa ve toplam 8-10 mm dendritik uzunluğa sahiptir. Bu hücreler stratum lacunosum-moleculare katmanına dendritik uzantı yapmaz. Bu nedenle entorinal korteks ile direkt temas ve veri alımı çok düşüktür. Ancak dentat girusun hemen distalinde bulunan CA3 piramidal hücreler hem apikal hem de bazal dendrite uzantıları ile dentat girusta bulunan granül

hücrelerin apikal yosunsu liflerinden veri alımı sağlamaktadır. Piramidal hücreler distale gittikçe hücre gövdeleri büyüyerek 30µm çapa ve dendritik uzantıları da toplamda 16-18mm'ye kadar ulaşır. CA1 piramidal hücreler CA3 teki heterojen dendritik organizasyonun tersine homojenite gösterir (30). CA1 hücre çapı 15µm ile daha küçük dendritik uzantıları ise toplamda 13.5 mm dir. Boyutsal homojeniteye rağmen entorinal korteksten gelen farklı veri alımları ile piramidal hücreler arasında fonksiyonel özellikler kazandırır. Piramidal nöronlar dışında inhibitör özellik taşıyan aranöronlar bulunmaktadır. Bunlar piramidal basket hücreler, avize nöronlar bistratifiye hücreler, O-LM hücreler, horizontal trilaminar hücreler ve radial trilaminar hücrelerdir. Tüm ara nöronlar GABA (Gamma aminobütirik asit) işaretleyicileri için immünpozitifdir.

#### **4.1.10. Serebral Korteks Nöronları;**

Tipolojik çerçeveden bakıldığında kortekste 3 temel nöron grubu bulunur. Bunlardan ilki erken gelişimsel dönemde bulunan Cajal-Retzius nöronlardır. Bir diğeri ise eksitator özellikli ana nöronlardır. Bunlar aksonlarını ve kollaterallerini bölgesel, tüm korteks boyunca ve santral sinir sisteminin diğer bölgelerine ulaştırır. Son grup ise inhibitör özellikli olan ara nöronlardır. Bu hücreler ise daha çok bölgesel devrelerden sorumludur. Korteksin yüzde 62-85 arası ana nöronlar oluşturur. Katman 1 dışında tüm katmanlarda yoğun olarak bulunur. Lokal bağlantılarının yanı sıra korteksteeki projeksiyon yapan nöronların başında gelirler. Deri kortikal beyaz cevhere aksonlar göndererek korteks ile santral sinir sisteminin farklı bölgelerine uzanırlar. Bu aksonlar glutamat, aspartat ya da her ikisini de kullanarak uyarıcı sinapslar oluşturur. Dendritik alan ana nöronların reseptif yüzeylerini oluşturur. Alınan veriler bölgesel, kortikokortikal ve subkortikal kökenlidir. Dendritlere gelen sinapsların büyük kısmı uyarıcı niteliktedir. Lokal ara nöronlardan ise daha az oranda ancak inhibitör sinapslar alırlar.

Piramidal nöronlar, buldukları kortikal bölge ve katmanlara göre boyutsal farklılıklar gösterebilir de morfolojik olarak tutarlılık gösterirler (31). Apikal dendritleri 2/3 katmana kadar ulaşır. En derindeki piramidal dendritler ise katman 4 te sonlanır. Aksonları hem beyaz hem de gri cevhere kadar ulaşabilir. Buna bağlı olarak piramidal hücreler projekte oldukları alanlara göre isimlendirilebilirler. Son

zamanlarda ise piramidal dendrit ve akson analizleri ile ve bunların hedef bölge ilişkileri ile sınıflandırılmaktadır (32).

Ara nöronlar ise eksitator aktivitelelerin tamamlayıcısı rolündedir. Korteksin tüm katmanlarında bulunur ve hem ana nöronlar ile hem de kendi aralarında sinaps yaparlar (33). Dikensi Stellat nöronlar ana nöron alt tipi olarak kabul edildiğinden beri ara nöronlar dendritlerinde dikensi çıkıntılara sahip olmaması ile tanımlanırlar. Aksonları ana nöronlara göre kısadır ve yalnızca bölgesel projeksiyon yaparlar. Birçoğu GABAerjik nöronlardır ve kendi aralarında dendritik bağlar kurarlar. Bu bağlar kimyasal sinapslar yerine gap junction (geçit bölgesi) ile sağlanır. Böylece nöronların afferent aktiviteleleri birbirleri ile uygun ve senkronize hale gelir (34). Ara nöronların sınıflandırılması akson yayılımına bağlıdır (35). Bu sınıflamaya göre basket hücreler, avize hücreler, Martinotti hücreler, Nörogliiform hücreler, Bipolar hücreler, Bitufted hücreler, ve Çift buket hücreler ara nöronları oluştururlar.

#### **4.1.11. Radial Glia Hücreler**

Korteksteki ana nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri veren pallial kök hücrelerdir (36). Erişkin beyninde ise subventriküler bölgede radial glial hücreler astrosit benzeri kök hücreler olarak devamlılıklarını sürdürürler.

#### **4.1.12. Astrositler**

Santral sinir sistemi gri cevherde bulunurlar. İnce uzantıları ile nöronal yüzeyleri ve kan damarların alt membranlarını sararlar. Korteks boyunca her bir astrosit onlarca mikronluk uzantıları ile yüzlerce dendriti ve onbinlerce sinapsı sarar (37). Astrositler nöronal metabolizmayı, uyarılabilirliği ve sinaptik dinamikleri düzenler (38). Sinaptik aralıktan nörotransmitterleri temizleyerek nöronal sinyalizasyonda aktif rol oynar (39). Ayrıca dendrit ve akson uçlarının formasyonunu düzenler devamlılığını sağlar. Astrositler nöronların metabolik ihtiyaçlarını uyum gösterecek şekilde kapiller damar çaplarını değiştirebilirler (40). Astrositler kendi aralarında kurdukları gap junction bağlantıları ile glia limitansın oluşumunda görev alır. Bu yolla astrositler çözünen maddeler için önemli bir taşıma ağı sağlamış olur (41). Astrositler ile nöronlar arasında sürekli olarak fonksiyonel etkileşim içindedir. Nöronlar arası taşınan sinyallerden ortaya çıkan glutamat, astrositlerde bulunan

NMDA reseptörlerini aktive ederek kalsiyum seviyelerini yükseltir ve geri alım taşıyıcılarını düzenler (39). Diğer taraftan astrosit aktivasyonu ile glutamat, D-serin ve adenosin trifosfat (ATP) gibi gliotransmitterler de nöron aktivasyonunda rol oynarlar (42). Astrosit uzantıları ile pre ve postsinaptik nöronal elemanların bu sıkı etkisini ‘üç parçalı sinaps’ olarak adlandırılır. Korteksteki astrositler , konneksin ekspresyonundaki farklılıklar, köken ve iskemiye verdiği cevap ile kendi aralarında bölgesel ve hücrel olarak özelleşmişlerdir (43) (44).

#### **4.1.13. Oligodendrositler**

Oligodendrositler korteks ve özellikle beyaz cevherde miyelinizasyonun oluşumu ve devamlılığında sorumludur. Bu hücreler kortikal nöronlar ile aynı öncü hücrelerden gelişirler. Ayrıca erişkin korteksinde ihtiyaç halinde Olig-2 eksprese eden öncü hücrelerden farklılaşarak gelişirler (45). Periferdeki schwann hücrelerinden farklı olarak her bir oligodendrosit çok sayıda farklı aksonu sarar. Oligodendrositler aksonlar için pasif yalıtımdan çok daha fazladır. Nöronlar ile gap junction ile etkileşim içindedir. Böylece aksonal uzama ve canlılıkları için esansiyel besinleri sağlamaktadır (46).

#### **4.1.14. Polidendrositler / Oligodendrosit Öncü Hücreler**

Bu hücreler NG2 (nöron/glia antijen 2) ile pozitif işaretlendiği için NG2 glia olarak da isimlendirilir. Erişkin santral sinir sisteminde glial kök hücre olarak davranarak beyaz cevherde oligodendrositleri verirler. Gri cevherde ise devamlılığını sürdürerek çeşitli görevler alırlar (45). Bazı kaynaklar bu hücrelerin santral sinir sisteminde nöronlara ve astrositlere farklılaşabildiğini ileri sürerken bazı kaynaklar ise NG2 eksprese eden hücrelerin yalnızca oligpdendrositlere dönüşebildiğini göstermişlerdir (47) (48).

#### **4.1.15. Mikroglialar**

Mikroglialar embriyonik makrofajlardan kaynaklanırlar ve santral sinir sistemine geçerler. Mikroglialar patojenlere karşı ve santral sinir sistemi fonksiyon bozukluklarında bir dizi sitokin ve diğer moleküller salarak cevap oluştururlar. Buna bağlı olarak dinlenme, aktif ve fagositik formlarda bulunabilirler. (49).

#### **4.1.16. Ependimal Hücreler**

SSS'nin sıvı ile dolu kavitelerinin epitel benzeri döşemesini oluşturan hücrelerdir. Tek katlı kübik-prizmatik hücrelerdir ve sıvı transportu yapan hücrelerin morfolojik ve fizyolojik karakteristiklerine sahiptirler. Apikal yüzeylerinde bulunan bağlantı kompleksleri ile birbirlerine sıkıca bağlanmışlardır. Tipik epitelden farklı olarak eksternal lamina bulunmaz. Hücrenin apikal yüzeyinde silya ve mikrovilluslar bulunur. Mikrovilluslar beyin omurilik sıvısının emiliminde görev yaparlar.

Beyin ventrikül sistemi içinde bu epitel benzeri döşeme komşu kapiller halkalarından kaynaklanan materyallerin transportunu ve sekresyonunu yaparak serebrospinal sıvıyı üretmek üzere daha ileri modifikasyona uğramıştır. Modifiye ependimal hücreler ve bunlarla ilişkili kapillere koroid pleksus adı verilir.

#### **4.2. Akım Sitometri ve FACS**

Akım sitometrisi lazer ışınına maruz bırakılan sıvı içinde basınçla akan süspanse partiküllerin (hücrelerin) her birinin çoklu fiziksel özelliklerini anlık olarak ölçen ve analiz edebilen bir cihazdır. Bu ölçülen özellikler partikülün göreceli boyutu, granülaritesi ve floresan yoğunluğunu içermektedir. Hücre ayırma sistemi ile istenilen hücrenin bulunduğu damlacığın elektrik ile yüklenerek farklı toplayıcı tüplere saptırılması sağlanmaktadır. Işık saçılımı gelen lazer ışığının partikül tarafından saptırılmasıyla oluşmaktadır. Bu saçılım miktarı partikülün fiziksel özelliğine (Boyut ve iç yapısı) bağlıdır. FSC ve SSC ölçümlerinin beraber kullanılması ile heterojen hücre popülasyonlarındaki hücre gruplarının niteliksel ve niceliksel analizlerine olanak sağlamaktadır. Hücre ayrıştırılmasında (sorting) öncelikle ayrıştırılmak istenen hücre grubu seçilir, akış hızı sabitlenir ve akan sıvıya sabit bir frekansta ses dalgaları ile titreşim uygulanarak damlacık oluşumu sağlanmaktadır. Böylelikle akan sıvı içindeki hücrelerin damlacık formasyonu sağlanır. Burada elektrikle yüklenen, hücreler değil damlacığın çevresidir. Sonuç olarak istenilen hücreler hücreleri taşıyan damlacıklar yüklenirken diğer damlacıklar nötr halde kalarak plakalardan etkilenmeden ortamdan uzaklaştırılmış olur.

### 4.3. Proteomik Ekspresyon Analiz Yöntemi

Proteomik; kompleks karışımlarda, doku süspanse hücre, kan gibi farklı türde örneklerde eksprese edilen tüm proteinlerin, tanımlanması, yapısal ve fonksiyonel özelliklerini, yerleşimlerini, miktarlarını, post-modifikasyonlarını açıklığa kavuşturulmasını sağlar (50). MS kullanılarak protein ve peptidlerin analizi yüksek duyarlılık ve güvenilirlikte yapılmaktadır. MS kullanılarak tripsin ile parçalanmış proteinlerden elde edilen peptidlerin kütle/yük oranları belirlenip, daha sonrasında MS/MS analizi yapılarak sekans bilgisi elde edilir. Dizilim bilgisi elde edilen peptidlerin, biyoinformatik yazılımlar kullanılarak proteomik profillerinin tanımlanması ile proteinlerin hücre içindeki yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile ekspresyon oranı, post-translasyonel modifikasyonlar gibi bir çok bilgiye ulaşmak mümkündür. Yapılan bu çalışmada, etiketsiz LC-MS<sup>E</sup> teknolojisi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntem ile daha az protein miktarından herhangi bir etiketleme yapmadan güvenilir ve çok miktarda protein tanımlaması yapılabilmektedir.

## 5. MATERYAL ve METOD

### 5.1. Materyal

#### 5.1.1 Ekipmanlar

Tablo 5.1.1.1. Deneyde Kullanılan Ekipmanlar

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodları
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R
Multi-Therm Shaker	Benchmark Scientific	H5000-HC
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Q32866
SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometry	Waters	
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	ACQUITY UPLC, Waters	
nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	ACQUITY UPLC, Waters	
Confocal Microscope	Zeiss	LSM 780
Ultrasonicator	Bandelin Sonarex	
LC-Vial	Supelco	29413-U
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
Influx Cell Sorter with Bioprotect IV Safety Cabinet	BECTON DICKINSON	
Laminar Flow	ESCO	
-20 dolap	Thermo Scientific	
-80 dolap	Arctiko	
+4 dolap	Uğur	
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB



dH <sub>2</sub> O Cihazı	Millipore	ZRQSV8WW
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000
pH metre	Isolab	pH7110
Spin down santrifüj	Sprout	

### 5.1.2 Deneyde kullanılan materyaller

**Tablo 5.1.2.1.** Deneyde kullanılan materyal listesi

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
L15	Sigma	L5520
Neuro Basal A (NBA)	Gibco	A12475
Glutamax	Invitrogen	35050-061
Antibiyotik	Sigma	A5955
Hibernate A	Gibco	A1247501
Papain	Sigma	P4762
Deoksiribonükleaz I (DNAz)	Sigma	D4513
Fetal dana serumu (FCS)	Sigma	F9665
B27 suplementi	Invitrogen	17504-044
Antibiyotik	Sigma	A5955
Fosfat Tamponu	Sigma	P3288
BSA	Sigma	A9418
Triton X	Merck	K26456203 924
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma	D9542

Sodyum Azid	Sigma	S8032
Tween 20	Merck	S95415 814
Keçi serumu	Sigma	G6767
At Serumu	Gibco	16050130
Hoechst 33342 Solüsyon	BD Biosciences	561908
Propidium Iodide Solüsyon	BD Biosciences	556463
Anti-GFAP DyLight 550	Novus Biologicals	NBP2-33184R
Anti-Neun Alexa Fluor 555	Millipore	MAB377A5
anti-GLAST-PE	BD Biosciences	130-095-821
anti-A2B5 Alexa Fluor 488	Novus Biologicals	FAB1416G
anti-O4-APC	Miltenyi Biotec	130-109-153
Anti-CD31 PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	562861
anti-CD45 APC-Cy7	BD Biosciences	557659
anti-CD24 BV605	BD Biosciences	563060
anti-NG2	Merck	AB5320
anti-NCAM-1	R&D Systems	MAB7820
Goat Anti-Rat F(ab)2 IgG (H+L) APC	R&D Systems	F0113
goat anti-rabbit IgG, F(ab')2-PE-Cy7	Santa Cruz	sc-3845
Anti-CD16/32	eBioscience	14-0161-85
IgG2a-PE	Miltenyi Biotec	130-091-835
IgM Alexa Fluor 488	Novus	DDXCM04A488

REA Control (S)-APC	Milteni Biotec	130-104-614
PerCP-Cy5.5 Rat IgG2a, κ	BD Biosciences	550765
APC-Cy7 Rat IgG2b κ)	BD Biosciences	552773
BV605 Rat IgG2b, κ	BD Biosciences	563145
Hücre filtresi 70 µm	Corning Inc.	CLS431751
5 ml polipropilen tüp	Corning Inc.	352002
Rainbow Calibration Particles 8 peaks	BD Biosciences	559123
FACS AccuDrop Beads	BD Biosciences	345249
UPX™ Universal Protein Extraction Kit	Expedeon	44101
Proteases Inhibitor Coctail	Sigma-Aldrich	P8340
Pur-A-Lyzer Mini 6000 Dialysis Kit	Sigma-Aldrich	PURN60100-1KT
FASP™ Protein Digestion Kit	Expedeon	44250
Trypsin	Thermo Scientific	90055
Formik Asit	Fluka	94318-50mL-F
Acetonitrile Hypergrade for LC-MS LiChrosolv®	Merck	100029.2500
Water for Chromatography LC-MS Grade LiChrosolv®	Merck	15333
[Glu1]-Fibrinopeptide B Standart	Waters	700004729

## 5.2. METOD:

### 5.2.1. Deney Grupları

Deney hayvanı olarak İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezinde (MEDİTAM) üretilen, yenidoğan Balb-C ırkı albino fareler kullanıldı. Çalışmamız için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (İMÜ-HADYEK) onay alındı.

Çalışmada 20 adet yeni doğan 0-24 saatlik fare kullanıldı. Fareler %70'lik etanolden geçirilerek steril hale getirildi. Dekapitasyon işlemi ile hayvanlar sakrifiye edildi. Baş kısmı L15 medium içeren silikon tabanlı petri üzerinde sabitlendi ve beyini çıkarıldı. Çıkarılan beyin üzerinden, stereo mikroskop altında meninksler beyin dokusuna zarar vermeden soyuldu. Korteks ve hipokampus bölgeleri çıkarıldı.



**Resim 5.2.1.1.** Yeni doğan fareden hipokampus ve korteks dokularının çıkarılması. 1: Yeni doğan farenin kafası dekapite edilerek diseksiyon mediumu içeren silikon kaplı petri içerisine alınarak sabitlendi. 2: Beyin çıkarıldı. 3: Tüm beyinden iki adet hipokampus ve korteks dokusu çıkarıldı.

### 5.2.2. Kültürde kullanılan besiyerleri

#### 5.2.2.1. Diseksiyon besiyeri

Diseksiyon sırasında kullanılacak besiyeri Hybernate A içerisine %1 antibiyotik ve %1 glutamax eklenerek aseptik koşullarda hazırlandı. Diseksiyon sırasında soğuk olarak kullanıldı.

### **5.2.2.2. Kültür besiyeri**

Dokunun enzimatik olarak yumuşatılması sırasında kullanılacak olan kültür besiyeri L15 içerisine %1 glutamax, %1 antibiyotik ve %2 B27 takviyesi eklenerek aseptik koşullarda hazırlandı. Enzimatik muamele sırasında +4 °C sıcaklıkta kullanıldı.

### **5.2.2.3.Re-ekspresyon besiyeri:**

Hücre yüzey proteinlerinin re-ekspresyonu sırasında kullanılacak re-ekspresyon besiyeri NBA içerisine %1 glutamax, %1 antibiyotik, %2 B27 ve %5 HS eklenerek aseptik koşullarda hazırlandı.

### **5.2.3. Hücrelerin elde edilmesi**

Farelerden elde edilen sağ ve sol korteks dokuları her biri eşit olacak şekilde diseksiyon besiyeri içinde dört parçaya ayrıldı. Sağ ve sol hipokampus ise her biri eşit olacak şekilde yine diseksiyon besiyeri içerisinde iki parçaya ayrıldı. Dokular %1'lik papain içeren kültür besiyeri içerisine alınarak 40 dakika, +4 °C'de ajitatörde inkübe edildi. Enzimatik parçalanmanın sonunda üstteki besiyeri çekip atıldı. Dokuların üzerine %10 FCS ve %1 DNazI içeren kültür besiyeri eklendi. Dokular homojen bir hücre süspansiyonu haline gelene kadar ucu yakılarak düzeltilmiş pastör pipetinden geçirilerek mekanik olarak ayrıştırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi, supernatant atıldı. Hücre pelleti re-ekspresyon besiyeri içerisinde 3 saat 35 °C'deki su banyosunda inkübe edildi. FACS yapıldı. FACS sonrası nöronlar 72 saat kültüre edildi.

### **5.2.4. Akım Sitometrisi Analizi**

Beyin dokularından elde edilen hücre süspansiyonları Thoma lamı ile sayılarak 1 milyon/ml hücre olacak şekilde ayarlandı. Sayım sonrası hücre süspansiyonlarına, kümelenmenin engellenmesi için, 50 mg/ml oranında Deoksiribonükleaz I (Sigma, D4513) ile eklendi. Örnekler 70 µm'lik filtrelerden geçirildi. Hücre süspansiyonları 5 ml'lik polipropilen tüp içerisine alındı.

Akım sitometrisi cihazının lazer kalibrasyonu için 8 boyalı parlak floresan ışığa veren boncuklar, hücre ayırıştırma (sort) kalibrasyonu için parlak floresan ışığa veren boncuklar kullanıldı. Kalibrasyon işlemlerinin ardından polipropilen tüpler içerisindeki hücre süspansiyonları akım sitometrisi cihazına yüklendi.

Örnekler Hoechst 33342 Solution ile tüm çekirdekli hücrelerin tespiti, Propidium Iodide Stainin Solution ile ölü hücre ayrımı yapıldı.

Örnekler anti-GLAST-PE, anti-A2B5 Alexa Fluor 488, anti-O4-APC, Anti-CD31 PerCP-Cy5.5, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD24 BV605 konjuge antikorlar ve anti-NG2, anti-NCAM-1 konjuge olmayan antikorlar ile önce örnek başına tek renkli boyama ardından örnek başına tüm antikorlar kullanılarak çok renkli boyama yapıldı. Konjuge olmayan antikorlar için örneklere Goat Anti-Rat F(ab)2 IgG (H+L) APC, goat anti-rabbit IgG, F(ab')2-PE-Cy7 sekonder antikorlar eklenerek boyamalar tamamlandı.

Antikor ile işaretlenmiş olan hücrelerdeki özgün olmayan bağlanmaları bloklamak için CD16/32 antikorunu kullanıldı. Hem konjuge hem de konjuge olmayan antikorlar ile işaretlenmiş hücrelerdeki özgün olmayan bağlanmalardan kaynaklanacak olan zemin boyanmalarının tespitinde konjuge antikorlar için IgG2a-PE, IgM Alexa Fluor 488, REA Control (S)-APC, PerCP-Cy5.5 Rat IgG2a,  $\kappa$ , APC-Cy7 Rat IgG2b  $\kappa$ , BV605 Rat IgG2b,  $\kappa$  izotip antikorlar ile konjuge olmayan antikorlar için Goat Anti-Rat F(ab)2 IgG (H+L) APC, goat anti-rabbit IgG, F(ab')2-PE-Cy7 sekonder antikorlar ile işaretlenmiş örnekler kullanıldı.

Boyanmış olan örneklerdeki hoechst, anti-CD24, anti-NCAM, anti-A2B5, anti-CD31, propidium iodide, anti-GLAST, anti-NG2, anti-O4, ve anti-CD45 sinyallerinin akım sitometrisi ile değerlendirmesi için sırasıyla 355nm, 405nm, 488nm, 561nm ve 640nm lazerler ile 460/50, 520/35, 530/40, 670/30, 593/40, 750LP filtre kombinasyonu kullanıldı. Akım sitometrisi analizi sırasında örnekler içerisindeki hücre dışı partiküllerin analiz dışında bırakılması için yalnızca Hoechst ile işaretlenmiş olan hücreler alt grup olarak seçildi ardından bu hücreler arasından ölü hücre çekirdeklerini boyayan Propidium iodide ile ölü hücreler analiz dışına alınarak canlı hücreler belirlendi. Belirlenen canlı, ölü ve hücre dışı partiküller sırası

ile Forward Scattered (FSC) ve Side Scattered (SSC) değerlendirmeleri yapılarak canlı hücrelerin boyutsal ve granüler yapısı tespit edilerek sonraki incelemeler için bu ayırma dayalı belirlenmiş hücreler içerisinde yapıldı. Örneklerdeki hücre çiftleri ve hücre kümelerinin analiz dışı bırakılması (doublet and multiplet discrimination) için sırasıyla Side Scattered-W (SSC-W)/SSC-H değerlendirmesi ve Forward Scattered-W (FSC-W)/FSC-H değerlendirmesi yapılarak yalnızca tekli hücreler elde edildi.

Belirlenen hücrelerin (50.000 hücre) tüm hücre popülasyonu içerisindeki oranları istatistiksel olarak belirlendi.

### **5.2.5. İmmünohistokimyasal Boyama**

Beyin örneklerinden elde edilen hücreler 72 saat kültür ortamında tutulduktan sonra immünohistokimyasal metot ile boyandı. Elde edilen hücreler %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi. Fiksasyonun ardından hücreler 1X PBS ile yıkandı ve özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloke etmek için hücrelere bloklama solüsyonu (%3 BSA, %0,1 Triton X-100, %0,1 sodyum azid, %1 keçi serumu) eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bloklamadan sonra belirli oranlarda sulandırılan anti-Neun (1/1000 sulandırma) ve anti-GFAP (1/500 sulandırma) konjuge antikorları eklendi. Çekirdek boyaması için 1:1000 oranında PBS içerisinde sulandırılmış DAPI eklendi ve PBS ile yıkandı.

### **5.2.6. Mikroskopik İnceleme**

Sort sonrası hücreler Zeiss AxioZoom mikroskop ile 20X, 40X ölçekler ile görüntülendi.

### **5.2.7. Protein Profili Analizi**

#### **5.2.7.1. Örnek Hazırlama**

Floresan aktive hücre ayrıştırma tekniği ile korteks ve hipokampus bölgelerinin her birinden 1 milyon canlı nöron ve astrosit olacak şekilde LoBind tüplere alındı.

### **5.2.7.2. Hücrelerden protein eldesi**

Ayrıştırılan hücelere %1 proteaz inhibitör kokteyli (PIC) içeren AmBic eklendi. Hüceler ultrasonik homojenizatör ile parçalandı. Parçalanmış hüceler mevcut hacimleri kadar %1 PIC içeren UPX (Universal Protein Extraction Kit) tampon çözeltisi eklendi. Karışım 100 °C’de 5 dakika kaynatıldı ve 4 °C’de 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 15000g’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant LoBind tüplere alındı.

### **5.2.7.3. Mikrodiyaliz**

FACS tamponu içinde ayrıştırılmış olan hücelerden elde edilen proteinlerin tuzlardan uzaklaştırılması için mikrodiyaliz uygulandı. Bunun için mikrodiyaliz tüplerine 50mM AmBic eklendikten sonra 50mM AmBic içeren beher içerisinde manyetik karıştırıcıda 10 dakika membranların dengelenmesi için bırakıldı. Tüplere örnekler eklenerek 12 saat süre bekletildi. Diyaliz sonrası örnekler LoBind tüplere alındı.

### **5.2.7.4. Protein konsantrasyon tayini**

FASP metodu ile triptik peptid elde edilmesi için 50 ug protein gerekmektedir. FASP metodunda kullanılacak yeterli örnek miktarının belirlenebilmesi için protein konsantrasyon tayini yapıldı. Bunun için *Qubit 2.0 fluorometre* cihazı protokole uygun olarak kullanıldı. Cihaz kalibrasyonu için *Qubit assay kit* içinde bulunan 3 standart ölçümü alındı. *Qubit assay* kit içinde bulunan protein belirteçinden 1 ul alınarak yine kit içerisinde bulunan tampon çözeltisi içine toplamda 200 ul olacak şekilde eklendi. Karışımdan örnek başına 198 ul alınarak üzerine 2 ul örnek çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Örneklerin protein konsantrasyon ölçümleri alınarak her bir örnekten gerekli olan 50ug protein hesaplanarak elde edildi.

### **5.2.7.5. Proteinlerden triptik peptid eldesi**

Triptik peptid eldesi için FASP kiti protokole uygun olarak kullanıldı. FASP kiti içinde bulunan filtreli tüplere protein miktar tayini yapılmış olan her bir örnekten 50 ug protein içeren çözelti üzerine 230 ul’yi tamamlayacak şekilde AmBic içinde



çözünmüş üre eklendi. 14000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Filtre üzerine 200 ul üre eklenerek tekrar 14000g'de 15 dakika santrifüj edildi. 10X IAA solüsyonu üre ile 1X olacak şekilde seyreltilerek filtre üzerine eklendi. Örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 15 dakika 14000g'de santrifüj edildi. İşlem iki defa tekrarlandı. Bu yıkamalar sonucu filtre çıkarılarak tüpte biriken çözelti atıldı. 100 ul 50mM AmBic solüsyonu eklenerek 14000g'de 10 dakika santrifüj edilir. Bu aşama 2 defa tekrarlandıktan sonra 1 ug / 75 ul olacak şekilde tripsin enzimi eklenir. Tüpler gece boyu 37 °C'de inkübe edilir. Filtre altındaki tüpler değiştirilir. Filtre üzerine 40 ul 50mM AmBic eklenerek 14000g'de 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlem tekrarlandıktan sonra 50 ul 0,5M NaCl solüsyonu eklenerek 10 dakika 14000g'de santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki triptik peptidler LoBind tüplere alınarak liyofilize edilir. Liyofilizasyon sonrası örnekler 20 ul 0,1 formik asit çözeltisinde çözdürülür ve ikinci kez *Qubit* cihazı ile konsantrasyon tayini yapıldı.

#### **5.2.7.6. Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi**

Her bir deneysel gurup için 100 ng lık triptik peptitler % 0.1 Formik asit ile tamamlanarak LC viallere konulur. LC viallerindeki karışımdan 2 µl enjekte edilerek LC-MS/MS system (nanoACQUITY ultra pressure liquid chromatography (UPLC) ve SYNAPT high definition mass spectrometer (waters) cihazları yardımı ile analiz edildi. Analitik kolon (BEH C18, 1.7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm) (Waters) % 97 lik mobil faz A ( % 0.1 formik asit içeren yüksek saflıkta su) ile dengeye getirildi. Kolon sıcaklığı 55 °C ye ayarlandı. Peptitler % 99 lik mobil faz A ( % 0.1 formik asit içeren yüksek saflıkta su) ie trap kolonda (Symmetry C18 5 µm, 180 µm i.d. × 20 mm) (Waters) alıkonulduktan sonra analitik kolonda (BEH C18, 1.7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm) (Waters) mobil faz B (%0.1 formik asit içeren yüksek saflıkta ACN) ile %3 den % 40 a kadar değişen doğrusal bir gradient ile 400 nl/dk akış hızında peptitler elüsyon edildi.

Veri bağımsız edinim yöntemi (*Data independent acquisition mode (HDMS<sup>E</sup>)*), pozitif iyon V modu, MS ve MS/MS fonksiyonları (0.7 saniye aralıklar

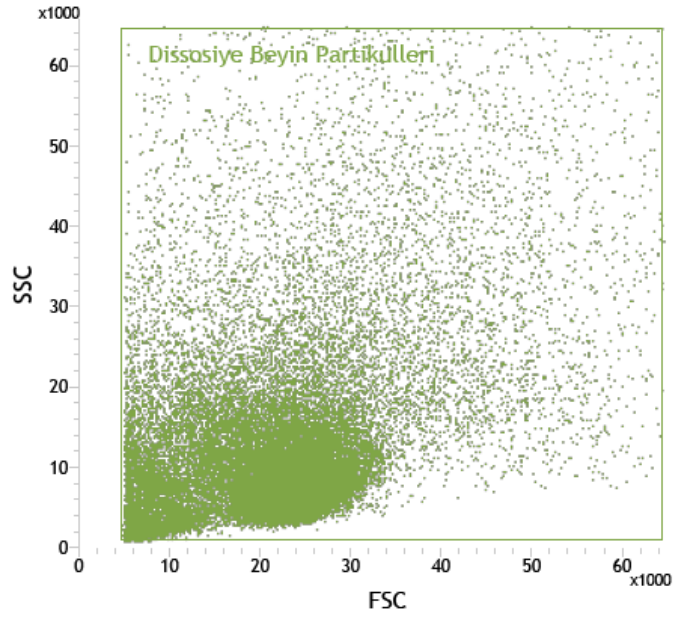
ile 2V düşük enerji ve 15-40V yüksek enerji) kullanılarak peptit kütle/elektriksel yük (*mass/charge; m/z*) değerleri ve ürün iyon bilgisi elde edildi. Glu-fibrinopeptit (iç kütle kalibrantı) 500 nl/dk hız oranı ile enjekte edildi. *m/z* değeri 50-1900 olarak analiz edildi.



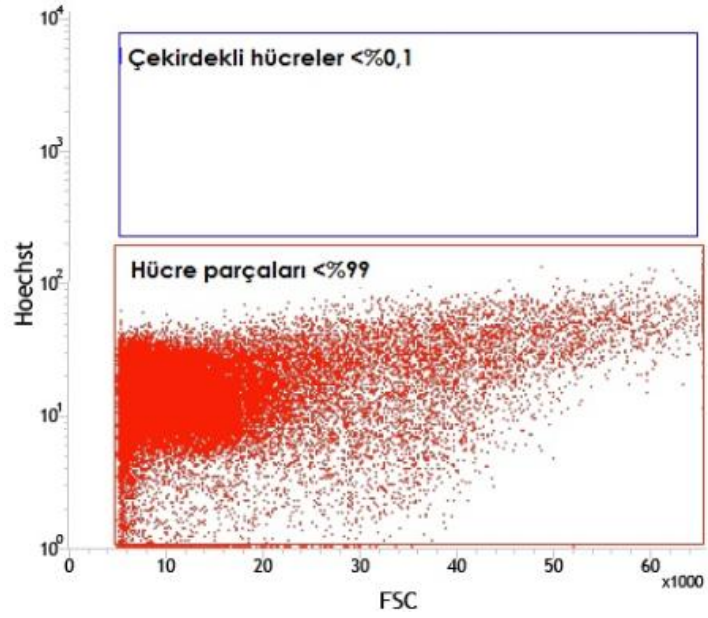
## 6. BULGULAR

### 6.1. Akım Sitometrisi

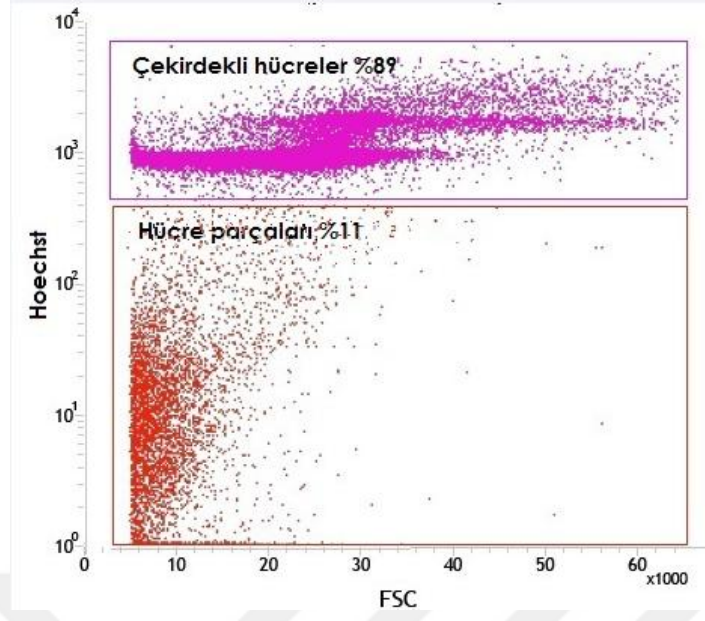
Yeni doğan fare beyinlerinden alınan hipokampüs ve kortek örnekleri akım sitometrisinde incelendiler. Öncelikle beyin disosiyasyonu sonucu elde edilen süspanse partiküllerin boyutsal grafikleri çıkarıldı (Şekil 6.1.1). Ardından Hoechst çekirdek boyası ile boyanarak çekirdekli hücrelerden hücre parçaları ayrımı sağlanırken, propidium iodide ile canlı ve ölü hücre ayrımları sağlandı (Şekil 6.1.2-7). Çekirdek boyaları ile boyanmış beyin partiküllerinin boyutsal grafiği çıkarıldığında canlı hücrelerin, ölü hücre ve hücre parçalarından daha büyük olduğu gözlemlendi (Şekil 6.1.8-12). Boyutsal farklılık kullanılarak göreceli olarak daha büyük partikülleri içeren noktacıklar kapılandı (Şekil 6.1.13). Böylece sadece boyutsal kapı alımı ile canlı hücreler %97.5 oranında elde edilmiş oldu (Tablo 6.1.1). Bu bilgi ışığında serebral korteks ve hipokampüs dokularından elde ettiğimiz hücre partiküllerinden çekirdek boyaları kullanılmadan canlı hücre kapıları alındı (Şekil 6.15,24). Korteks ve hipokampüs dokuları GLAST, A2B5, NG2, O4, CD45, CD31, CD24, PCA-NCAM dan oluşan sekiz farklı antikor ile işaretlendiler. Kullanılan her antikor için aynı renkte izotip antikor kullanılarak özgün olmayan bağlanmalardan gelen sinyaller asgari düzeye indirildi. Pozitif ve negatif kontrol örnekleri üzerinden izotip ve antikorlara ait sinyaller için sınır belirlendi. Negatif kontrol örneklerinde %1 den küçük olacak şekilde ayarlandığında kortekste yaklaşık %26 astrosit, %17 glia ile sınırlanmış öncü hücreler, %7 oligodendrosit öncü hücreler, %3 oligodendrositler, %1,5 immün hücreler (mikroglialar) ve %1,5 ependimal hücre popülasyonu gözlenirken hipokampüste yaklaşık %23 astrosit, %16 glia ile sınırlanmış öncü hücreler, %2 oligodendrosit öncü hücreler, %2,5 oligodendrositler, %1,5 immün hücreler (mikroglialar), ve %1 ependimal hücre popülasyonu gözlemlendi (Şekil 6.1.16-32). Tüm canlı nöronları işaretleyebilecek bir antikor bulunmadığı için antikorlar ile işaretlenmeyen hücreler nöron olarak kabul edildi (Tablo 6.1.2-3). GLAST ile işaretlenen hücreler ise astrosit olarak analize dahil edildi (Tablo 6.1.4-5) Nöron ve astrosit olarak kabul edilen hücreler FACS tekniği ile ayrıştırıldılar. Fikse edilen hücrelerin immünohistokimyasal boyamaları pozitifdir.



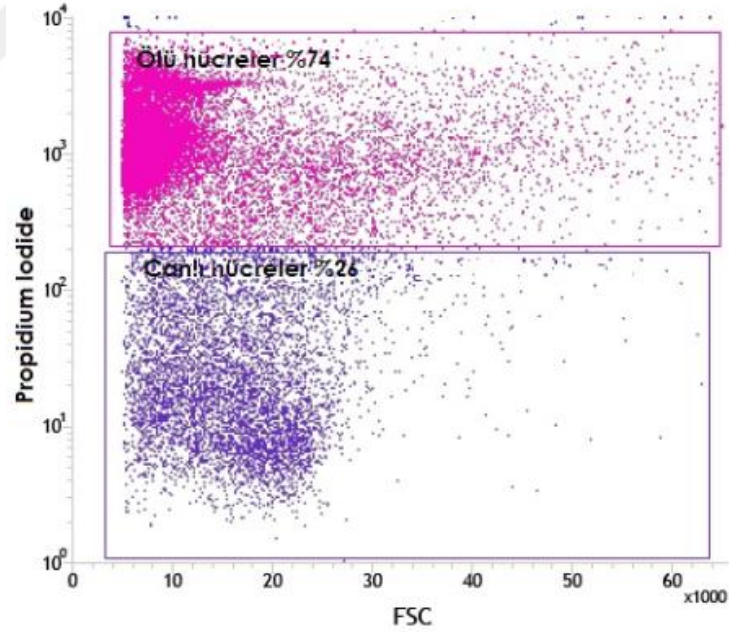
Şekil 6.1.1. Dissosiyasyonu sonucu boyutsal (FSC) ve granülaritelerine (SSC) göre serebral korteksteki hücre ve hücre parçalarının dağılımı



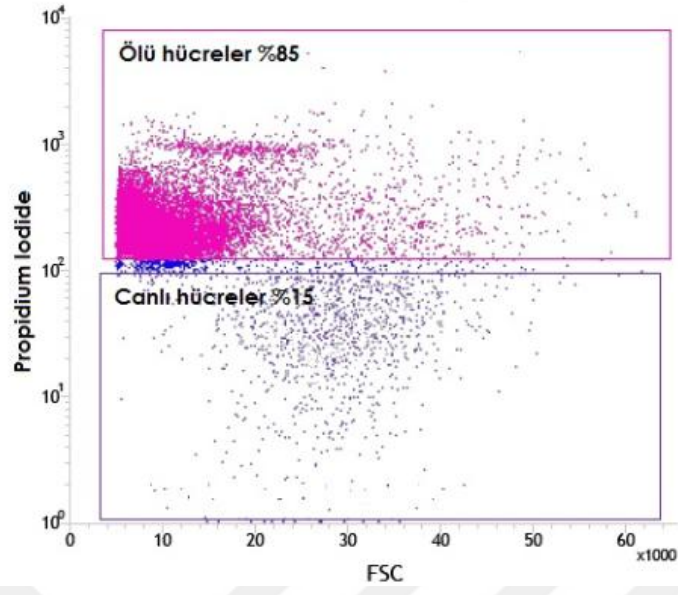
Şekil 6.1.2. Negatif kontrol (Çekirdek boyası bulunmayan)



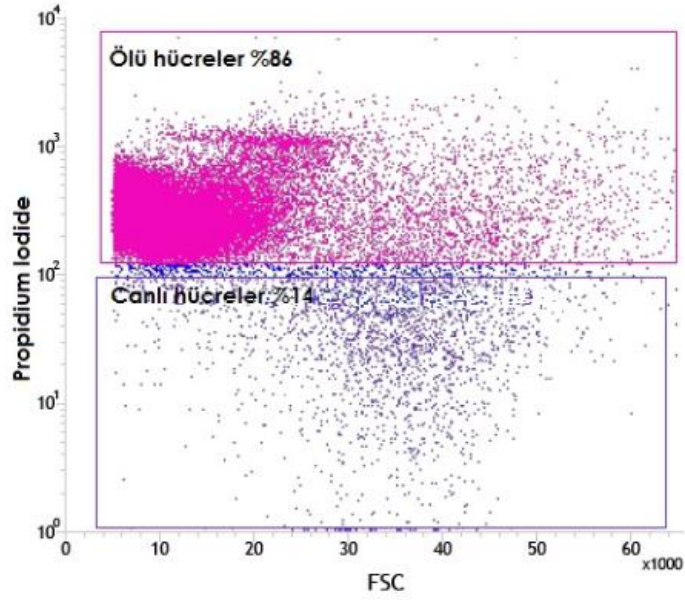
Şekil 6.1.3. Kapılama işlemi ile popülasyon içinden çekirdekli hücre ve hücre parçalarının ayrımı



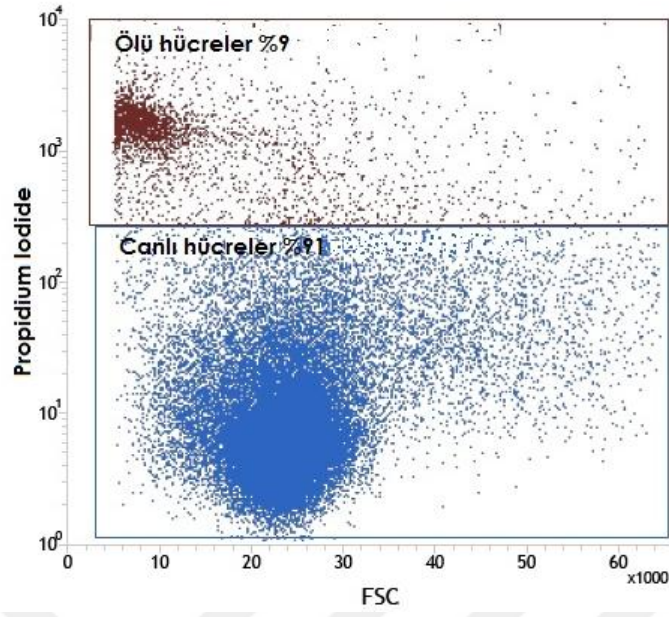
Şekil 6.1.4. Trypsin ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı



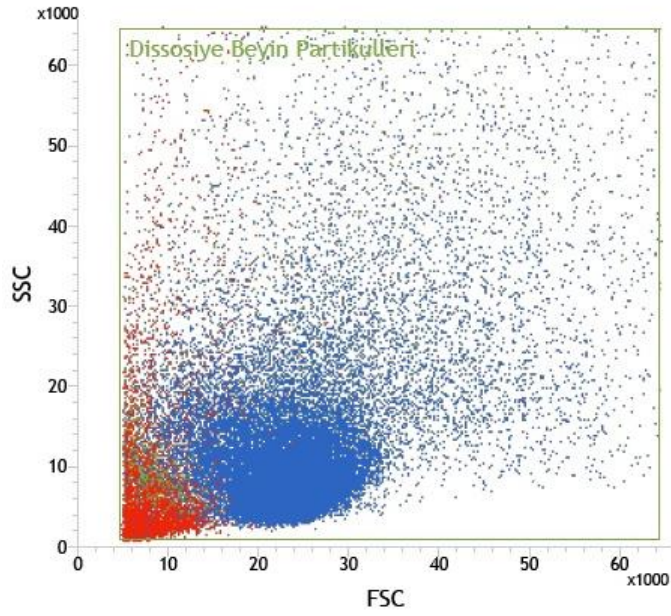
**Şekil 6.1.5.** Accutase ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı



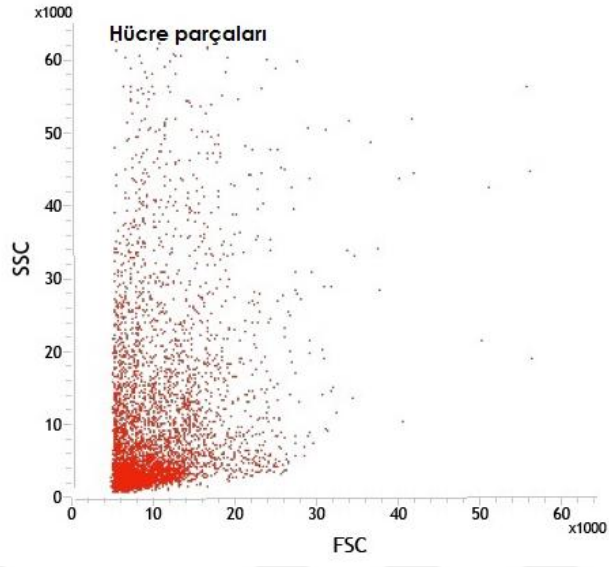
**Şekil 6.1.6.** TrypLE ile dissosiyeye edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayrımı



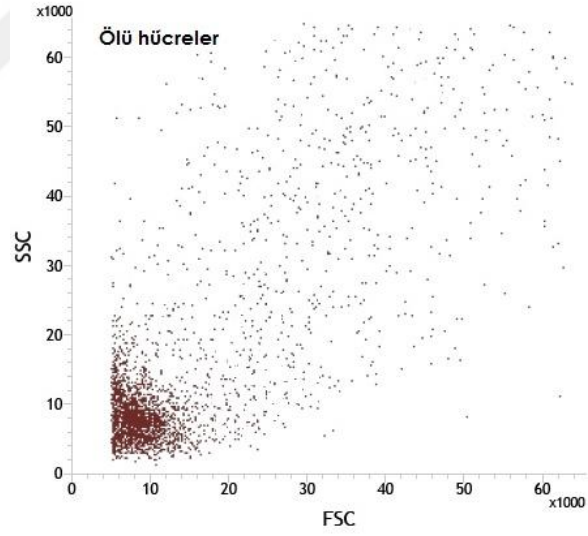
Şekil 6.1.7. Papain ile dissosiyasyon edilen hücrelerin kapılama işlemi ile çekirdekli hücreler içinden canlı ve ölü hücre ayırımı



Şekil 6.1.8. Boyutsal (FSC) ve granülarite (SSC) grafiğine göre canlı hücre (mavi renk), ölü hücre (kahverengi) ve hücre parçalarının (kırmızı renk) ayırımı.

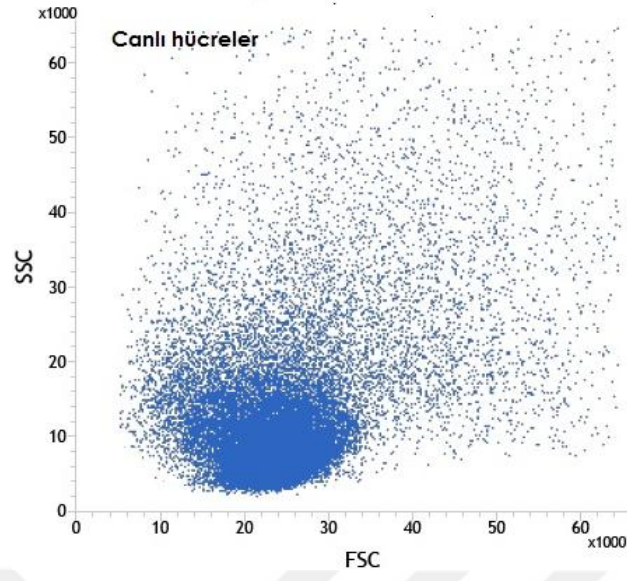


Şekil 6.1.9. Akım sitometrisinde hücre parçalarının boyutsal dağılımı

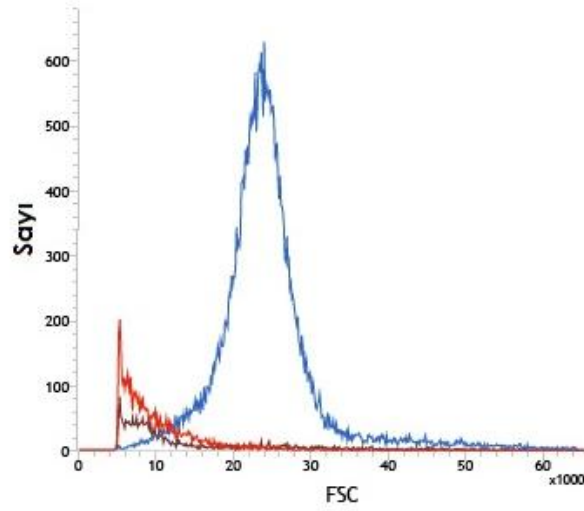


Şekil 6.1.10. Akım sitometrisinde ölü hücrelerin boyutsal dağılımı

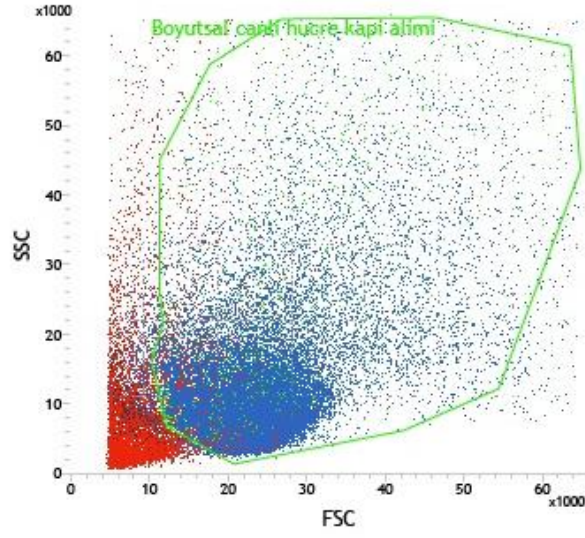




Şekil 6.1.11. Akım sitometrisinde canlı hücrelerin boyutsal dağılımı



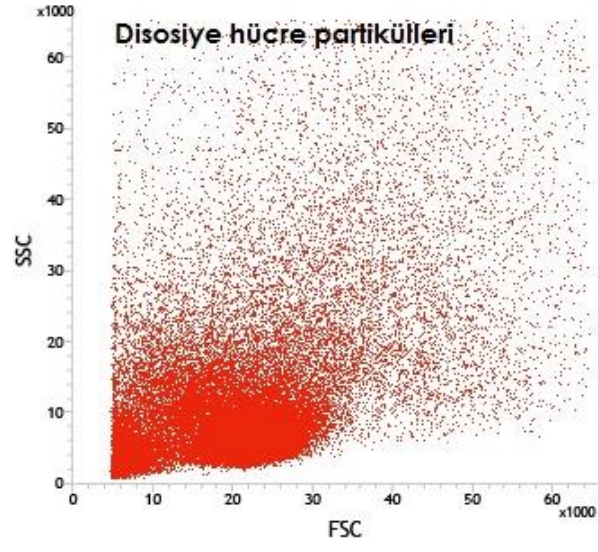
Şekil 6.1.12. Boyutsal (FSC) histogram grafiğinde canlı hücre (mavi renk), ölü hücre (kahverengi) ve hücre parçalarının (kırmızı renk) ayrımı



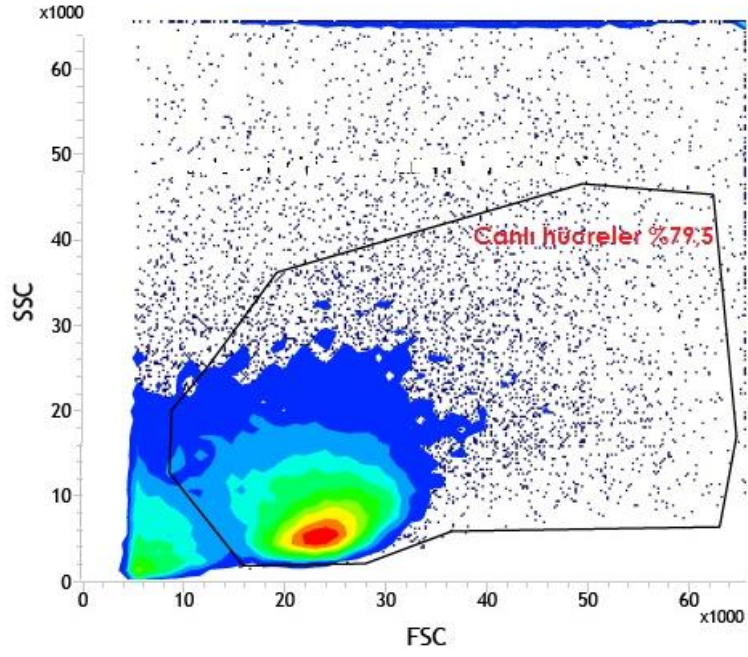
Şekil 6.1.13. Kapılama işlemi ile boyutsal (FSC) ve granülarite (SSC) grafiğinde canlı hücrelerin çekirdekli ölü hücrelerden ve hücre partiküllerinden ayrımı.

Tablo 6.1.1. Canlılık ile boyutsal kapılama arasındaki ilişki

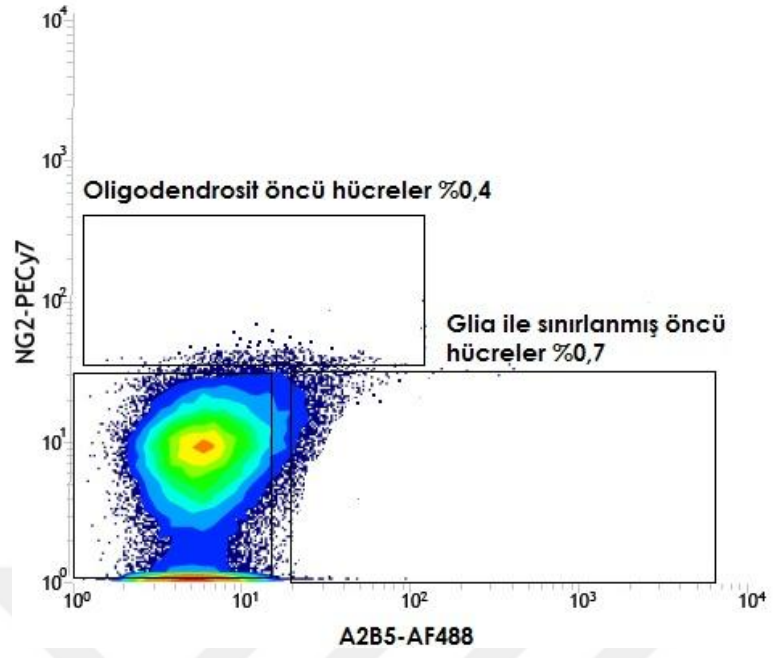
Popülasyon	Event sayısı	% Toplam	% Grup
Beyin disosiyasyon partikülleri	50000	100%	-----
↳ Çekirdekli hücreler	44540	89.09%	89.09%
↳ Ölü Hücreler	4009	9.68%	10.86%
↳ Canlı Hücreler	40531	81.02%	91.01%
↳ Boyutsal canlı hücre kapısı	39508	79.01%	97.50%
↳ Hücre Parçaları	5226	10.45%	10.45%



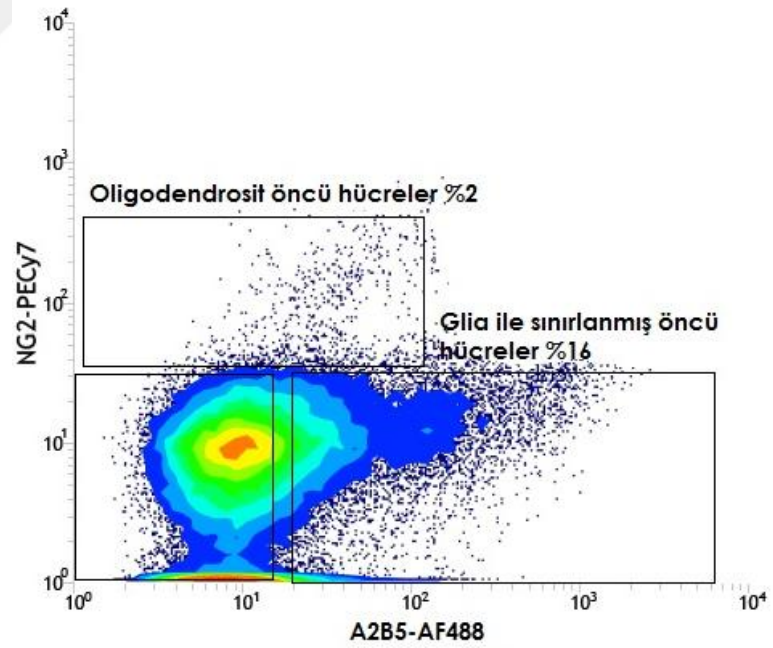
Şekil 6.1.14. Dissosiyasyonu sonucu boyutsal (FSC) ve granülaritelerine (SSC) göre serebral korteksteeki hücre ve hücre parçalarının dağılımı



Şekil 6.1.15. Fiziksel parametreler (FSC ve SSC) ile canlı hipokampal hücre kapısının seçimi

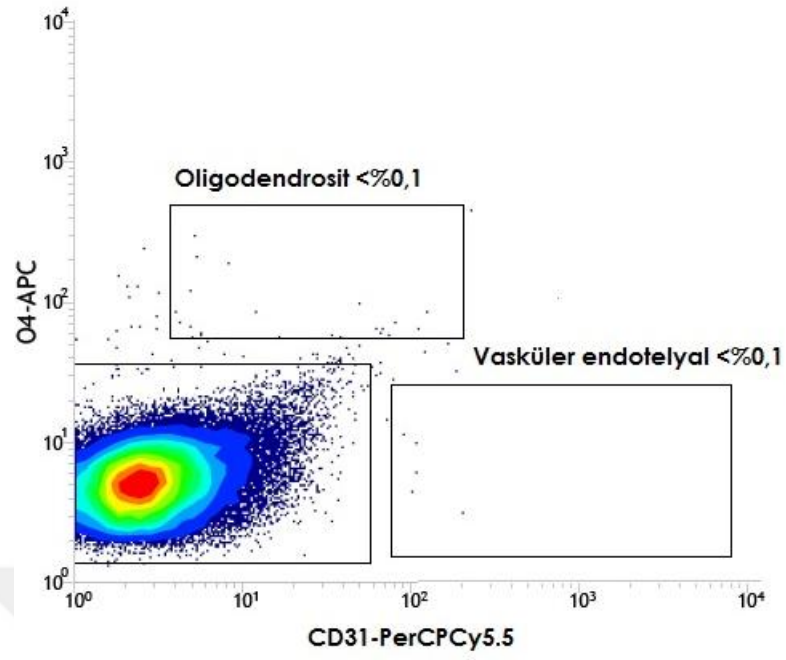


Şekil 6.1.16. Hipokampal hücreler PECy7 ve AF488 izotip kontrol

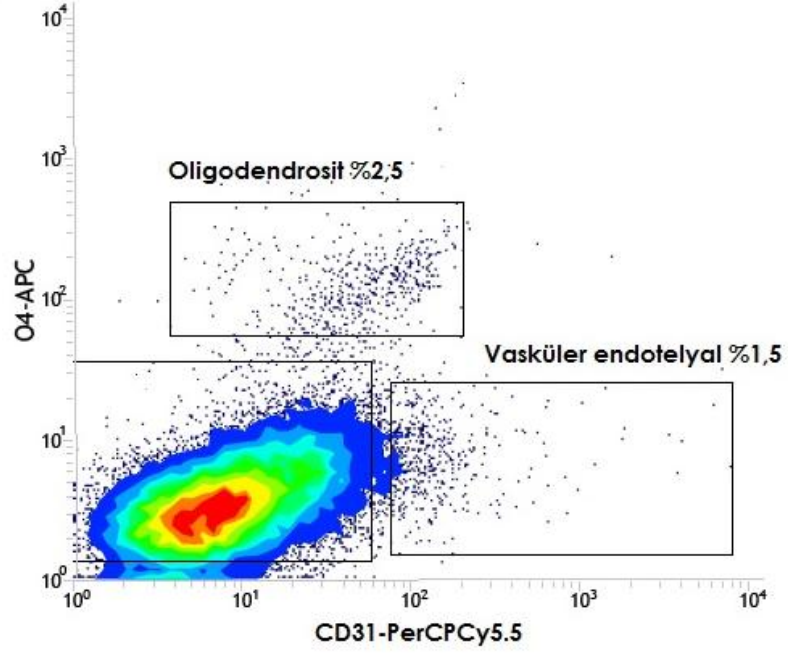


Şekil 6.1.17. Hipokampal hücreler NG2 ve A2B5 pozitif hücreler

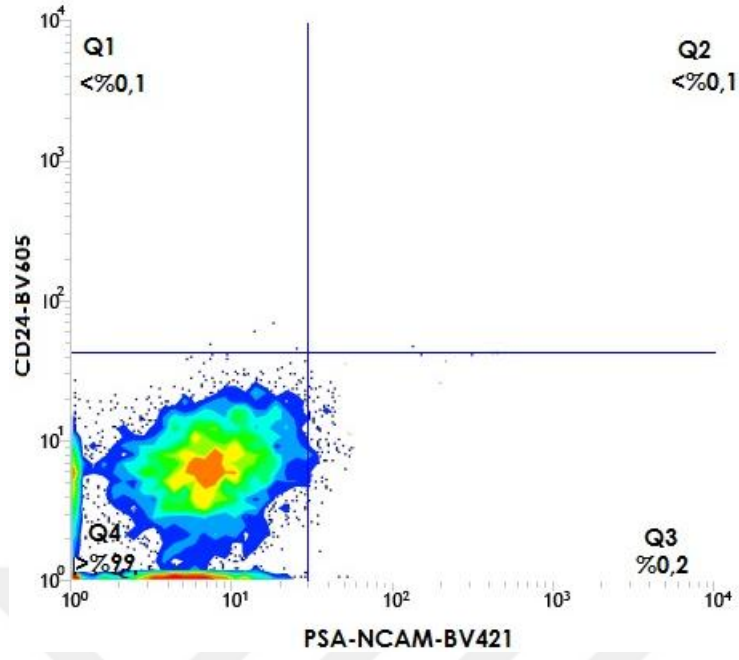




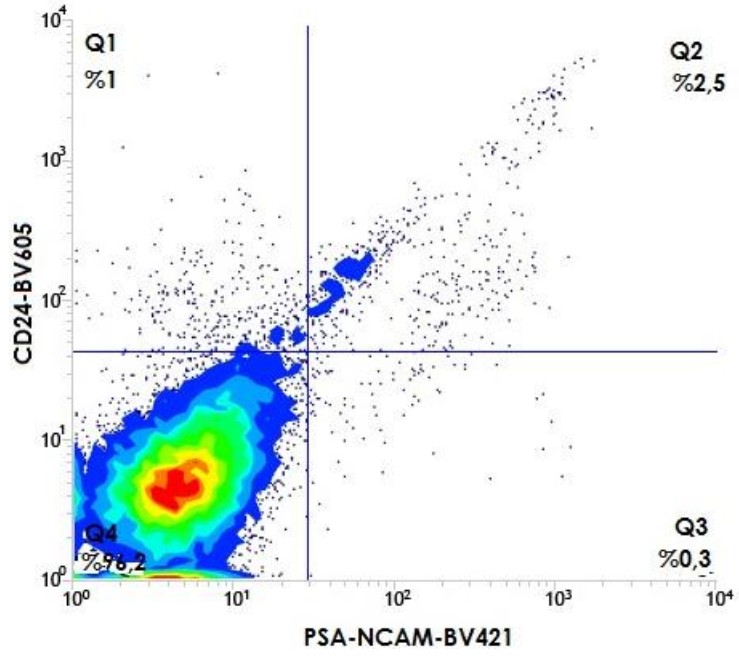
Şekil 6.1.20. Hipokampal hücreler APC ve PerCPCy5.5 izotip kontrol



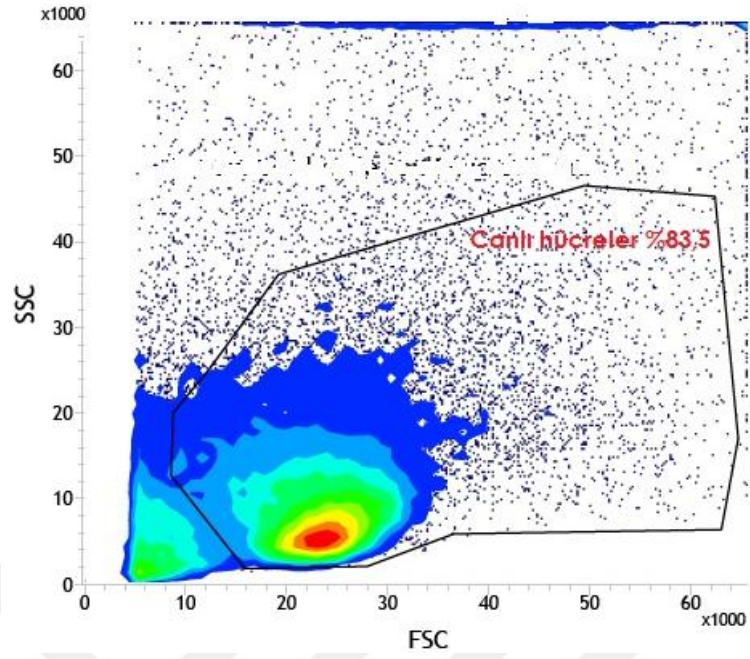
Şekil 6.1.21. Hipokampal hücreler O4 ve CD31 pozitif hücreler



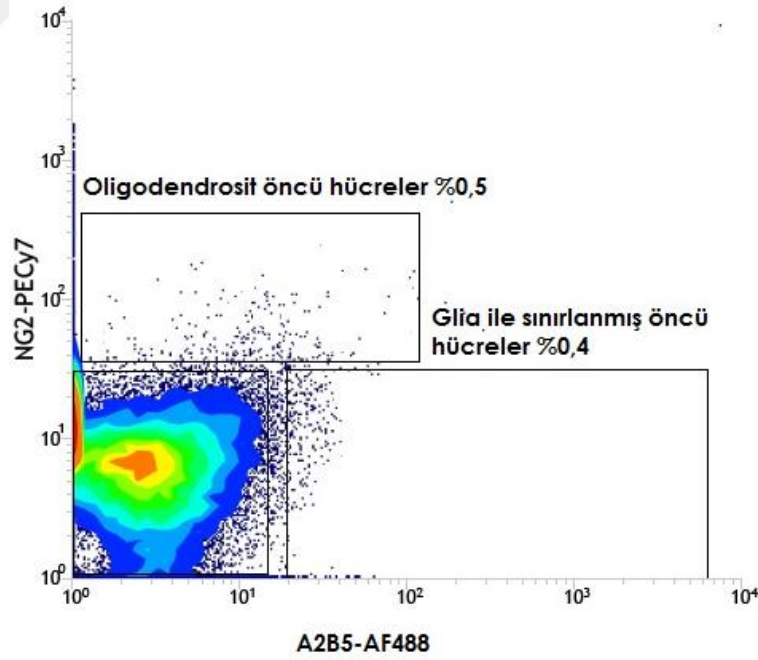
Şekil 6.1.22. Hipokampal hücreler BV605 ve BV421 izotip kontrol



Şekil 6.1.23. Hipokampal hücreler quadrant ayrımı; Q1 Ependimal hücreler (CD24+ PSA-NCAM-) Q2 Olgunlaşmamış nöronlar (CD24+ PSA-NCAM+) Q3 Nöroblastlar (CD24- PSA-NCAM+) Q4 Olgun nöronlar (CD24- PSA-NCAM-)

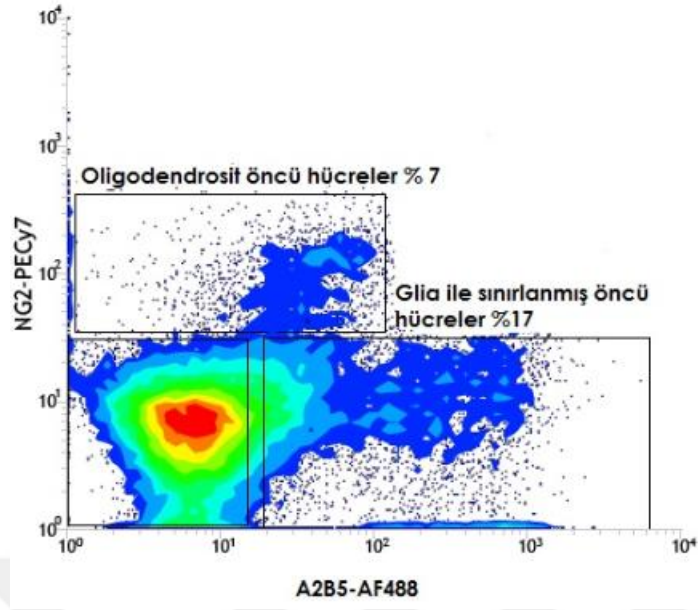


Şekil 6.1.24. Fiziksel parametreler (FSC ve SSC) ile canlı kortikal hücre kapısının seçimi

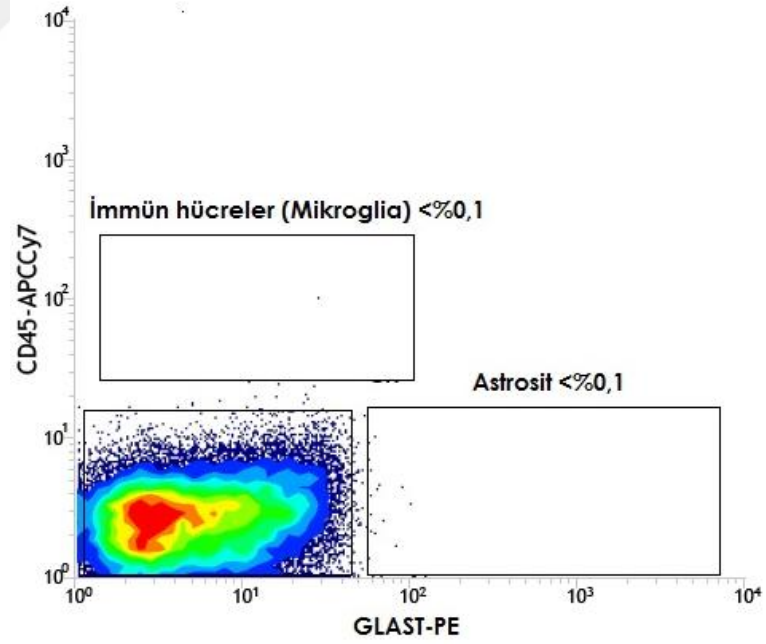


Şekil 6.1.25. Kortikal hücreler PECy7 ve AF488 izotip kontrol

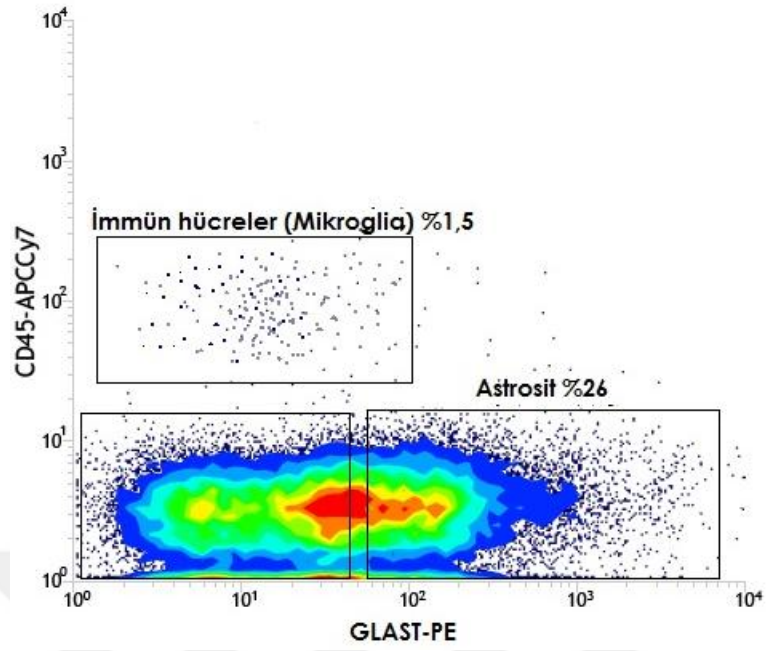




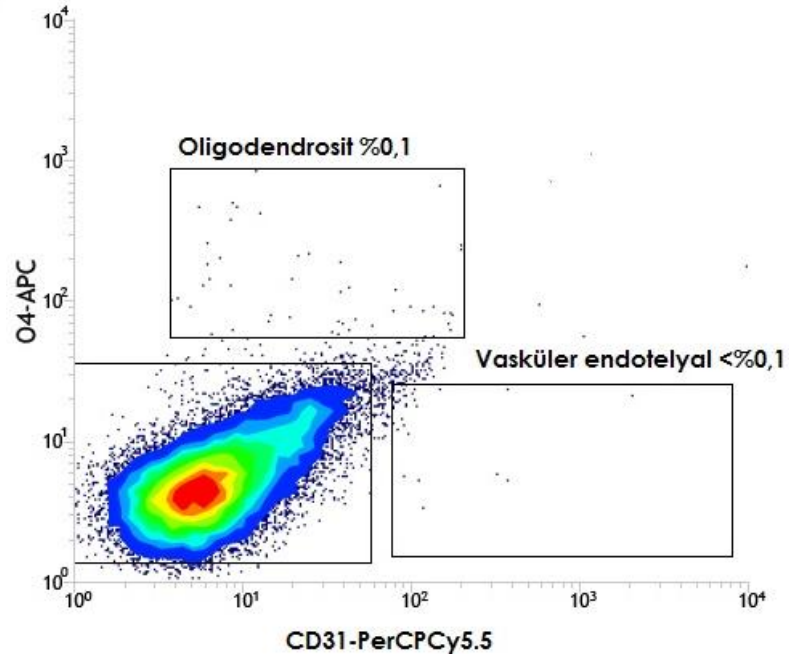
Şekil 6.1.26. Kortikal hücreler NG2 ve A2B5 pozitif hücreler



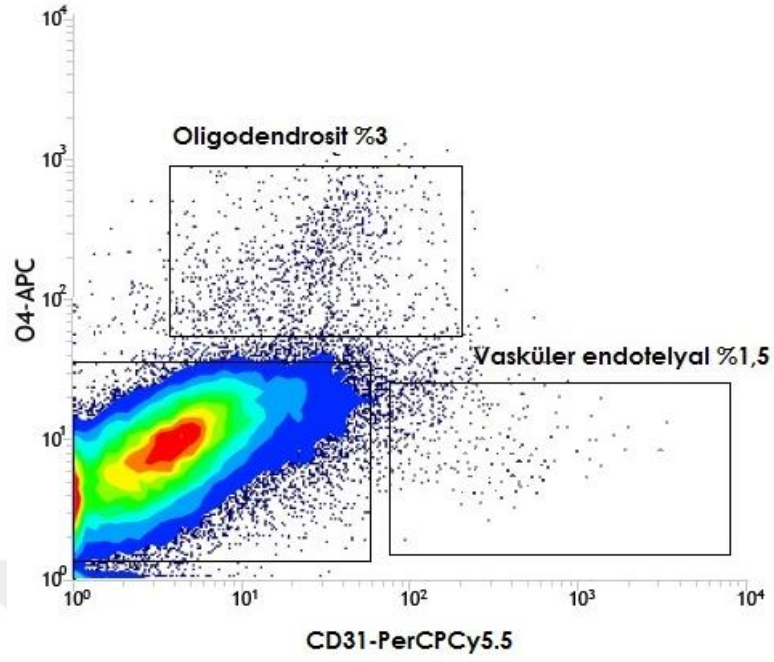
Şekil 6.1.27. Kortikal hücreler APCCy7 ve PE izotip kontrol



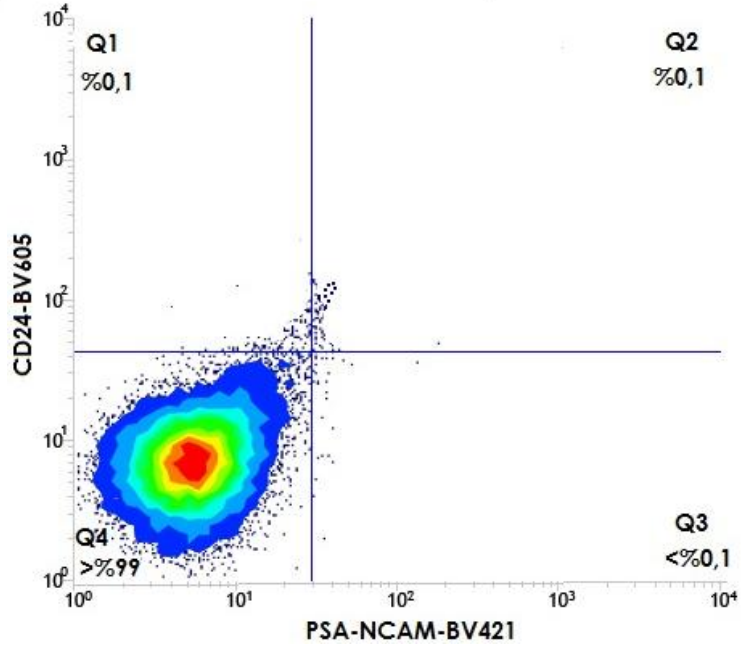
Şekil 6.1.28. Kortikal hücreler CD45 ve GLAST pozitif hücreler



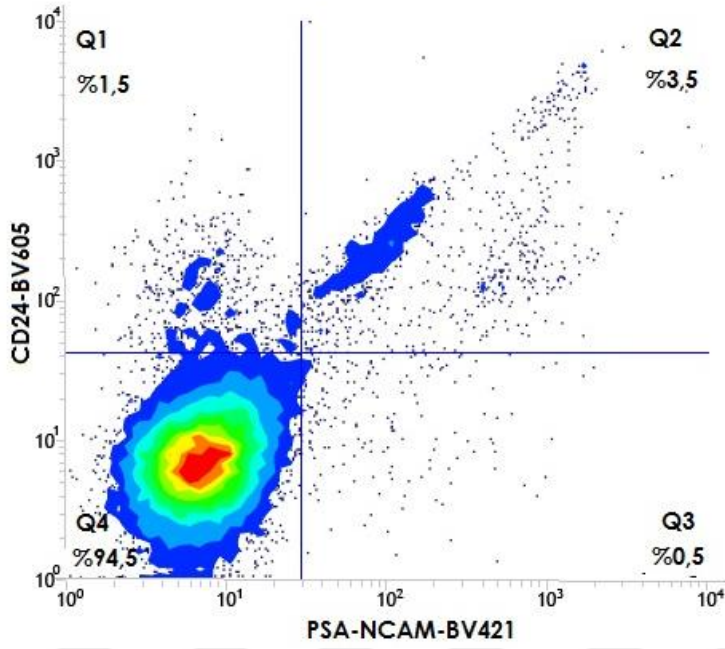
Şekil 6.1.29. Kortikal hücreler APC ve PerCPCy5.5 izotip kontrol



Şekil 6.1.30. Kortikal hücreler O4 ve CD31 pozitif hücreler



Şekil 6.1.31. Kortikal hücreler BV605 ve BV421 izotip kontrol



**Şekil 6.1.32.** Kortikal hücreler quadrant ayrımı; Q1 Ependimal hücreler (CD24+ PSA-NCAM-) Q2 Olgunlaşmamış nöronlar (CD24+ PSA-NCAM+) Q3 Nöroblastlar (CD24- PSA-NCAM+) Q4 Olgun nöronlar (CD24- PSA-NCAM-)

**Tablo 6.1.2.** Negatif eliminasyon yöntemi ile elde edilen kortikal canlı nöron oranı

Popülasyon	Event sayısı	% Toplam	% Grup
Korteks disosiyasyon partikülleri	50000	100%	--
↳ Canlı hücreler	41525	83.05%	100%
↳ NG2- A2B5- hücreler	31559	63.11%	76%
↳ CD45- GLAST- hücreler	21348	42.70%	52.10%
↳ O4- CD31- hücreler	19648	39.30%	47.30%
↳ PSA-NCAM- CD24- hücreler	17598	35.20%	42.37%

**Tablo 6.1.3.** Negatif eliminasyon yöntemi ile elde edilen hipokampal canlı nöron oranı.

<b>Popülasyon</b>	<b>Event sayısı</b>	<b>% Toplam</b>	<b>% Grup</b>
Korteks disosiyasyon partikülleri	50000	100%	--
↳ Canlı hücreler	39750	79.50%	100%
↳ NG2- A2B5- hücreler	32595	65.19%	82%
↳ CD45- GLAST- hücreler	24055	48.11%	60.50%
↳ O4- CD31- hücreler	22465	44.93%	56.51%
↳ PSA-NCAM- CD24- hücreler	20875	41.75%	52.51%

**Tablo 6.1.4.** Hipokampal canlı astrosit ayırım analizi

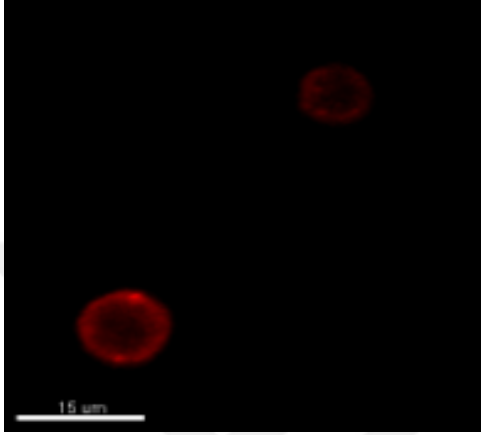
<b>Popülasyon</b>	<b>Event sayısı</b>	<b>% Toplam</b>	<b>% Grup</b>
Hipokampal disosiyasyon partikülleri	50000	100%	--
↳ Canlı hücreler	39750	79.50%	100%
↳ GLAST+ hücreler	9142	18.28%	23%

**Tablo 6.1.5.** Kortikal canlı astrosit ayırım analizi

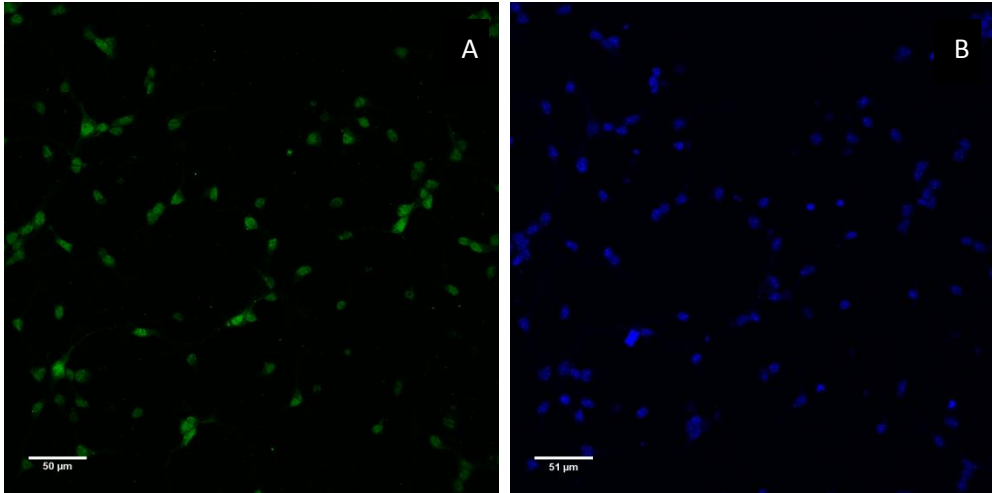
<b>Popülasyon</b>	<b>Event sayısı</b>	<b>% Toplam</b>	<b>% Grup</b>
Hipokampal disosiyasyon partikülleri	50000	100%	--
↳ Canlı hücreler	44540	89.08%	100%
↳ GLAST+ hücreler	11580	23.16%	26%

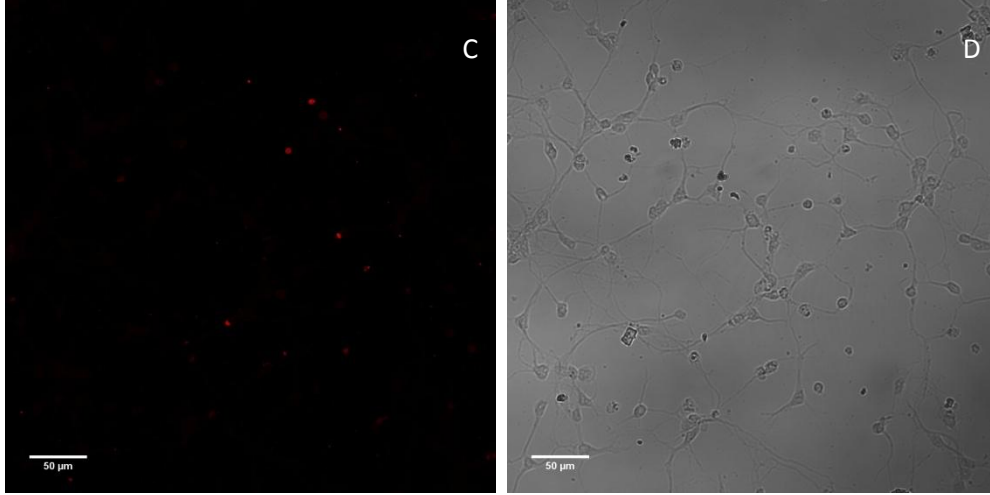
## 6.2. Mikroskopik İncelemeler

Mikroskopik inceleme için akım sitometrisi analizi sonrası analiz edilen nöronlar ve astrositler sort edildi. Anti-GLAST-PE konjuge antikor ile işaretlenen astrositlerin spesifik olarak hücre zarının boyandığı gözlemlendi. Negatif seçim yöntemi ile analize dahil edilen nöronların sort sonrası 72 saatlik görüntüleri alındı.



**Resim 6.2.1.** Sort sonrası GLAST ile pozitif boyanan astrositler (40X büyütme)



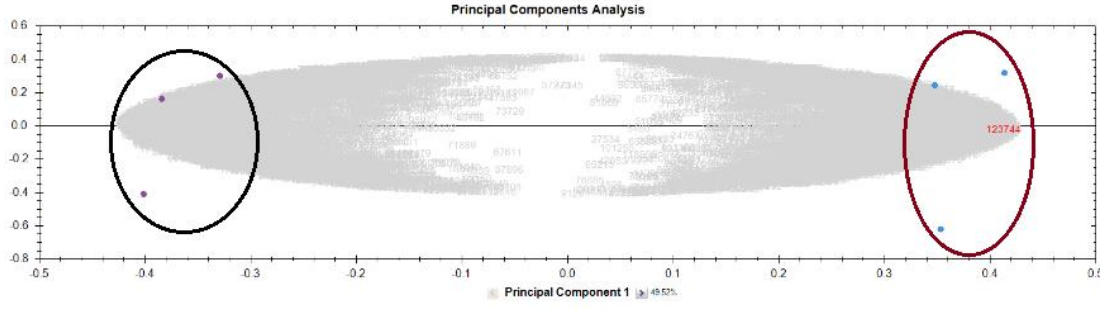


**Resim 6.2.2.** Negatif seçim yöntemi ile ayrıştırılan hücreler 72 saatlik kültür sonrası (20X büyütme); (A) Neun antikoruna ile boyama (yeşil renk) (B) DAPI ile boyama (mavi renk) (C) GFAP antikoruna ile boyama (kırmızı renk) (D) Hücrelerin Parlak Alan (BF) görüntüsü.

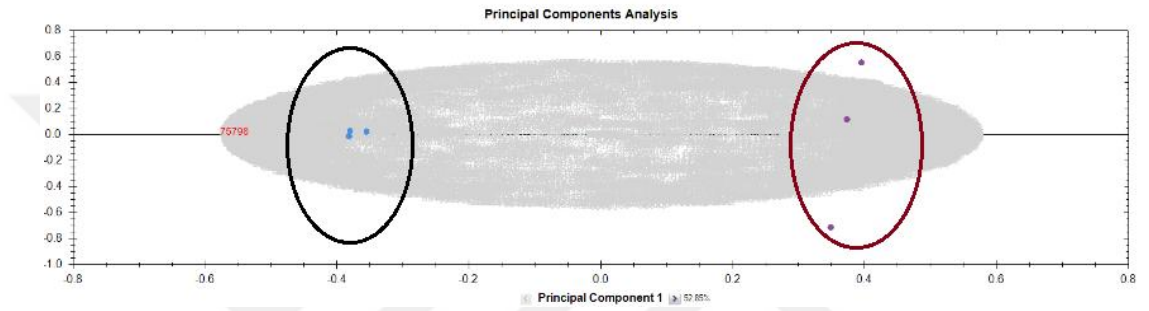
### 6.3. Protein Profili Analizi

LC-MS/MS analizi ile yeni doğan fare hipokampus ve korteks bölgelerindeki nöron ve astrositlerde bulunan peptitlerin m/z (kütle/yük) değerleri belirlendi. Yapılan bu analiz sonucu elde edilen veriler Progenesis QI programı ile tanımlandı. Yapılan analiz sonucu fare veri tabanı kullanılarak korteksten toplam 107, hipokampüsten toplam 67 protein tanımlandı. PCA grafikleri hipokampus ve korteks bölgeleri içinde nöron ve astrosit proteomlarının farklı olduğunu gösterdi.(Şekil 6.1) Deney grupları ile birlikte aynı anda analiz edilen kalite kontrol (QC) analizleri sonucu cihazın hata payının %10 olduğu belirlendi. Gruplar arası ekspresyon farkı %50 ve daha fazla değişen proteinler için p değeri 0,05'in altında kalan proteinler istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlenen proteinler olarak belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen proteinler hipokampus için 45 korteks için 85 olup her ikisinde de 22 ortak protein tanımlandı (şekil venn diagramı). Hem bölgesel hemde hüresel olarak eksprese edilen protein sınıfları ve görev aldıkları fonksiyonlarına göre karşılaştırmalar yapıldı.( Hipokampus ve kortekste ortak olan 22 proteinin hüresel farklılıklarına bakılığında bu proteinlerden 5 tanesinin hipokampus bölgesine ait astrositler tarafından artmış ekspresyonları bulunurken kortekste ise nöronlar tarafından artmış ekspresyonları olduğu gözlenmiştir.

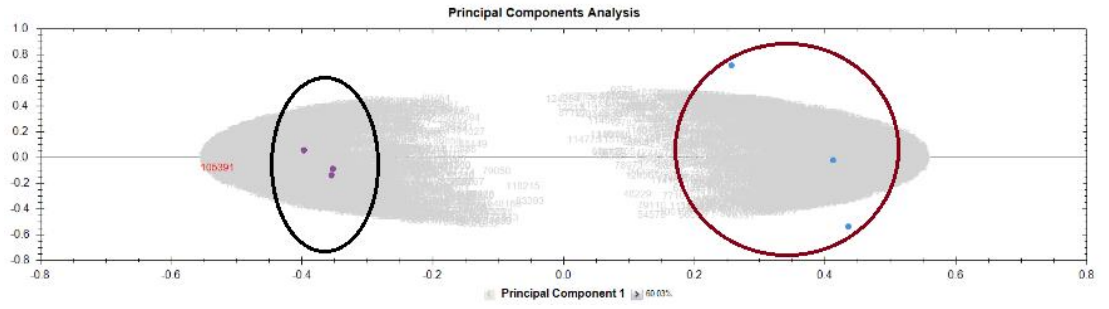
A. Hipokampüs astrosit ile korteks astrosit grubu



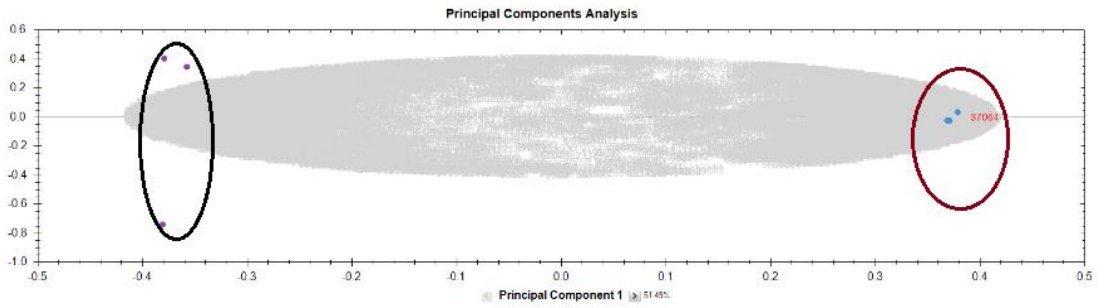
B. Hipokampüs nöron ile hipokampüs astrosit grubu



C. Hipokampüs nöron ile korteks nöron grubu



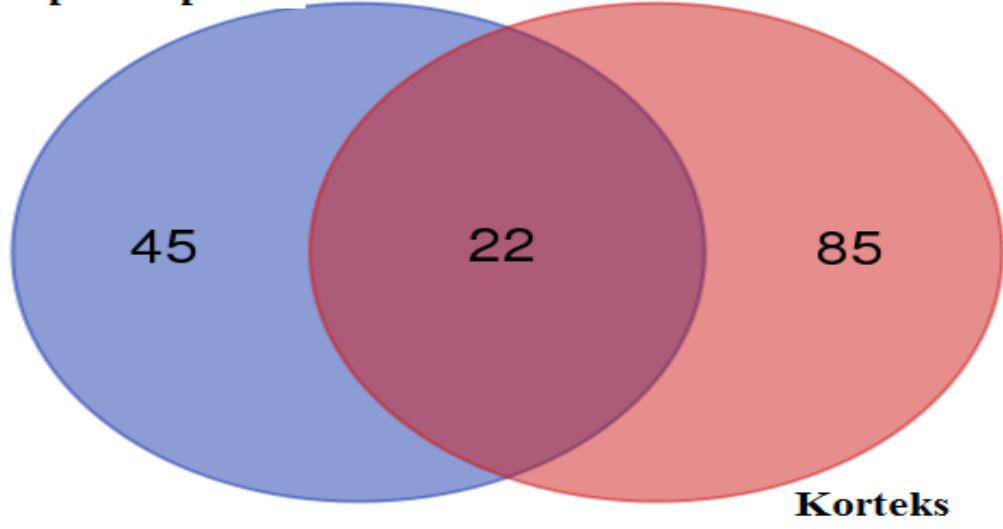
D. Korteks astrosit ile korteks nöron grubu



Şekil 6.3.1. Hipokampüs ve korteks hücrelerinin PCA analizi



## Hipokampüs



Şekil 6.3.2. Hipokampüs ve korteksten elde edilen protein dağılımı

Tablo 6.3.1. Hipokampüs ve kortekste ortak proteinler

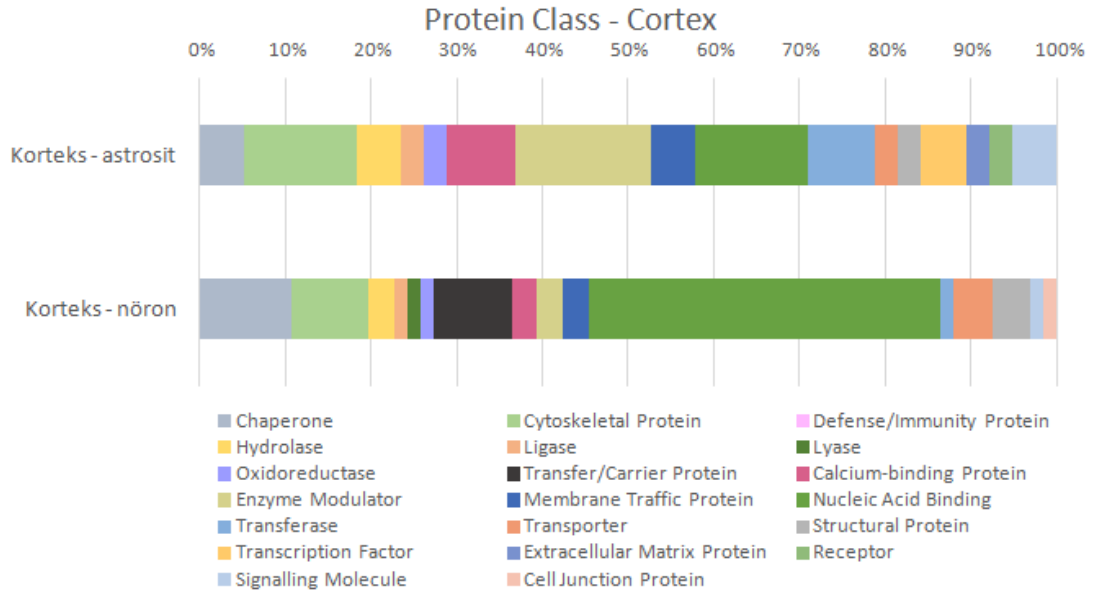
Accession Number	Protein İsmi	Hipokampus		Korteks	
		Astrosit	Nöron	Astrosit	Nöron
P62806	Histone H4		*		*
P68510	14-3-3 protein eta	*		*	
Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	*			*
Q91VB8	Alpha globin 1	*			*
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta		*		*
B1AQW2	Microtubule-associated protein	*		*	
P43277	Histone H1.3		*		*
P06837	Neuromodulin	*		*	
Q5SS40	Putative uncharacterized protein	*		*	

P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	*			*
P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	*		*	
Q9CQV8	14-3-3 protein beta/alpha	*		*	
Q9QZQ8	Core histone macro-H2A.1		*		*
P51880	Fatty acid-binding protein, brain	*		*	
Q3THW5	Histone H2A.V		*		*
O08599	Syntaxin-binding protein 1		*		*
P20029	78 kDa glucose-regulated protein		*		*
P52480	Pyruvate kinase PKM	*			*
P18760	Cofilin-1	*			*
P62204	Calmodulin-1	*		*	
P07356	Annexin A2		*		*
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	*		*	

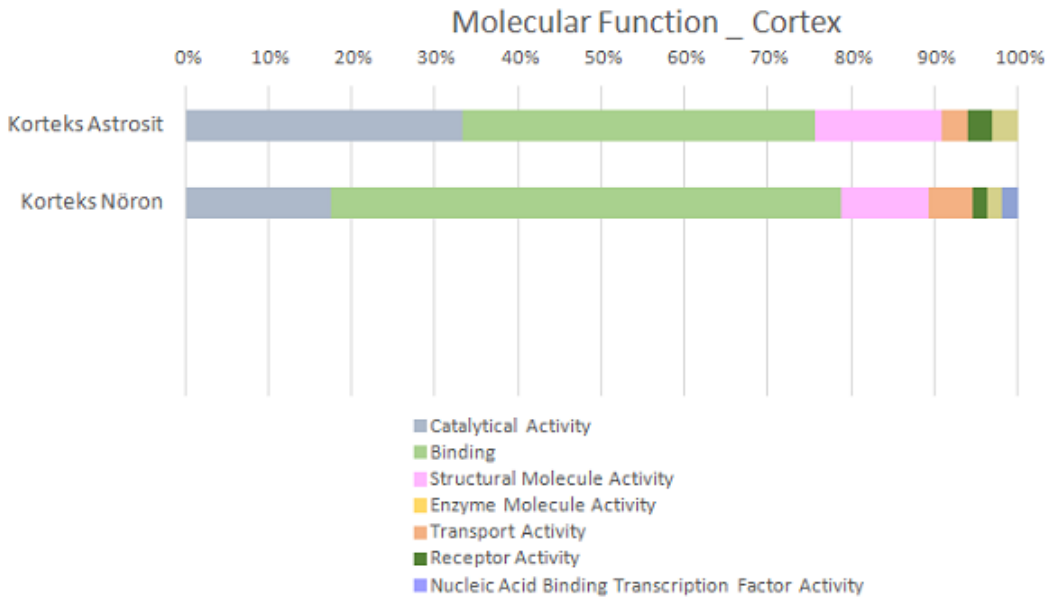
**Tablo 6.3.2.** Hipokampus ve kortekste ortak olup farklı hücrelerde ekspresyonu yüksek olan proteinler

Uniprot Numarası	Protein	Hipokampus	Korteks
P18760	Cofilin-1	Astrosit	Nöron
P52480	Pyruvate kinase PKM	Astrosit	Nöron
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	Astrosit	Nöron
Q91VB8	Alpha globin 1	Astrosit	Nöron
Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Astrosit	Nöron

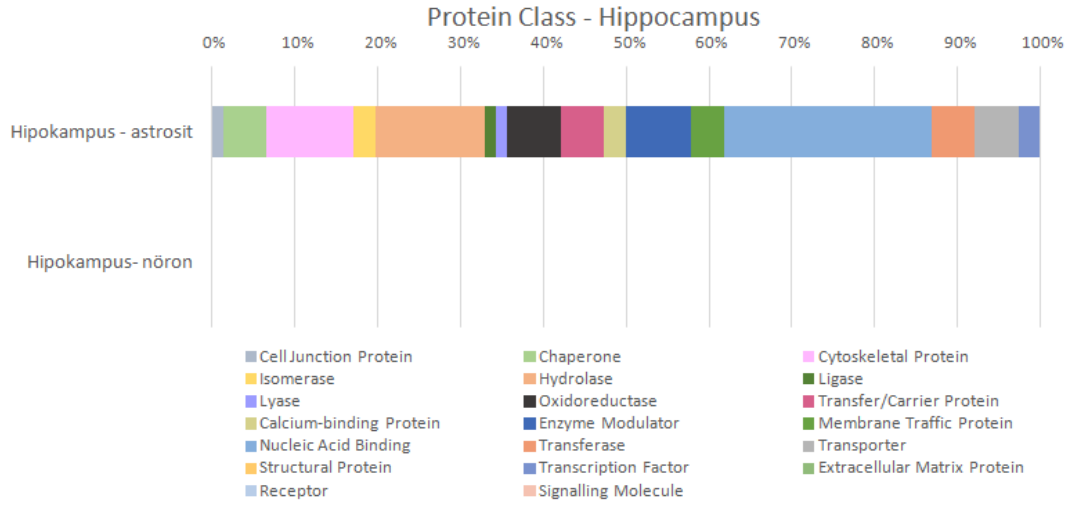
## A. Korteks astrosit-nöron protein sınıf dağılımları



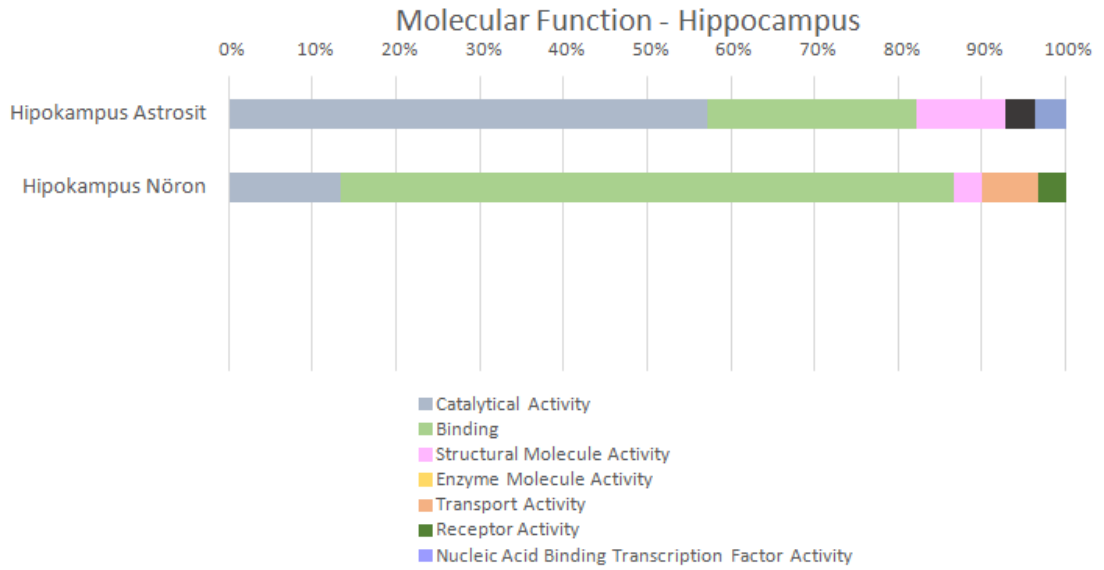
## B. Korteks astrosit-nöron moleküler fonksiyon dağılımları



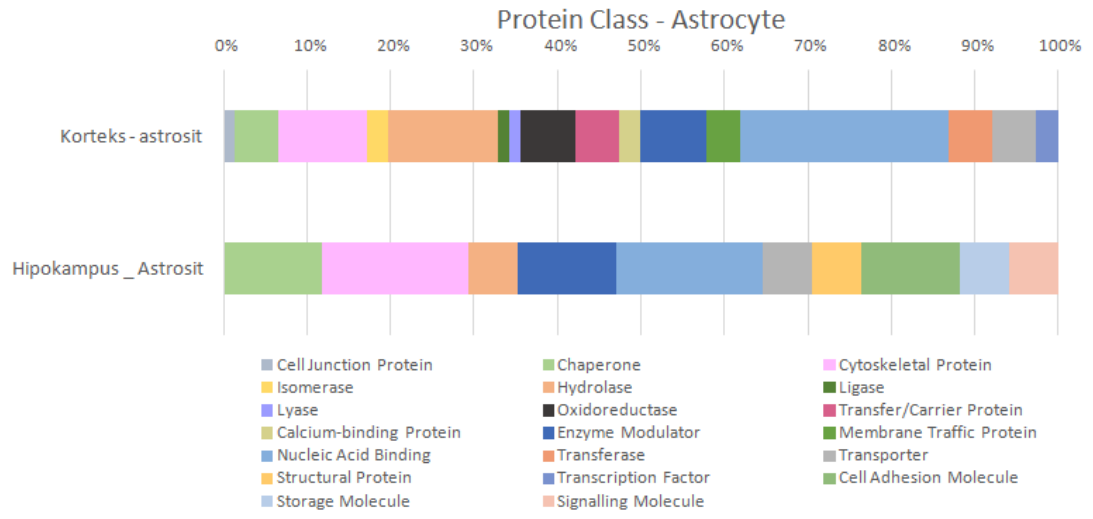
### C. Hipokampus astrosit-nöron protein sınıf dağılımları



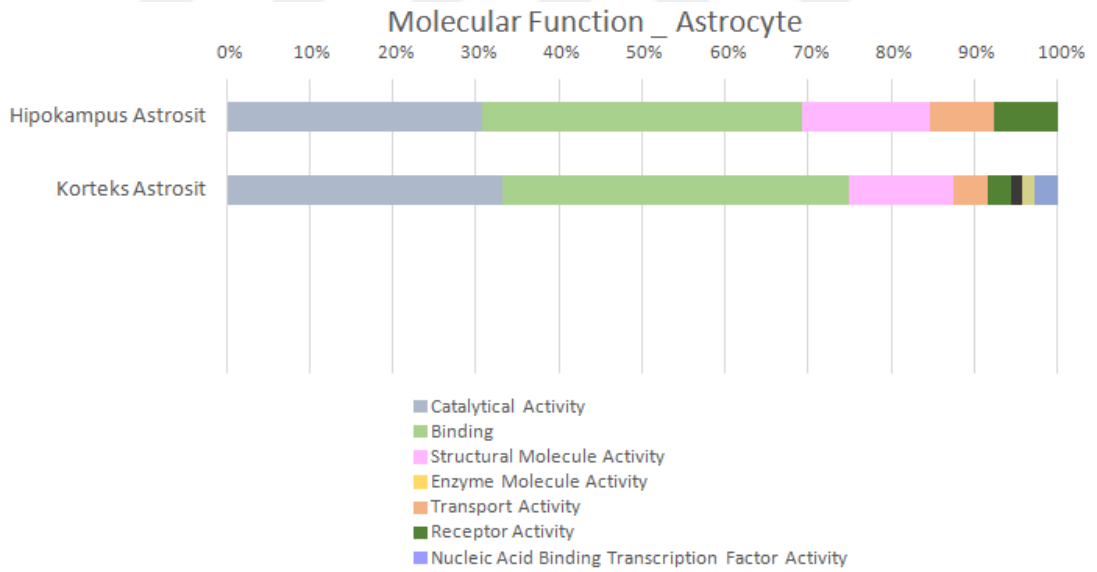
### D. Hipokampus astrosit-nöron moleküler fonksiyon dağılımları



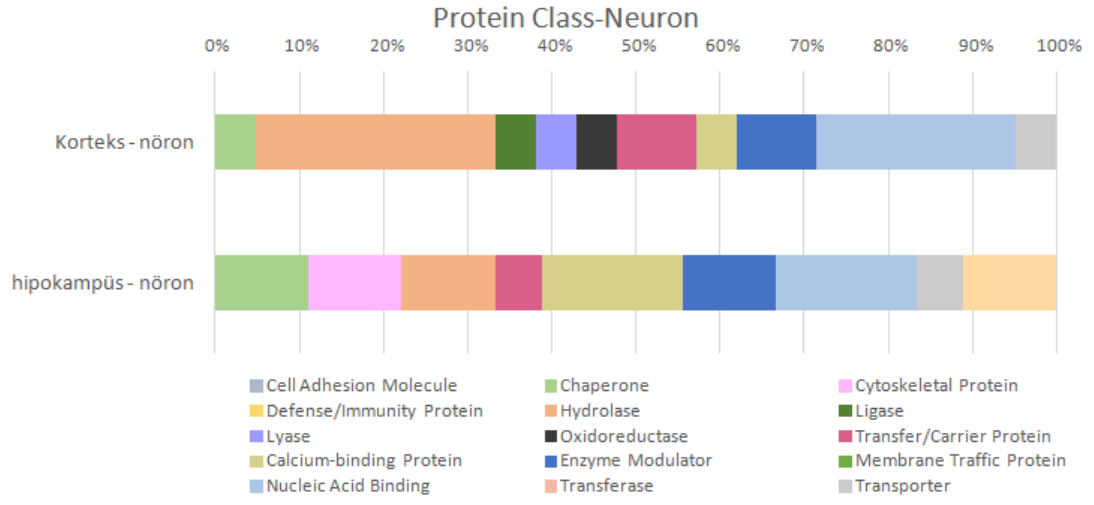
### E. Astrositlerin hipokampal ve kortikal protein sınıf dağılımları



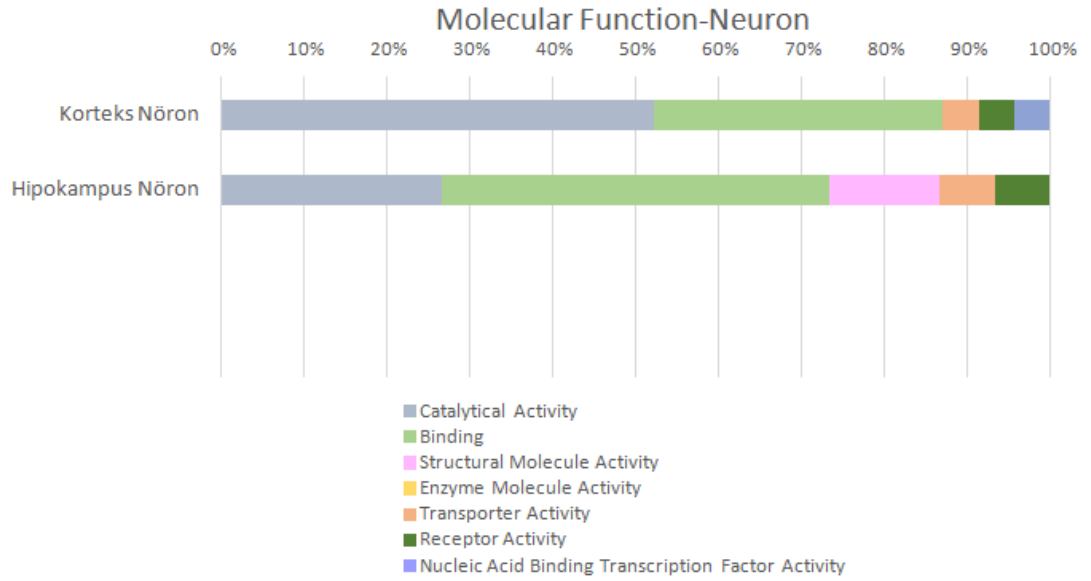
### F. Astrositlerin hipokampal ve kortikal moleküler fonksiyon dağılımları



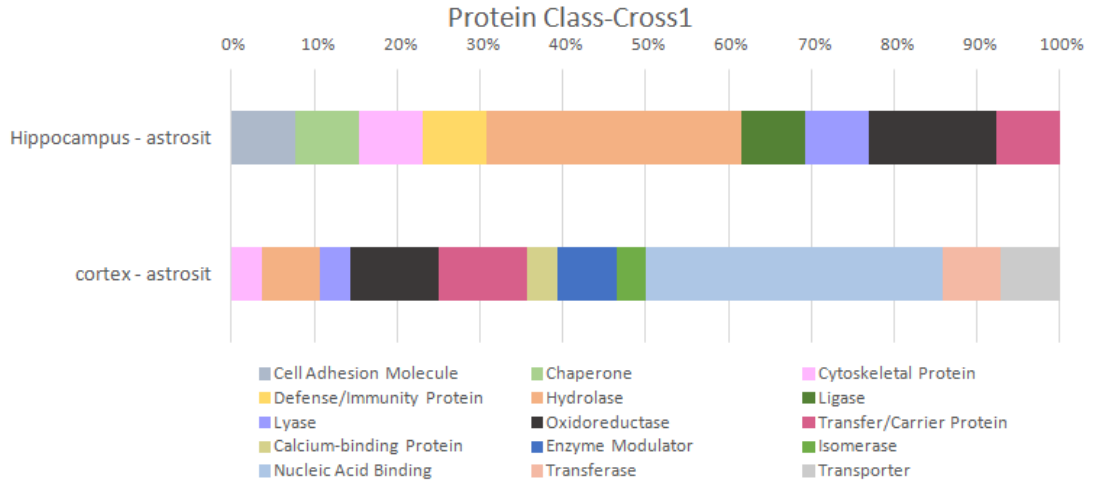
### G. Nöronların hipokampal ve kortikal protein sınıflarının dağılımı



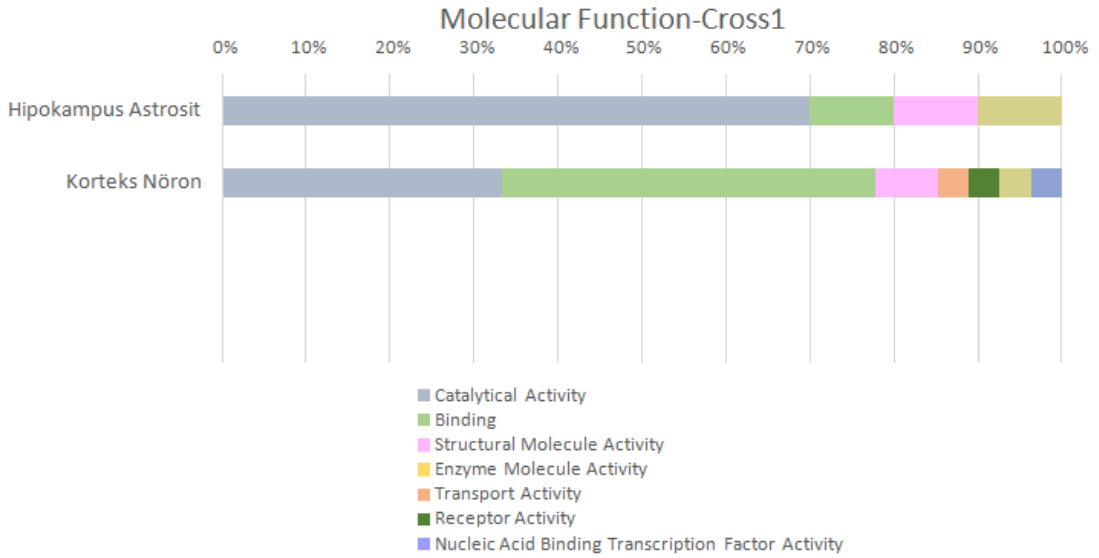
### H. Nöronların hipokampal ve kortikal moleküler fonksiyon dağılımları



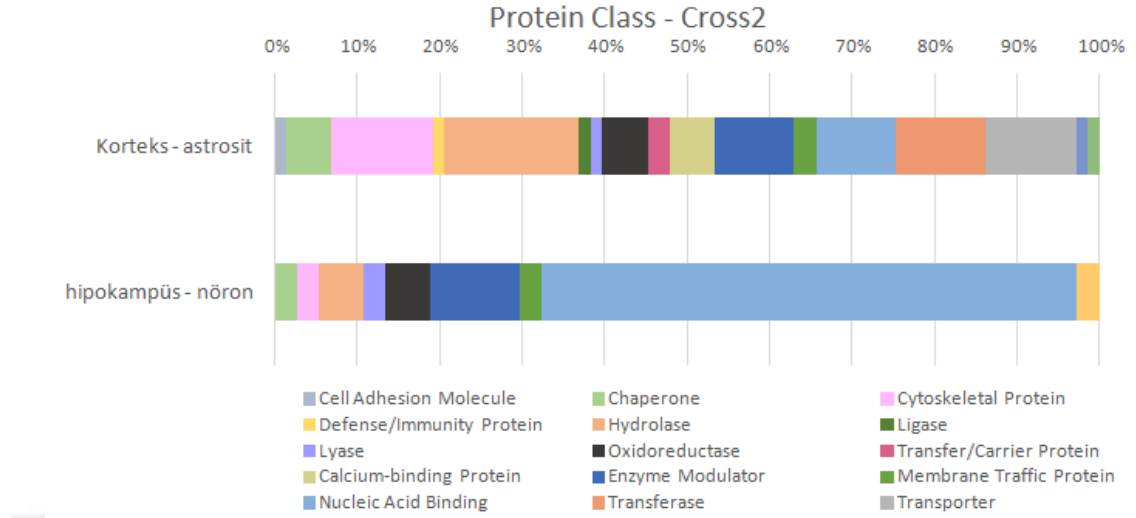
## I. Bölgesel ve hücrel çaprazlama ile protein sınıflarının dağılımı-1



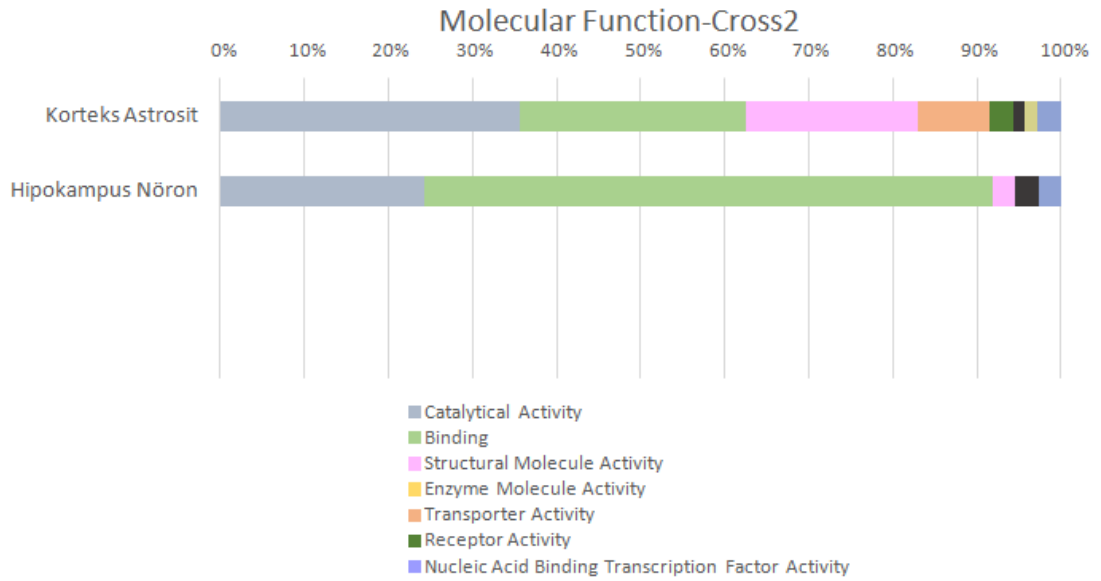
## İ. Bölgesel ve hücrel çaprazlama ile moleküler fonksiyon dağılımları-1



J. Bölgesel ve hücrel çaprazlama ile protein sınıflarının dağılımı-2



K. Bölgesel ve hücrel çaprazlama ile moleküler fonksiyon dağılımı



Şekil 6.3.3. Proteinlerin bölgesel ve hücrel sınıflandırılması ile fonksiyon farklılığı



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Beyin, nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve mikroglialar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşan kompleks bir dokudur. Bu çeşitliliğe ek olarak aynı kökene sahip hücreler göç ettikleri bölgelere göre fonksiyonel ve morfolojik değişimler göstermektedirler. Beyini oluşturan her bir hücrenin izolasyonu, hücreye özgü proteinlerin elde edilmesinde büyük önem taşır.

Literatürde floresan aktive hücre ayrıştırma tekniği ile embriyonik döneme ait fare beyinlerinin farklı bölgelerinden nöronal kök hücreler, nöronal öncü hücreler ve diğer destek hücrelerinin ayrıştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Buna karşın yeni doğan ve erişkin döneme ait fare beyininin FACS tekniği ile yalnızca erişkin dönem nörogenezin devam ettiği subventriküler alan ve hipokampüsün dentat gyrus bölgeleri ile sınırlanmış nöronal kök ve öncü hücrelerin elde edildiği çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamızda yeni doğan farelerin korteks ve hipokampüs dokularından canlı hücre süspansiyonları elde edilmiştir. Bu hücreler akım sitometrisi ile analiz edilerek hücre tipleri belirlenmiştir. Analiz sonrasında bu hücre tiplerine göre floresan aktive hücre ayrıştırma metodu ile tayin edilen hücreler ayrıştırılarak elde edilen hücrelerden proteomik profilleri çıkarılmıştır.

Sinir sistemini oluşturan hücrelerin akış sitometrisi ile analizindeki ilk kritik basamak, dokuların uygun kimyasal ve mekanik teknikler ile canlı hücre süspansiyonu haline getirilmesidir. Güçlü enzimatik özelliğe sahip papain ve tripsin enzimler hücre yüzeylerindeki enzime duyarlı antijenleri temizlediği için antikor ile işaretleme tekniklerinde çok tercih edilmemektedir. Pek çok çalışma Tryple, Accutase ve gibi daha hafif enzimatik özelliklere sahip enzimlerin başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmalara dayanarak Tryple ve accutase enzimleri denenmiştir. Ancak yeni doğan fare beyinlerinde kullandığımız hafif enzimatik etkinlik gösteren enzimler doku parçalanmasında yetersiz kalmıştır. Ayrıca uzayan mekanik tritürasyonlar sebebi ile anlamlı ölçüde canlı hücre kayıpları gözlenmiştir. Postnatal fare beyinleri ise embriyonik dönem fare beyinlerine nazaran, çok daha fazla farklılaşmış hücreler içerir ve uzantıları ile iç içe geçerek kompleks bir yapı

oluşturmaktadır. Bu enzimlerin başarısı çoğunlukla embriyonik döneme ait fare beyin dokuları ile erişkin fare beyinlerinin germinal bölgeleri ile sınırlı kalmıştır. Tripsin ise özellikle canlı nöron kaybına sebep olmuştur. Denenen enzimler arasında en yüksek canlılık papain enzimi ile sağlanmıştır. Ancak papain enzimi hücre yüzeylerinde bulunan CD24, NG2 antijenlerin ortadan kalkmasına sebep olmuştur. Buna bağlı olarak bu antijenlere karşı geliştirilen antikorların bağlanamayarak hücre analiz ve ayırmalarını engellemektedir. Çalışmamızda enzimatik sebeplere bağlı kaybolan antijen ifadesinin tekrar kazanabilmesi için reekspresyon besiyeri oluşturuldu. Hücreler enzimatik müdahale sonrası reekspresyon besiyerinde 3 saat inkübe edilerek bu antijenlerin tekrar hücre membranlarında ifade etmesi sağlanmıştır.

Karşılaşılan bir diğer sorun, özellikle olgun nöronların yüzeylerinde nörona özgü antijen bulunmamasıdır. Canlı nöronları işaretleyebileceğimiz antikor bulunmadığı için floresan aktive hücre ayrıştırma tekniği ile direkt olarak saf ve canlı nöron izole edilememektedir. Bu sorunu aşmak için negatif hücre saflaştırma tekniği kullanıldı. Bu teknik ile nöron dışında bulunan tüm hücreler işaretlenerek, diğer tüm canlı hücreler nöron olarak kabul edildi. Ancak bir diğer sorun yeni doğan fare beyninde hem olgun hem de öncü hücreler bulunmaktadır. Bu sebep ile korteks ve hipokampus dokularındaki nöron dışı tüm olgun ve öncü hücreler tespit edildi. A2B5 antikoru ile glia ile sınırlanmış öncü hücreler, NG2 antikoru ile oligodendrosit öncü hücreler, GLAST antikoru ile tüm astrosit ve astrosit benzeri radial glial hücreler, O4 antikoru ile oligodendrositler, CD45 antikoru ile dokuda yerleşik mikroglialar ile göç eden immün hücreler, CD31 antikoru ile vasküler endotelial hücreler, CD24 antikoru ile PSA-NCAM antikor kombinasyonu ile ependimal hücreler ile olgunlaşmamış nöronlar tespit edildi. Nöron olarak kabul edilen hücreler ayrıştırıldıktan sonra kültüre edildiler ve akson uzattıktan sonra fikse edildi ve hücreler konfokal mikroskobu ile analiz edilerek Neun antikoru ile 95% üstü pozitif boyanarak negatif hücre saflaştırma tekniği tasdik edildi. GLAST ile pozitif işaretlenen ve diğer antikorlar ile boyanmayan hücreler de fikse edilerek GFAP antikoru ile boyandı. Konfokal mikroskobu altında GFAP pozitif işaretlenen hücreler astrosit olarak kabul edilirdi. Enzimatik ve mekanik müdahaleler sonucu elde edilen süspansiyon hücre parçaları, ölü hücreleri ve canlı hücreleri içermektedir. Kullanılan

antikorlar ölü hücelere ve hücre parçalarına bağlanabileceği için hem çekirdekli hücelerin hem de ölü hücelerin analiz grubundan çıkarılması gerekmektedir. Süspansiyonda bulunan ölü hücelere ve diğer partiküller proteomik dataları etkileyeceği için çıkarılmalıdır. Bunun için tüm çekirdekli hüceleri boyayan Hoechst ve sadece ölü hücelere boyayan propidium iodide kullanıldı. Ancak bu iki güçlü çekirdek boyasının kullanılması çok renkli antikör boyamalarını etkileyeceği için birlikte kullanılması uygun olamamıştır. Çalışmamızda bu problem hücre parçalarının, ölü hücelerin ve canlı hücelerin çekirdek boyaları ile boyanma şiddeti ile bu partiküllerin boyutsal ve hücre içi yoğunluk özelliklerine göre karşılaştırılarak çözülmeye çalışıldı. Ölü hücelerin canlı hücelere göre büzüşerek küçük kaldıkları, hücre parçalarının ise hem iç yoğunlukları hem de normal bir hücreye göre daha küçük kaldıkları gözlemlendi. Bu sonuçlar ile ilerleyen çalışmalarımızda çekirdek boyası kullanılmadan canlı hücelerin diğer hücre ve partiküllerden ayrımı sağlandı. Günümüzde proteomik cihazları ile dokudan, hücre kültüründen ve fiksasyon hücelere çok sayıda proteomik analiz yapılmaktadır. Ancak doku analizlerinde o dokuyu oluşturan tüm hücelere toplu olarak bilgi gelmektedir. Yine kültüre edilmiş hücelerin saf hücre kolonileri olsa da dokuda gösterdikleri ifadeler ile kültür ortamında gösterdikleri ifadeler değişkenlik gösterebilir. Ayrıca fiksasyon edilen hücelere de fiksasyon sonucu protein yapıları bozulacağı için proteomik analizleri etkilemektedir. Bu çalışmada yeni doğan fare beyininden hızlıca elde edilen hücelere, FACS tekniği ile korteks ile hipokampus bölgelerine ve hücre tiplerine göre proteomik analizleri yapılmıştır. Ancak antikör sayısının fazla olması ve dokuların küçük olması FACS ile analiz yapılabilmesi için hipokampus ve korteks dokuları daha küçük parçalara ayrılmasına, buna bağlı olarak da düşük sayıda bulunan hücelere (oligodendrosit ve makroglia) proteomik dataların elde edilememesine sebep olmuştur. En yüksek iki hücre grubu olan nöron ve astrositlere ait proteomik datalar başarı ile alınmış ve analizleri yapılmıştır.

Çalışma sonucunda YD fare hipokampusundan toplam 67, korteksten ise toplam 107 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 22 tanesi ortak olarak bulunurken, bu ortak proteinlerden 5 tanesi bölgelere göre farklı hücelere göreceli olarak daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiştir. Her ne kadar hücelere gözlenen proteinler göreceli olarak farklılık gösterse de çalışılan farelerin sağlıklı olması bu

proteinler için ancak hücrelerin gelişimsel süreçteki yapısal ve fonksiyonel özellikleri hakkında bilgi verebilir.

Bu datalar ışığında YD sağlıklı fareler ile embriyonik dönemdeki ya da erişkin dönemdeki farelerin hücrel proteomik farklılıkları incelenebileceği gibi çeşitli nörodejeneratif hastalık taşıyan transgenik fareler ile hücrel proteomik profil farklılıklar incelenebilir.



## 8. KAYNAKLAR

1. Thompson CL, Ng L, Menon V, Martinez S, Lee CK, Glattfelder K, et al. A high-resolution spatiotemporal atlas of gene expression of the developing mouse brain. *Neuron*. 2014;83(2):309-23.
2. Sharma K, Schmitt S, Bergner CG, Tyanova S, Kannaiyan N, Manrique-Hoyos N, et al. Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nature neuroscience*. 2015;18(12):1819-31.
3. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2016;164(4):603-15.
4. Feliciano DM, Bordey A. Newborn cortical neurons: only for neonates? *Trends in neurosciences*. 2013;36(1):51-61.
5. Martynoga B, Drechsel D, Guillemot F. Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(10).
6. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*. 2009;32:149-84.
7. Takahashi T, Misson JP, Caviness VS, Jr. Glial process elongation and branching in the developing murine neocortex: a qualitative and quantitative immunohistochemical analysis. *The Journal of comparative neurology*. 1990;302(1):15-28.
8. Campbell K, Gotz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in neurosciences*. 2002;25(5):235-8.
9. Sahara S, O'Leary DD. Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*. 2009;63(1):48-62.
10. Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(9):3196-201.
11. Farkas LM, Huttner WB. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Current opinion in cell biology*. 2008;20(6):707-15.

12. Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(10):5868-73.
13. Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*. 1996;17(4):595-606.
14. Kwan KY, Sestan N, Anton ES. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*. 2012;139(9):1535-46.
15. Urban N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:396.
16. Frotscher M, Heimrich B, Deller T. Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends in neurosciences*. 1997;20(5):218-23.
17. Filimonoff IN. A rational subdivision of the cerebral cortex. *Archives of neurology and psychiatry*. 1947;58(3):296-311.
18. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989;31(3):571-91.
19. Schuz A, Palm G. Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *The Journal of comparative neurology*. 1989;286(4):442-55.
20. Douglas RJ, Martin KA. Neuronal circuits of the neocortex. *Annual review of neuroscience*. 2004;27:419-51.
21. Hutslers JJ, Lee DG, Porter KK. Comparative analysis of cortical layering and supragranular layer enlargement in rodent carnivore and primate species. *Brain research*. 2005;1052(1):71-81.
22. Wang Q, Burkhalter A. Area map of mouse visual cortex. *The Journal of comparative neurology*. 2007;502(3):339-57.
23. Cubelos B, Sebastian-Serrano A, Beccari L, Calcagnotto ME, Cisneros E, Kim S, et al. Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron*. 2010;66(4):523-35.
24. Frost DO, Caviness VS, Jr. Radial organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *The Journal of comparative neurology*. 1980;194(2):369-93.

25. Ledergerber D, Larkum ME. Properties of layer 6 pyramidal neuron apical dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(39):13031-44.
26. Thomson AM. Neocortical layer 6, a review. *Frontiers in neuroanatomy*. 2010;4:13.
27. Lam YW, Sherman SM. Functional organization of the somatosensory cortical layer 6 feedback to the thalamus. *Cerebral cortex*. 2010;20(1):13-24.
28. Briggs F. Organizing principles of cortical layer 6. *Frontiers in neural circuits*. 2010;4:3.
29. Reep RL. Cortical layer VII and persistent subplate cells in mammalian brains. *Brain, behavior and evolution*. 2000;56(4):212-34.
30. Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsaki G, Turner DA. Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *The Journal of comparative neurology*. 1998;391(3):335-52.
31. Spruston N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(3):206-21.
32. Larsen DD, Wickersham IR, Callaway EM. Retrograde tracing with recombinant rabies virus reveals correlations between projection targets and dendritic architecture in layer 5 of mouse barrel cortex. *Frontiers in neural circuits*. 2007;1:5.
33. Solberg Y, White EL, Keller A. Types and distribution of glutamic acid decarboxylase (GAD)-immunoreactive neurons in mouse motor cortex. *Brain research*. 1988;459(1):168-72.
34. Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron*. 2002;36(4):703-12.
35. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews Neuroscience*. 2004;5(10):793-807.
36. Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(15):6309-14.

37. Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 2008;59(6):932-46.
38. Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science*. 2004;305(5680):99-103.
39. Genoud C, Quairiaux C, Steiner P, Hirling H, Welker E, Knott GW. Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS biology*. 2006;4(11):e343.
40. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience*. 2006;9(2):260-7.
41. Brightman MW, Kaya M. Permeable endothelium and the interstitial space of brain. *Cellular and molecular neurobiology*. 2000;20(2):111-30.
42. Verderio C, Matteoli M. ATP in neuron-glia bidirectional signalling. *Brain research reviews*. 2011;66(1-2):106-14.
43. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in molecular biology*. 2012;814:23-45.
44. Schitine C, Nogaroli L, Costa MR, Hedin-Pereira C. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:76.
45. Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(41):10434-42.
46. Vincze I, Perroud N, Buresi C, Baud P, Bellivier F, Etain B, et al. Association between brain-derived neurotrophic factor gene and a severe form of bipolar disorder, but no interaction with the serotonin transporter gene. *Bipolar disorders*. 2008;10(5):580-7.
47. Guo F, Ma J, McCauley E, Bannerman P, Pleasure D. Early postnatal proteolipid promoter-expressing progenitors produce multilineage cells in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(22):7256-70.



48. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron*. 2010;68(4):668-81.
49. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research*. 2005;81(3):302-13.
50. Basaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. GENOMİK, PROTEOMİK, METABOLOMİK KAVRAMLARINAGENEL BAKIŞ VE UYGULAMA ALANLARI. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010;67(2).



## 9.ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.23166  
Konu : Etik Kurulu Kararı

09/11/2016

**Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Duralı**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Akım sitometri tekniği ile yeni doğan fare beyininden bölgesel olarak izole edilmiş spesifik hücrelerin protein profillerinin incelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

EK:

-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 09.11.2016 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden F996B0C0XF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
08/11/2016	74		Yrd. Doç. Dr. Deniz Duralı

“Akım sitometri tekniği ile yeni doğan fare beyninden bölgesel olarak izole edilmiş spesifik hücrelerin protein profillerinin incelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 ay**

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

## 10.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Emre	<b>Soyadı</b>	Vatandaşlar
<b>Doğum Yeri</b>	Ankara	<b>Doğum Tarihi</b>	26.06.1982
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kimlik No</b>	14528815688
<b>E-mail</b>	evatandaslar@medipol.edu.tr	<b>Tel</b>	543-458-9000

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi/Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	2007
<b>Lise</b>	Ataköy Cumhuriyet Lisesi	2000

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl )</b>
<b>Biyolog</b>	Medipol Üniversitesi - REMER	2014 -
<b>Satış Temsilcisi ve Aplikasyon Uzmanı</b>	Medsantek Laboratuar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.	2012-2014
<b>Postgraduate Fellow</b>	Yale University	2011-2012
<b>Öğrenci Asistanlığı</b>	İstanbul Üniversitesi	2004-2006

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu			
YÖKDİL-2017	82.5		

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı -2016	68,49995	67,22702	60,03055

#### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

#### Sertifikalar

Yeditepe Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2010
-----------------------	---------------------------------------	------

#### Uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Lockwood CJ, Kayisli UA, Stocco C, Murk W, **Vatandaşlar E**, Buchwalder LF, Schatz F. "Abrupton-induced preterm delivery is associated with thrombin-mediated functional progesterone withdrawal in decidual cells." Am J Pathol. 2012 Dec;181(6):2138-48.

Schatz F, Kayisli UA, **Vatandaşlar E**, Ocak N, Guller S, Abrahams VM, Krikun G, Lockwood CJ. "Toll-like receptor 4 expression in decidual cells and interstitial trophoblasts across human pregnancy. " Am J Reprod Immunol. 2012 Aug;68(2):146-53.

