



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA YAŞA BAĞLI
HİPOKAMPUSTEKİ PROTEİN PROFİL DEĞİŞİMİ İLE
MEYDANA GELEN FARKLILIKLAR VE İLİŞKİLİ
YOLAKLARIN TRANSGENİK 5xFAD FARE MODELİ
ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

AYŞEGÜL SÜMEYYE ARZUMAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. MEHMET OZANSOY

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. AHMET TARIK BAYKAL

İSTANBUL-2016

TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması 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 , DanıŐmanım Sayın Hocam Y. Doç. Dr. Mehmet Ozansoy'a ve İkinci DanıŐmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a çalıŐmam sırasında tüm yardım, destek ve sabırları için,

ÇalıŐmam sırasında yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Şeyma Türkseven, BüŐra Gürel, AiŐe Rümeysa Mazı ve REMER bünyesinde çalıŐan tüm arkadaşlarıma,

Desteklerini her zaman hissettiren Annem, Babam ve kardeŐim Abdullah'a

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
RESİM, ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ.....	vii
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ ve AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Alzheimer Hastalığı.....	5
4.1.1. Alzheimer hastalığının türleri	6
4.1.2. Alzheimer hastalığının patofizyolojisi.....	7
4.1.3. AH ilerleyişi ve hipokampus	9
4.2. Fare Modeli	10
4.3. Proteomik Ekspresyon Analiz Yöntemi	12
5. MATERYAL VE METOT	13
5.1. MATERYAL.....	13
5.1.1 Ekipmanlar.....	13
5.1.2. Kimyasallar.....	15
5.2. METOT	18
5.2.1. Deney gruplarının oluşturulması - genotipleme	18
5.2.1.1. DNA eldesi;.....	18
5.2.1.2 Polimeraz zincir reaksiyonu;.....	18
5.2.1.3 Agaroz jel dökme ve görüntüleme;.....	20
5.2.2. Proteomik analizi:.....	21
5.2.2.1. Örnek hazırlama	21
5.2.2.2. Homejenizasyon ve mikrodiyaliz:.....	21
5.2.2.3. Konsantrasyon tayini:.....	21
5.2.2.4. Proteinlerin FASP metot ile peptide dönüştürülmesi:.....	22
5.2.2.5. Sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi.....	23
5.2.3. Biyoinformatik analiz	24
5.2.3.1 <i>Progenesis QI for Proteomics</i> ile proteinlerin belirlenmesi ve kantifiye edilmesi:	24
5.2.3.2. Ingenuity pathway analysis (IPA):.....	25
5.2.4. İmmunohistokimyal analiz.....	25
5.2.5. Mikroskopik görüntüleme.....	26
5.2.6. Western blotting.....	26
5.2.7. Morris su tankı davranış testi.....	28
6. BULGULAR.....	30

6.1. Deney gruplarının oluşturulması	30
6.1 Proteomik çalışmaları:	31
6.2. IPA yolak analizi	34
6.3. DAVID	38
6.4. İmmunohistokimyasal analiz	41
6.5. Western blot analiz	42
6.6. Morris su tankı	43
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
8. KAYNAKLAR	48
9.EKLER.....	52
10. ETİK KURUL ONAYI.....	58
11. ÖZGEÇMİŞ.....	60



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LC	Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometresi
HCl	Hidroklorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
APP	Amiloyid Öncü Protein
PSEN1	Presenilin-1
UPX	Universal Protein Ekspresyon Kiti
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyl
FASP	Filtre Yardımı İle Örnek Hazırlama Kiti
ACN	Asetonitril
GluFib	Glu1-Fibrinopeptid B Standart
AmBic	Amonyum Bikarbonat
APS	Amonyum Persülfat
TEMED	Tetrametiletildiamin
PBS	Phosphate Buffer Saline
5xFAD	5 mutasyonlu ailesel Alzheimer Hastalığı
TAE	Tris-Asetat-EDTA
IAA	İyodoasetamid
UPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IPA	Ingenuity Yolak Analiz
BSA	Bovine Serum Albumin
PVDF	Polivinilidenflorit
PBS-t	Fosfat Tampon Saline- Tween 20
ECL	Gelişmiş Kemilüminesans
AH	Alzheimer Hastalığı

RESİM, ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ

ResimlerListesi

Resim 4.1: İlk Alzheimer hastalığı teşhisi konulan Auguste Deter(solda) Alzheimer hastalığını ilk kez tanımlayıp vakasını yayınlayan psikiyatr ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer	5
Resim 4.3: Sağlıklı Nöronda Mikrotübül (üstte) AH'ye ait nöronda mikrotübül ve NFT (altta).....	9
Resim 4.4: Alzheimer hastalığının yayılımı.	10
Resim 5.1: Western Blot Transfer sistemi Katmanları	28
Resim 6.1: 3 aylık 5xFAD ve kontrol grubundaki protein-lysine 6-oxidase (LOX) immunohistokimya görüntüsü.....	41
Resim 6.2: 6 aylık 5xFAD ve kontrol grubundaki ras-related protein Rab 8B immunohistokimya görüntüsü.....	41

Şekiller Listesi

Şekil 4.2: Amilodojenik olmayan proteoliz(solda) Amilodojenik olan APP proteoliz (sağda).....	8
Şekil 6.1: Genotipleme sonucu agaroz jel görüntüsü.....	30
Şekil 6.2: (A) 3 aylık deney grubu hipokampus bölgesi. (B) 6 aylık deney grubu hipokampus bölgesi.....	32
Şekil 6.3 : IPA analizi sonucu en ön plana çıkan ağlar. 3 aylık hipokampuste değişen proteinler.....	34
Şekil 6.4 : IPA analizi sonucu en ön plana çıkan ağlar. 6 aylık hipokampuste değişen proteinler.....	35
Şekil 6.5 : IPA analizi sonucu ön plana çıkan yolaklar. (A) 3 aylık hipokampus ile ilişkili yolaklar. (B) 6 aylık hipokampus ile ilişkili yolaklar.	37
Şekil 6.6 : DAVID fonksiyonel gen ontoloji kullanılarak 3 aylık 5xFAD hipokampusunde değişmiş proteinlerin analizi (A) Hücresel içerikler. (B) Moleküler Fonksiyonlar.....	39
Şekil 6.7 : Şekil: DAVID fonksiyonel gen ontoloji kullanılarak 6 aylık 5xFAD hipokampusunde değişmiş proteinlerin analizi (A) Hücresel içerikler. (B) Moleküler Fonksiyonlar. (C) Biyolojik İşlevler	40
Şekil 6.8 : LOX Western blot görüntüsü ve analizi	42
Şekil 6.9 :Rab 8B Western blot görüntüsü ve analizi	43

Tablolar Listesi

Tablo 5.1: Deneyde kullanılan Ekipmanlar	13
Tablo 5.2: Genotipleme Malzemeleri	15
Tablo 5.3: Ekspresyon Analizinde Kullanılan Malzemesler.....	16
Tablo 5.4: İmmunohistokimyasal Analizde Kullanılan Malzemeler	17
Tablo 5.5: Western Blot Malzemeler	18
Tablo 5.6: Tek Bir Örnek İçin PCR Karışımı	20
Tablo 5.7: Kullanılan Primer Dizileri	20
Tablo 5.8: Thermal Cycler PCR Protokolü.....	21
Tablo 6.1: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hasta ve Kontrol Grupları.....	30
Tablo 6.2: 3 Aylık Deney Grubu Hipokampusünde Başlıca Değişen Proteinler Listesi	32
Tablo 6.3: 6 Aylık Deney Grubu Hipokampusünde Başlıca Değişen Proteinler Listesi	33
Tablo 6.4: 3 Aylık 5XFAD Hipokampusünde Bulunan Upstream Regulators.....	36
Tablo 6.5: 6 Aylık 5XFAD Hipokampusünde Bulunan Upstream Regulators.....	36

1.ÖZET

ALZHEİMERHASTALIĞINDA YAŞA BAĞLI HİPOKAMPUSTEKİ PROTEİN PROFİL DEĞİŞİMİ İLE MEYDANA GELEN FARKLILIKLAR VE İLİŞKİLİ YOLAKLARIN TRANSGENİK 5xFAD FARE MODELİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Alzheimer Hastalığı en yaygın görülen demaslardan biridir.Fakat, hastalığın mekanizması ve hastalıkla ilgili biyobelirteçler henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.Bu çalışmada, 5xFAD transgenik fare modeli ve onların kontrolleri kullanarak hastalığın temel mekanizmasını anlamak için farklı yaş gruplarında proteomic çalışması yapılarak değişim gösteren proteinleri, yolakları ve farklı yaş grupları arasındaki protein ilişkilerine bakılmış ve hastalığın gelişimini incelemek hedeflenmiştir.İki farklı yaş grubunda, farklı protein tanımlanması ve ekspresyonlarının belirlenmesi için kütle spektrometresi tabanlı proteomik teknolojisi kullanılmıştır.Üç ve altı aylık 5xFAD trasgenik fare modeli hipokampusünde istatistiksel anlamlı olarak değişen toplam 137 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin 15 tanesi 3 aylık dokuya, 122 tanesi ise 6 aylık hipokampus dokusuna aittir. Bunlara ek olarak, biyoinformatik yazılımlar kullanılarak tanımlanan proteinlerin hangi proteinler tarafından düzenlendiği.Bu çalışmanın amacı, yaşa bağlı olarak değişen 5xFAD hipokampus bölgesindeki protein değişikliklerini inceleyip Alzheimer hastalığının temel mekanizmasını anlamaya çalışmaktır.Sonuç olarak; bu çalışmada elde ettiğimiz veriler bize gösterdiki 3.ayda değişim gösteren proteinler 6. aydaki yolaklardaki bozulmalara sebep olduğu gözlemlenmiştir. En çok etkilenen yolak ise mikrotübül bozukluk olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:Alzheimer hastalığı, hipokampus, proteomic, 5xFAD

2.ABSTRACT

AGE-DEPENDENT CHANGES IN PROTEOME OF ALZHEIMER DISEASE AFFECTED BRAIN AREA, HIPPOCAMPUS, BY USING 5xFAD TRANSGENIC MOUSE MODEL

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. Although numerous studies have been performed to elucidate the pathology of AD, many mechanisms and biomarkers are yet to be discovered. Here, we examined the hippocampus in 5xFAD transgenic mouse model to elucidate the mechanisms that are involved in onset and development of AD. We performed mass spectrometry-based proteomic analysis for the identification of differentially expressed proteins in different time points. We identified a total of 137 proteins with significant changes in hippocampus of 3-month-old and 6-month-old of 5xFAD transgenic mouse model. 15 and 122 of these proteins belong to 3-month-old and 6-month-old 5xFAD mice respectively. Bioinformatic analyses were performed for the examination of upstream signaling interaction of 137 proteins. These results demonstrate a novel age-dependent change in the proteome of 5xFAD hippocampus which will help understanding the mechanisms of AD. As a result, disease progression of AD is directly proportionate to molecular mechanism of AD, which is changed with increasing age and microtubule movement pathway is the most affected pathway according to our results.

Keywords: Alzheimer's Diseases, Hippocampus, Proteomics, 5xFAD

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Alzheimer's hastalığı (AH) yaş ilerledikçe unutkanlıkla ortaya çıkan hafıza, konuşma gibi bilişsel bozulmanın gösterdiği en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Alzheimer Hastalığı'nın (AH) dünya genelinde 36 milyar olduğu ve bu sayının 30 yıl içerisinde 3 katı artacağı öngörülmektedir. Bu hastalığın ilk tanımlandığından buyana yüzyılı aşkın süre geçmiştir fakat mekanizması hala çözümlenememiş ve hala hastalığın ilerleyişini durduran bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Geri dönüşümü olmayan ve sürekli ilerleyen bir hastalık olan Alzheimer's hastalığının patojenitesi, hücre dışı amyloid plak birikimi, hücre içi nörofibril düğümler, beynin hipokampus ve cortex bölgelerini başta etkileyen nöron ölümleri, anormal lizozom ve endozom birikimleri ve glia hücreleri sebebiyetli inflamasyonlar oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığına sebebiyet oluşturan bu nöropatolojilerin hangi proteinler ve yolaklar ile ilişkilendiğinin anlaşılması hastalık mekanizmasını anlamak için atılan büyük bir adımdır Bishop et al. (1).

Hipokampus beynin limbik sisteminde yer alan hafıza, öğrenme ve duygular ile ilişkili Alzheimer hastalığında en çok etkilenen bölgedir. Yaşa bağlı olarak sürekli ilerleme gösteren Alzheimer hastalığının incelenmesinde hipokampus önem arz etmektedir. Hipokampusta değişim gösteren protein profil farklılığı bize hastalığının mekanizması ve gidişatı hakkında fikir veren bölgedir Hartl et al. (2).

Transgenik 5 mutasyonlu ailesel Alzheimer's hastalığı (5xFAD) taşıyan hayvan modeli yaş ile birlikte progresif olarak hastalık nöropatoloji göstermektedir. 1.5 aylıkken amyloid plak birikimi, 4 aylıkken bilişsel bozukluklar ve 6. aydan sonra nöron ölümleri, sinaps kayıpları gözlenmektedir Maya-Vetencourt et al. (3).

Hipokampusta yer alan hastalığa bağlı patolojilerin 5xFAD transgenik hayvan modelinde gözlenmesi sebebi ile Alzheimer hastalığı modeli olarak çalışabilecek en uygun fare modellerindedir.

Hastalık mekanizmalarının anlaşılabilmesi için hastalıkla ilgili yolakların ve bu yolaklarda yer alan proteinlerin önemi büyüktür. Hızlı bir şekilde büyüyen çalışma

alanı proteomiks hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında kullanılan yüksek teknoloji bir tekniktir.

Bu tez çalışmasında, yaşa bağlı transgenik 5xFAD farelerdeki proteome profil değişimlerinin ve bu proteinlerin etkiledikleri yolların anlaşılması temel Alzheimer Hastalığının mekanizması hakkında bize fikir vereceği görüşünden yola çıkılarak yapılan bir tez çalışmasıdır.



4.GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AH) en yaygın görülen demanstır. Tüm demansların %60-%80'inini oluşturur. 2015 yılında yayınlanan rapora göre 46.8 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki her 20 yılda bir bu sayı 2 kat artmaktadır. 2030 yılında yaklaşık 74.7 milyon, 2050 yılında ise 131.5 milyon Alzheimer hastası olacağı tahmin edilmektedir. AH bundan 100 yıl önce 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından ilk defa tanımlandı, fakat semptomları, nedenleri, risk faktörleri ve tedavisi konusu tam olarak hala açıklığa kavuşmamıştır (Resim4.1). İlk olarak Dr. Alois Alzheimer; hafıza kaybı, paranoya ve psikolojik değişiklikler gösteren hastası Auguste D.'nin ölümünden sonra otopsi yapmış ve korteksin normale göre büzüşük olduğunu gözlemlemiş ve daha önce yaşlıların beyinde de saptanan senil plaklar ile daha önce hiç tanımlanmamış neurofibriller yumakları gözlemlemiştir O'Brien (4).



Hospital photo, Auguste Deter



Dr. Alois Alzheimer

Resim4.1: ilk Alzheimer hastalığı teşhisi konulan Auguste Deter (solda), Alzheimer hastalığını ilk kez tanımlayıp vakasını yayınlayan psikiyatr ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer (sağda).(<http://alchetron.com/Auguste-Deter-1185792-W>)

4.1.1. Alzheimer Hastalığının Türleri

Alzheimer hastalığı erken başlangıçlı AH, geç başlangıçlı AH ve ailesel olarak ortaya çıkabilir. Tüm hastaların içerisinde, ailesel olarak tanımlanan genetik geçişin gözüktüğü AH hastalarının oranı yaklaşık %1'dir. Bu Alzheimer hastalığının tamamen genetik formudur. Ailenin en azından 2 jenerasyonunda bulunur. Ailesel AH sebebi APP, PSEN1 ve PSEN2 mutasyonlarıdır Selkoe et al. (5). 21.kromozom üzerindeki APP geninin bulunan mutasyon sonucu Alzheimer hastalığı taşıyan yaklaşık olarak dünya üzerinde 12 aile bulunmaktadır. 14. Kromozom üzerinde bulunan Presenilin 1 geninin sebep olduğu ailesel Alzheimer hastalığı taşıyan aile sayısı da oldukça fazladır. Bu gen üzerinde 70'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Ve son olarak küçük bir aile grubunda yine 14.kromozom üzerinde yer alan presenilin 2 genindeki mutasyonun sebep olduğu Alzheimer hastalığı görülmektedir Goate et al. (6).

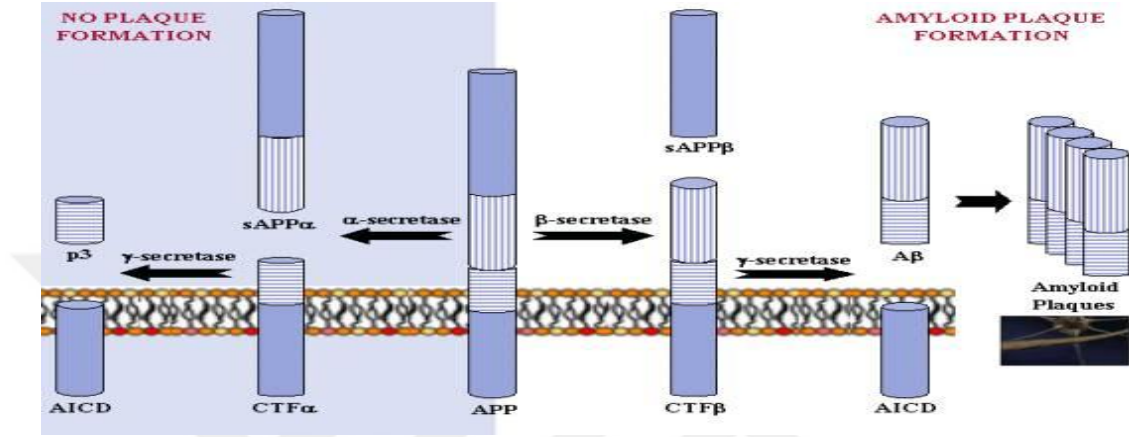
Bunların dışında dünyada adlandırılmış bazı mutasyonlar vardır. Bunlardan bazıları; Londra mutasyonu olarak bilinen bir APP mutasyonu (APP V717I) dünya genelinde en yaygın görülen APP mutasyonudur. Bu mutasyona sahip ailede hastalığın görülmesi 57 ± 5 yaş aralığında olduğu yapılan otopsi ile doğrulanmıştır Goate et al. (6). Dünya genelinde bu mutasyonu taşıyan yaklaşık 30 aile bulunmaktadır. Bilinen APP mutasyon çeşitlerinden bir diğeri de İsveç mutasyonudur (APP KM670/671NL). Bu mutasyon lizin (K) ve metionin (M) aminoasitlerinin yerini aspargin (N) ve leucine (L) aminoasitlerinin alması sonucu APP'nin β - *secretaz* kısmının yakınında olan bir mutasyon çeşididir. İki tane büyük İsveç ailesinde bu mutasyon görülmektedir. Bu mutasyona sahip olan hastalarda ilk olarak hafıza kaybı görülmektedir daha sonra AH ile ilişkili tüm teşhis kriterleri gözlenmektedir Mullan M (7). Diğer bir APP mutasyonu ise Florida mutasyonudur (I716V). Bu mutasyon ilk olarak Amerika'da teşhis edilmiş. Ortalama 53 yaşında unutkanlıkla baş gösteren bir APP mutasyon çeşididir Eckman et al. (8). Alzheimer'ın mekanizmasını anlamak için ailesel AH'na sahip aileler, hayvan modelleri ve postmortem beyin dokuları ile çalışılmaktadır.

Fakat, AH çok büyük bir kısmı sporadiktir. Bu hastalar için yaşlanmak en büyük çevresel risk faktörüken, Apolipoprotein E (ApoE)'nin $\epsilon 4$ alleli en önemli genetik risk faktörüdür (9). Sporadik olan Alzheimer hastalığı erken başlangıçlı AH ve geç başlangıçlı AH olarak ikiye ayrılır. 65 yaşından daha önce görülen Alzheimer hastalığına erken başlangıçlı AH olarak adlandırılır. 40-50'li yaşlarda ortaya çıkan hastalık tüm AH'nin yaklaşık %10'nunu oluşturmaktadır. Down sendromuna sahip hastalar erken başlangıçlı AH'nin görülme riski daha yüksektir. Erken başlangıçlı AH de ailesel AH gibi 3 gende görülen mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Geç başlangıçlı AH ise en yaygın görülen AH türüdür. 65 yaşından sonra görülen geç başlangıçlı AH apolipoprotein E olarak adlandırılan gen ile ilişkilidir. Bu genin en önemli 3 alleli vardır. Bunlar; APOE $\epsilon 2$, APOE $\epsilon 3$ ve APOE $\epsilon 4$ 'dür (10). APOE allelerinden $\epsilon 2$ AH riskini azalttığı ve koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Corder et al. (11), Corder et al. (12)). APOE $\epsilon 3$ allelinin AH'yi etkilemediği düşünülürken APOE $\epsilon 4$ allelinin AH riskini artırdığı belirtilmiştir (Corder et al. (12)). APOE $\epsilon 4$ AH için bir risk faktörü oluşturur fakat AH sebebi değildir. Bunun yanında çevresel faktörlerde etki göstermektedir.

4.1.2. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

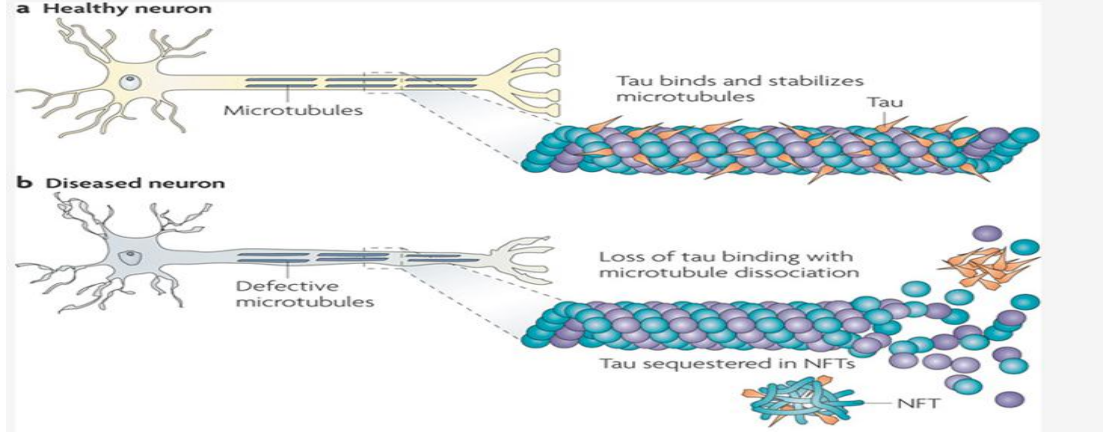
Alzheimer hastalığı en bilinen iki patoloji ile karakterize olmuştur. Bunlardan biri ekstrasellüler amiloid betadan kaynaklı plaklar ve hiperfosforile tau proteinin oluşturduğu intrasellüler nörofibriler yumaklardır (Lee et al. (13)). Bu değişiklikler ile birlikte sinaptik kayıp, glial aktivite ve nöron kaybı da gözlemlenir. Senil plak, AH'nin nöropatolojik özelliği, 38-43 aminoasit amiloid beta peptitlerinden oluşur. $A\beta$, büyük integral zar proteini olan Amiloid öncü proteinin (APP) α , β ve γ sekretazlar tarafından kesilerek oluşur (Selkoe (14)) (Şekil 4.2). APP'nin sekretazlar tarafından kesimi iki şekilde olur (Hooper (15)). Bir tanesi amiloidolojik olmayan proteolitik işlemidir. İlk olarak α sekretaz enzimi APP'yi transmembran bölgesinden keser daha sonra γ sekretazın intrasellüler parçayı kesmesi ile amino ucunda çözünebilir amiloid öncü protein alfa (APPs α) ve karboksil ucunda ise C terminal alfa fragmanı (α CTF), daha sonrasında ise APP intrasellüler domain oluşur (AICD).

Amiloidolojik olan kesim işlemi ise, α sekteraz yerine β sekteraz enziminin APP'yi farklı bir bölgeden keserek oluşur. Bu işlem sonucu ortaya çıkan ürünler ise APPs β , A β 1-40, A β 1-42 ve AICD oluşur. Ve bu birikimler nöronun dışında birleşerek senil plakları oluştururlar.



Şekil 4.2: Amiloidojenik olmayan proteoliz (solda), Amiloidojenik olan APP proteolizi (sağda). (https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_7/Page2.htm)

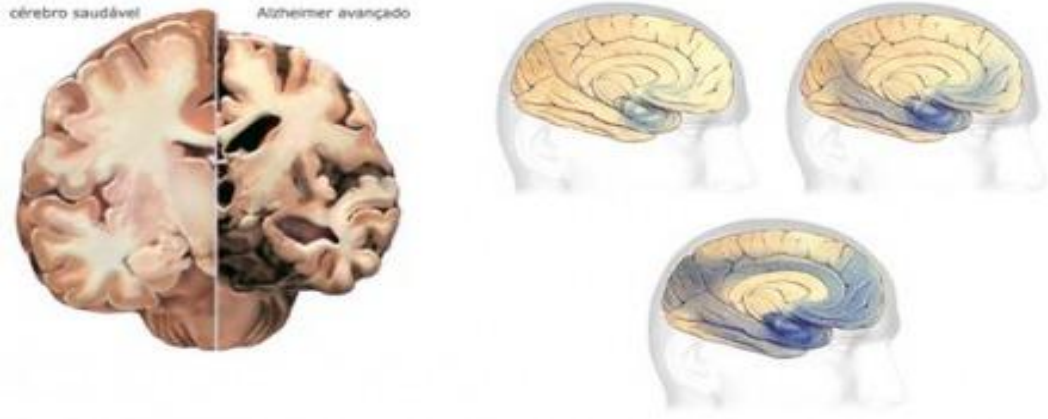
AH'nin en belirgin diğer karakterize yapısı nerofibriller yumaklardır. Neurofibriller yumaklar tau proteinin nöron içerisinde anormal birikimi ile meydana gelir. Fosforile tau proteinleri, nöron içerisinde iletimini sağlayan, hücrenin destek yapısını oluşturan mikrotübüllerin stabilizesini sağlayan proteinlerdir (Resim 4.1). Hiperfosforile hale gelen tau proteinleri, mikrotübül yapısından ayrılarak nörofibriller yumakların oluşumuna yol açmaktadır. Nörofibriller yumakların oluşumu, nöron içi iletim, nöronun iskelet yapısının bozulması ve nöron kaybına sebep olur Hernandez et al. (16).



Resim4.1:Sağlıklı nöronda mikrotübül (üstte), AH'ye ait nöronda mikrotübül ve NFT (altta)Brunden et al. (17).

4.1.3. AH İlerleyişi ve Hipokampus

Hipokampus beynin medial temporal lobunda yer alan öğrenme ve hafıza ile ilişkili en önemli beyin bölgesidirSquire (18). Öğrenme ve hafızada önemli rol oynayan hipokampus bölgesinde Uzun süreli potansiyeller (LTP) ve yeniden sinaptik oluşumları gibi fonksiyonel ve yapısal değişimler meydana gelirBliss et al. (19), Matsuzaki et al. (20). AH'nin erken döneminde ilk hasar görmeye başlayan bölgelerden biridirBraak et al. (21). Hipokampus dört bölümden oluşur. Bu bölümler, CA1, CA2, CA3 ve subikulumdur. AH' de ilk olarak entorial korteks ve hipokampuste patoloji meydana gelir ve hafıza kaybı başlar. Daha sonra AH ile ilişkili patoloji tüm kortekse yayılır ve muhakeme, dikkat ve okuma gibi bilişsel bozukluklar görülürMann (22). Nöron kaybı ve atrofide hipokampus ve korteks bölgelerinde hastalığın ilerleyen evrelerin meydana gelir (Resim 4.2).



Resim4.2: Alzheimer hastalığının yayılımı.

4.2. Fare Modeli

Alzheimer hastalığı yaş ile birlikte ilerleyen bir hastalıktır. Zaman ilerledikçe dereceli olarak beyindeki hasar artar ve semptomlar gelişir. Nörodejeneratif hastalıklar kan, beyin-omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarından alınan örnekler ile çalışılmaktadır. Fakat, hastalığın derecesini anlamak ve beyindeki hasarın hangi boyutlarda olduğunu kesin olarak belirlemek ve kesin tanı koymak otopsi ve biyopsi sonucunda AH'ye özgü patolojik bulguların saptanması ile yapılabilmektedir. AH patogenezinin nasıl olduğunu anlamak için hayvan modelleri oluşturulmuştur ve Alzheimer hastalığının ilerleme süreçleri incelenebilmiştir. Ailesel Alzheimer hastalığı %1-%5 oranında gözlenmektedir fakat sporadik vakaların mekanizmasını anlamak için ailesel AH mekanizmasının çözülmesi hedeflenmektedir. Alzheimer hastalığının mekanizmasını anlamak, tedavisine yönelik ilaç geliştirmek, hastalığın fizyopatolojisi ile ilişkili genlerin kapsamlı bir şekilde çalışmak, beyindeki nörokimyasal ve nöropatolojik değişimlerin neler olduğunu belirlemek, davranışsal ve bilişsel bozuklukları kapsamlı bir şekilde çalışabilmek için farklı transgenik fare modelleri oluşturulmuştur. Oluşturulan hayvan modellerinde dikkat edilen 3 kriter bulunmaktadır. Bu kriterler:

Görünüş geçerliliği: Oluşturulan modelde hastalığın aynı semptomları görünmesi. Örneğin; hastalık geç başlangıçlı ve ilerleyici olarak modelde görünüyor mu,

öğrenme ve hafıza bozuklukları var mı, artan bir stres seviyesi var mı gibi semptomlar kontrol edilir.

Kurgusal geçerliliği: Model organizma fenotipi ve hastalığın aynı patofizyolojik mekanizmaya sahip olması durumudur. Kurgusal geçerliliği doğrulamak için amiloid plak oluşumu, nörofibriller yumak oluşumu, nöroinflamasyon gözlemleniyor mu, kolinerjik ve koradrenajik nöron kaybı görünüyor mu ve hipokampus ve kortekste çok büyük bir nöron kaybı gözlenmekte midir gibi soruların cevabı aranmaktadır.

Kestirim geçerliliği: Model organizmaya uygulanan tedavinin kliniğe uygunabilirliği.

Bu üç kriter göz önünde bulundurularak transgenik hayvan modelleri oluşturulur. Oluşturulan çokça Alzheimer transgenik fare modeli bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; Tg2576, APP23, APP/PS1, 3xtg AD ve 5xFAD'dir. Bizim kullandığımız transgenik fare modeli 5xFAD. 5xFAD fare modeli yukarıda bahsedilen kriterlere göre değerlendirildiğinde geç başlangıçlı AH özelliği ve artan stres seviyesi göstermemektedir. Fakat öğrenme ve hafıza bozukluğu görünmektedir. Amiloid plak birikimi, kolinerjik ve noradrenajik nöron kaybı, nöroinflamasyon patofizyolojini gösterirken, tau hiperfosforilasyon, nörofibriller yumak ve beyin bölgelerin, hipokampus ve kortekste, büyük oranda nöron kaybı göstermemektedir Bilkei-Gorzo (23). 5xFAD transgenik fare modeli için kestirim geçerliliği henüz açıkça rapor edilmemiştir.

5xFAD transgenik fare modeli 2006 yılında 5 mutasyonlu olarak geliştirilmiştir. 5xFAD İsveç (K670N/M671L), Florida (I716V) ve Londra (V717I) ailesel mutasyonları içerir. Bunlara ek olarak iki tane PSEN1 gen mutasyonu (M146L, L286V) bulundurulur. 5xFAD fare modeli amiloid plak birikimini ilk gösteren hattırOakley et al. (24). Bu modelde hücre içi A β birikimi 1,5 aylıkken başlarken, hücre dışı A β birikimi 2 aylıkken başlamaktadır. Plak birikimini noradrenerjik nöron kaybı Kalinin et al. (25) ve kolinerjik nöron kaybıDevi et al. (26) takip eder. Bu değişimler bilişsel bozukluklaraGirard et al. (27) ve bilişsel olmayan hareket anormalliklerineJawhar et al. (28) yol açar. Bilişsel bozukluklar dördüncü aydan itibaren gözlemlenebilirKimura et al. (29).

Transgenik fare modelleri AH fenotipi ile benzerlik göstermektedir fakat vücut ve beyin yaşı arasında farklılıklar vardır. Buna rağmen AH hastalığının patofizyolojisini anlamakta önemli rol oynarlar ve hastalığa tedavi geliştirmekte katkı sağlarlar.

4.3. Proteomik Ekspresyon Analiz Yöntemi

Proteomik; kompleks karışımlarda, doku ve kan gibi farklı türde örneklerde eksprese edilen tüm proteinlerin, identifikasyonu, yapısal ve fonksiyonel özelliklerini, yerleşimlerini, miktarlarını, post-modifikasyonlarını açıklığa kavuşturulmasını sağlar Basaran et al. (30). Günümüzde yüksek teknoloji proteomik cihazları biyobelirteç keşfi, ilaç geliştirme ve hastalık mekanizmasını anlamak için kullanılmaktadır. Kütle spektrometresi kullanılarak protein ve peptidlerin analizi yüksek duyarlılık ve güvenilirlikte yapılmaktadır. MS kullanılarak triptik peptidlerin kütle/yük oranları belirlenip, daha sonrasında MS/MS analizi yapılarak sekans bilgisi elde edilir. Sekans bilgisi elde edilen peptidlerin, biyoinformatik yazılımlar kullanılarak tanımlanması, yerleşimi, ekspresyon oranı, post-translasyonel modifikasyonları gibi bir çok bilgisine ulaşmak mümkündür. Yapılan bu çalışmada, etiketsiz LC-MS^E teknolojisi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntem ile daha az protein miktarından herhangi bir etiketleme yapmadan güvenilir ve çok miktarda protein tanımlaması yapılabilmektedir.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. MATERYAL

5.1.1 Ekipmanlar

Tablo 5.1: Denejde Kullanılan Ekipmanlar

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodları
Ear Tag	Harvard Apparatus	52-4717
Harris Micro-Punch	Sigma-Aldrich	Z708674
T100™ Thermal Cycler	BioRAD	1861096
Santrifij	Orto Alsera	Biocen 22R
Sub-Cell ® GT Horizontal Electrophoresis Systems, 15× 10 cm Tray	BioRAD	1704401
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	
Glass/PTFE Potter Elvehjem Tissue Grinder 2 mL	Omni International	07-358029
Multi-Therm Shaker	Benchmark Scientific	H5000-HC
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Concentrator Plus	Ependorf	
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	
Mini-PROTEON Tetra Cell	BioRAD	1658000EDU
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070
Spectrometre cihaz	BioRAD	
Axio Zoom V16	Zeiss	
Ultrasonicator	Bandelin Sonarex	
LC-Vial	Supelco	29413-U
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
0.2 mL PCR tüp	Isolab	123.01.002
Laminar Flow	ESCO	

-20 dolap	Thermo Scientific	
-80 dolap	Arctiko	
+4 dolap	Uğur	
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
dH ₂ O Cihazı	Millipore	ZRQSV8WW
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000
pH metre	Isolab	pH7110
Spin down santrifüj	Sprout	



5.1.2. Kimyasallar

Tablo 5.2: Genotipleme Malzemeleri

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodları
Tris/HCl	Sigma-Aldrich	T5941
NaOH	Sigma-Aldrich	221465
EDTA	Sigma-Aldrich	E9884
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
Trizma® Base	Sigma-Aldrich	T1503
Glacial Acedic Acid	Sigma-Aldrich	537020
Isoflurane	AbVie İlaç	
Taq PCR Kit	BioLabs® Inc.	E5000S
APP <i>Forward</i> Primer	Sentromer	*
APP <i>Reverse</i> Primer	Sentromer	*
PSEN1 <i>Forward</i> Primer	Sentromer	*
PSEN1 <i>Reverse</i> Primer	Sentromer	*
Kontrol <i>Forward</i> Primer	Sentromer	*
Kontrol <i>Reverse</i> Primer	Sentromer	*
Qubit Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32853
SafeView	abm	G108
Marker		
Yükleme Boyası	Thermo Scientific	R0611

* Primerler Sentromer tarafından Tablo 5.6 belirtilen dizilere göre tasarlanmıştır.

Tablo 5.3: Ekspresyon Analizinde Kullanılan Malzemeler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodları
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 Millipore	15333
[Glu1]-Fibrinopeptide B Standart	Waters	700004729
Bradford Reagent	BioRAD	

Tablo 5.4: İmmunohistokimyasal Analizde Kullanılan Malzemeler

Gereç	Markası	Ürün Kodu
Mounting Medium		
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
KCl	Sigma-Aldrich	P9333
Sodyum Fosfat, Dibazik Moleküler Biyoloji Dereceli	Merck Millipore	567547
Potasyum Fosfat, Monobazik Moleküler Biyoloji Dereceli	Merck Millipore	529568
Anti-LOX	Santa Cruz	sc-32409
Anti-RAB 8B	Santa Cruz	Sc-26579
VECTASTAIN Universal Quick HRP Kit (Peroxidase)	Vector Laboratories	PK-7800
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vceter Laboratories	SK-4100

Tablo 5.5: Western Blot Malzemeleri

Kullanılan Gereçler	Marka ve Ürün Kodları
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions Kiti	BioRAD # 1610180
Ammonium Persulfate	Sigma-Aldrich # A3678
TEMED	Sigma-Aldrich # T9281
2X Laemmli Sample Buffer	BioRAD # 1610737
Beta Mercaptoethanol	
Glycine	Sigma-Aldrich # G8895
SDS	Sigma-Aldrich # L3771
Sodium Chloride	Sigma-Aldrich # S7653
Potassium Chloride	Sigma-Aldrich # P9333
Potassium Phosphate, Monobasic Molecular Biology Grade	Merck Millipore # 529568
Sodium Phosphate, Dibasic Molecular Biology Grade	Merck Millipore # 567547
Tween-20	Sigma-Aldrich #P1379
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit	BioRAD # 1704272
Methanol	Merck Millipore # 106009
Skim Milk	Fluka # 70166
LOX (V20)	Santa Cruz # sc-32409
RAB 8B (T-15)	Santa Cruz # sc-26579
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz # sc-2020
Beta actin rabbit monoclonal	Santa Cruz # sc-47778
Goat anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz #sc-2005
Clarity Western ECL Blotting Substrate	BioRAD # 1705060

5.2. METOT

5.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması - Genotipleme

Jackson Laboratuvarından satın alınan 5xFAD transgenik fare modeli; Hemizigot 5xFAD fareler, B6/SJL F1 üretim fareleri ile çaprazlanarak üretildi ve anestezi altına kulağında doku alınarak yapılan genotipleme sonucu 5'er tane (3, 6 aylık) yetişkin dişi 5xFAD transgenik fare modeli ve onların aynı batından doğan transgenik olmayan kontrol grupları oluşturuldu. Hayvanların bakımı ve operasyonlar İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezinde (MEDİTAM) gerçekleştirilmiştir. Tüm hayvan deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi hayvan çalışmaları komitesi tarafından onaylanmıştır.

5.2.1.1. DNA Eldesi;

Üretim kafesinde 3 haftalık olana kadar bekletilen farelerin kulaklarından punch yardımı ile doku alınır. Alınan dokular 75 μ l, 25mM NaOH/EDTA içeren 0.2ml'lik PCR tüplerine alınır. Farenin diğer kulağına numarasını belli etmek ve gruplandırmak için küpe takılır. PCR tüpleri 98⁰ C'de *Thermal Cyclercihazında* 1 saat bekletilir. 1 saat sonunda 75 μ l, 40mM Tris/HCl eklenerek 3 dakika 4000 rpm'de sentrifuj edilen dokulardan 100 μ l alınarak yeni PCR tüplerine aktarılır.

5.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu;

DNA eldesi işlemleri tamamlandıktan sonra aşağıda verilen ölçüler doğrultusunda PCR karışımı hazırlanır. Her bir örnek için toplam hacim 25 μ l olacak şekilde. Pozitif kontrol olarak *Taq Polymearse* içermeyen bir örnek hazırlanır.

Tablo 5.6: Tek bir örnek için PCR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
10X Tepkime tampon çözeltisi	1X
ddH ₂ O	
Kontrol F	0.5 μ M
Kontrol R	0.5 μ M
APP F	0.6 μ M
APP R	0.6 μ M
PSEN F	0.6 μ M
PSEN R	0.6 μ M
Deoksinükleotid Solüsyon Mix	200 μ M
Taq Polymerase	1,25 units/50 μ l PCR
DNA	

Tablo 5.7: Kullanılan Primer Dizileri

Primer	Dizi 5' → 3'	Primer Tipi
oIMR1644	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	PSEN1 Transgen (~608 bp)
oIMR1645	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	PSEN1 Transgen (~608 bp)
oIMR3610	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AC	APP Transgen (377 bp)
oIMR3611	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	APP Transgen (377 bp)
oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	İç Pozitif Kontrol <i>Forward</i> (324bp)
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	İç Pozitif Kontrol <i>Reverse</i> (324 bp)

Tablo 5.8: *Thermal Cycler* PCR Protokolü

Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	94°C	3:00 dk
36	94°C	0:30 sn
	57.3°C	1:00 dk
	72°C	1:00 dk
1	72°C	2:00 dk
1	10°C	∞

5.2.1.3 Agaroz Jel Dökme ve Görüntüleme;

PCR ürünlerinin jele yüklenip, görüntülenmesi için 3%'lük agaroz dökülür. 3 gr agaroz tartılarak üzerine 100 μ l 1X TAE tampon çözelti eklenir ve mikrodalga fırında 3 dakika 200°C'de kaynatılır. Kaynadıktan sonra içerisine 5 μ l SafeView eklenir. Hazırlanan kasete dökülür ve 30 dakika donması beklenir. Donduktan sonra jel tanka yerleştirilir. Tarak çıkarılır ve tankın içerisi 1X TAE tampon çözelti ile doldurulur. PCR ürünlerinden 10 μ l alınarak içerisine 2 μ l yükleme boyası eklenir. İlk kuyuya 5 μ l marker konur. İkinci kuyuya hazırlanan kontrol konur ve sırası ile tüm kuyular örnekler ile doldurulur. Daha sonrasında 30 dakika 80V'da yürütülür.

Yürütülen jel görüntülenmek için çıkarılır. BioRAD ChemiDoc cihazına yerleştirilir ve görüntüsü alınır. Görüntüleme sonunda çift bant gördüklerimiz transgenik (5xFAD) farelerden n=5 olarak, tek bant görünen aynı batından olan kontrol farelerden n=5 olacak şekilde deney grupları oluşturulur. (3 ve 6 ay için ayrı ayrı)

5.2.2. Proteomik Analizi:

5.2.2.1. Örnek Hazırlama

Genotipleme yapılan hayvanlar gruplara ayrıldıktan sonra anestezi altına alınmak için 3 dakika izofluran maruz bırakılır. Anestezi altında olan hayvanlar servikal dislokasyon ile kafaları gövdelerinde ayrılır. Ve beyin çıkarılır. Daha sonra hipokampus bölgesi cerrahi işlem ile LoBind tüpe alınıp hipokampus'un mekanik ve kimyasal olarak parçalanma işlemi yapılır.

5.2.2.2. Homejenizasyon ve Mikrodiyaliz:

Çıkarılan hipokampus AmBic ve %1'lik PIC içeren karışıma konur ve doku homojenizatörü ile parçalanır. Sonra parçalanmış olan dokulara mevcut hacimleri kadar %1'lik PIC içeren UPX tampon çözelti (Expedeon, UK) eklenerek 100°C'de 5' kaynatılır ve sonrasında 4°C'de 1 saat bekletilir. Ardından, 15000g'de 10' dakika santrifuj edilir. Supernatant alınarak LoBind tüplere konur. Parçalanmış dokudan elde edilen proteinlerin triptik peptidler haline getirilmesi için FASP uygulanır. Bu protokol uygulanmadan önce tuzlardan uzaklaşmak için örnekler diyaliz yapılır. Mikrodiyaliz tüplerini ilk olarak 50mM AmBic ile 15 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde 50mM AmBic içeren beher içerisinde membranları dengelemek için bırakılır. Daha sonra mikrodiyaliz tüplerinin içerisinde örnekler konulur ve tüm gece boyunca bırakılır. Diyaliz sonrası örnekler LoBind tüpe alınır.

5.2.2.3. Konsantrasyon Tayini:

Triptik peptid elde etmek için uygulanan protokole 50 µg protein ile başlanır. Bunun için *QUBIT 2.0 Fluorometre* yardımı örneklerin konsantrasyonları ölçülür. *QUBIT Assay Kit'inin* içerisinde bulunan tampon çözeltiden her bir örnek için 199 µl olacak şekilde bir eppendorfa alınır. Bu tampon çözeltinin içerisinde her bir örnek için 1

μl olacak şekilde *Qubit Assay kit* içerisinde bulunan protein belirteçten eklenir. Hazırlanan bu çözeltiden her bir örnek için $198 \mu\text{l}$ alınarak *qubit* tüplerine konur ve örneklerden $2 \mu\text{l}$ konur. Kit içerisinde bulunan 3 tane standart solüsyonlarından $10 \mu\text{l}$ alınır ve hazırlanan çözeltiden $190 \mu\text{l}$ konur. Tüm örnekler vortekslenir ve $20'$ dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletilir. *QUBIT 2.0 Fluorometer* ile ilk önce 3 tane standart ölçülür. Daha sonrasında örnekler tek tek ölçülür. Konsantrasyon tayini sonucu $50 \mu\text{g}$ protein olacak şekilde hesaplama yapılır. Yapılan hesaplama sonucu FASP'a başlanır.

5.2.2.4. Proteinlerin FASP metot ile Peptide Dönüştürülmesi:

Kullanılan çözeltiler;

Üre Çözeltisinin Hazırlanması; Kit içerisinde bulunan $1,5 \text{ ml}$ 'lik toz halde bulunan üre tüpüne 1 mL Tris/HCl eklenir ve üre çözününceye kadar oda sıcaklığında vortekslenir.

10X IAA çözeltisinin hazırlanması; $200 \mu\text{l}$ 'lik tüplerde toz halde bulunan IAA üzerine $100 \mu\text{l}$ hazırlanışı yukarıda bahsedilen üre çözeltisinden eklendi ve pipet yardımı ile çözünmesi sağlandı. IAA ışığa duyarlı olduğu için folyo ile ışıktan korundu. 10X IAA çözeltisi kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanarak kullanıldı.

Sindirim Çözeltisinin (Tripsin Endoproteinaz) Hazırlanması; Liyofilize halde $20 \mu\text{g}$ halde bulunan Tripsin $1,5 \text{ ml}$ 50 mM AmBic içerisinde çözünerek her bir örneğe $1 \mu\text{g} / 75 \text{ ml}$ olacak şekilde ilave edilir.

Formik Asit Çözeltisinin Hazırlanması; $1 \mu\text{l}$ LC-MS çalışmaları için uygun 98% saflıkta formik asit 1 ml LC-su içerisinde çözünerek 0.1% 'lik olarak hazırlanır.

Tüm gerekli malzemeler hazırlandıktan sonra $50 \mu\text{g}$ olacak şekilde alınan örnekler filtreli tüplere konur üzerlerine $230 \mu\text{l}$ 'ye tamamlanacak kadar üre örnek solüsyonundan eklenir ve 14.000g 'de 15 dakika olacak şekilde santrifüj edilir. $200 \mu\text{l}$ üre örnek solüsyonundan filtrelerin üzerine eklenir ve 14.000g 'de 15 dakika

santrifuj edilir. Filtre çıkarılır ve toplama tüpü boşaltılır. 10X IAA solüsyonu 1X yapmak için her bir tüp için 10 μ l 10X iodoacemide solüsyondan ve 90 μ l üre örnek solüsyondan konur 1 dakika vortekslenir ve 20 dakika karanlık ortamda inkübe edilir. Örnekler 14.000g'de 15 dakika santrifuj edilir. 100 μ l üre örnek solüsyonundan filtrelerin üzerine eklenir ve 14.000g'de 15 dakika santrifuj edilir. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanır. Filtre çıkarılır ve toplama tüpü boşaltılır. 100 μ l 50mM AmBic solüsyonu filtrelerin üzerine eklenir ve 14.000g'de 10 dakika santrifuj edilir. 75 μ l tripsin filtrelerin üzerine eklenir ve 1 dakika vortekslenir. Daha sonra filtrelili tüpler parafilm ile sarılır ve 37⁰C'de 4-18 saat arası inkübe edilir. Filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirilir.

40 μ l 50mM AmBic solüsyonu filtrelerin üzerine eklenir ve 14.000g'de 10 dakika santrifuj edilir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanır. 50 μ l FASP kitinin içerisinde bulunan 0.5M NaClSolüsyonu filtrelerin üzerine eklenir ve 14.000g'de 10 dakika santrifuj edilir. Spin filtrelerin alt kısmında triptik peptidleri içeren çözeltinin tamamı alınarak temiz ve kuru *LoBind* tüplere konur ve liyofilize edilir. Liyofilizasyon sonrası toz halindeki örnekler 20 μ l 0.1% formik asit çözeltisinde çözünerek *QUBIT* yardımı ile konsantrasyon tayini yapıldı.

5.2.2.5. Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi

200ng olacak şekilde ölçülen triptik peptitler 0.1% Formik asit ile tamamlanarak LC viallere konulur. LC viallerdeki karışımdan 2 μ l yüksek başarımlı sıvı kromatografisine bağlı, elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma ve dört kutup zaman bazlı ölçüm kaynağı içeren kütle spektrometresi sistemine [nanoACQUITY UPLC (nano ultra performance liquid-chromatography)- ESI (Electrospray ionization)- QTOF (quadrupole time of flight)- MS (mass spectrometry), Waters, Amerika Birleşik Devletleri] gönderildi. Kolonlar 97% hareketli faz A (LC-MS dereceli su içerisinde 0.1% formik asit) dengelenir ve kolonun sıcaklığı 55⁰C de olmalıdır. Peptitler *trap* kolondan (Simetri C18, 5 μ m , 180 μ m i.d. \times 259 mm) (Waters, Milford, MA) 120 dakikada 300 nl/dk akış hızı ile %5'den %40'a dereceli hareketli faz B (ekstra saflıkta ACN içerisinde 0.1 formik asit) kullanılarak dereceli elüsyon

sayesinde analitik kolona (BEH C18, 1.7 μm , 75 μm i.d. \times 250 mm) (Waters, Milford, MA) girer. Tüm örnekler çifte enjeksiyon olarak analiz edildi. Veri bağımsız edinim yöntemi (*data independent acquisition mode MS^E*), pozitif iyon V modu, MS ve MS/MS fonksiyonları (1.5 saniye aralıklar ile 6V 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) 300 nl/dk hız oranı ile enjekte edildi. *m/z* değeri 50-1950 olarak analiz edildi.

5.2.3. Biyoinformatik Analiz

5.2.3.1 *Progenesis QI for Proteomics* ile proteinlerin belirlenmesi ve kantifiye edilmesi:

Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics), LC-MS datasının yüksek kalitede sekanslanma baz alınarak uygulanan etiketsiz analiz yöntemidir. Bütün peptid iyonlarının belirlenmesi ve kantifikasyonu ekspresyon analizi ardından yapılır ve proteinlerinin nereden kökenlendikleri belirlenir. *Progenesis QI for Proteomics* LC-MS v2.0., veritabanı araştırması ve LC-MS/MS analizleri sonucunda çıkan kalitatif protein belirlenmesi ile peptid iyon ölçümlerini birleştirerek kantifikasyonu tamamlanır. İşlenmemiş veriler programa aktarıldıktan sonra referans olarak biri seçilir ve fare veri tabanı kullanılarak seçilen 5 adet modifikasyon ile (*Carbamidomethyl-cysteine modifikasyon, Acetyl N-TERM, Deamidation N, Deamidation Q ve Methionine Oxidation modifikasyonları*), 400 kDa'dan küçük, 1 peptid için 3 tane fragman, 1 protein 7 tane fragmandan ve 1 protein 3 tane peptiden tanımlanmaktadır. Örnekler arasındaki normalizasyon toplam iyon yoğunlu baz alınarak hesaplanır. Aynı proteinler gruplanır ve en yüksek skora sahip bir örnek için kantitatif değerler en yüksek skora sahip bir örnek için verilir.

5.2.3.2. Ingenuity Pathway Analysis (IPA):

Progenesis QI for Proteomics yazılımı ile etiketsiz olarak tanımlanan proteinler IPA yazılımı kullanılarak yolak analizi yapılır. IPA ile yolak analizi yapılırken *Progenesis QI for Proteomics* yazılımı ile elde ettiğimiz proteinlerin *uniprot* numaraları, p değerleri, ekspresyon değişim oranları girilir. Fare organizması seçilir ve veri kaynağı olarak sinir sistemi belirlenir ve analiz yapılır. Bu analiz sonucunda *Progenesis QI for Proteomics* analizi sonucu elde ettiğimiz proteinlerin IPA yazılımı ile hangi yollar ile ilişkili olduğu, hangi hastalıklar ile ilişkili olduğu, azalan ve artan proteinler, bu proteinlerin ilişkili olduğu moleküler fonksiyonlar belirlenir.

5.2.4. İmmunohistokimyal Analiz

Üç ve altı aylık 5XFAD ve LM farelerin beyinleri çıkarılıp, kuru-buz üzerinde donduruldu. Cryostat ile hipokampus bölgesini içeren 18µm'lik koronel kesitler; 40°C'ye ısıtılmış lamlar üzerine alındı ve lamlar yine aynı ısı -bloğu üzerine koyularak dokular sabitlendi. Alınan kesitler -80°C'de saklandı.

Dokular deneye başlamadan yaklaşık 30 dk önce -80°C'den çıkarılıp, oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Tüm yıkama ve inkübasyon işlemleri *shaker* üzerinde yapıldı. Kesitler ilk olarak distile su dolu şaleden geçirildi, sonrasında %4 PFA içerisinde 15 dk dokuların sabitlenmesi sağlandı. Dokular tekrar distile su dolu şaleden geçirilip, PBS içeren şalede, 5'er dk olacak şekilde 3 yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında, lamlar dokulara zarar vermeden dikkatli bir şekilde kurulandı ve *pappen* ile çizildi.

Her bir dokunun üzerine kit içerisinde yer alan bloklama solüsyonu damlatıldı ve kapalı nemli kutuda 10 dk oda sıcaklığında ve *shaker* üzerinde inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra, 30µL'şer goatpolyclonal LOX ve goatpolyclonal RAB8B birincil antikor (1:30), %1,5 bloklama solüsyonu içeren PBS içerisinde dokular üzerine konuldu. Her antikor için negative control oluşturuldu, lamda bulunan dokulardan bir tanesi birincil antikor inkübasyonu yapılmadı. Dokular kapalı nemli kutuda gece boyu 4°C'de bekletildi. Birincil antikor inkübasyonundan sonra, beyin dokuları PBS ile *shaker* üzerinde 5dk yıkandı. Ardından, kit içerisinde yer

alanikinci solüsyon dokuların üzerini kaplayacak şekilde eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi . Tekrar PBS ile 5 dk yıkama yapıldı.Kitte bulunan 3.Solüsyon ile 5 dk inkübe edildi.Son kez PBS ile 5dk yıkama yapıldı ve beyin dokuları 30 µL'şer hazırlanan DAB HRP substratı eklenerek ışık mikroskopunda takip edildi.Yeterli zaman tamamlanınca Boyama tamamlanınca soğuk PBS'ten geçirilen lamalar , mounting medium damlatılarak baloncuk oluşturmamaya dikkat edilerek lamel ile kapatıldı ve gece - boyu oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı . Daha sonra konfokal mikroskopta görüntüleme yapılana kadar -80 oC'de saklandı.

5.2.5. Mikroskopik Görüntüleme

DAB HRP kullanılarak boyanmış dokular Zeiss AxioZoom mikroskop ile 20X, 40X, 80X ölçeklerde görüntülendi.

5.2.6. Western Blotting

Western Blot yapmak için *TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions* Kiti kullanıldı.Kite ek olarak %10'luk Amonyum Persulfat (APS) ve *tetramethylethylenediamine* (TEMED) kullanılır.

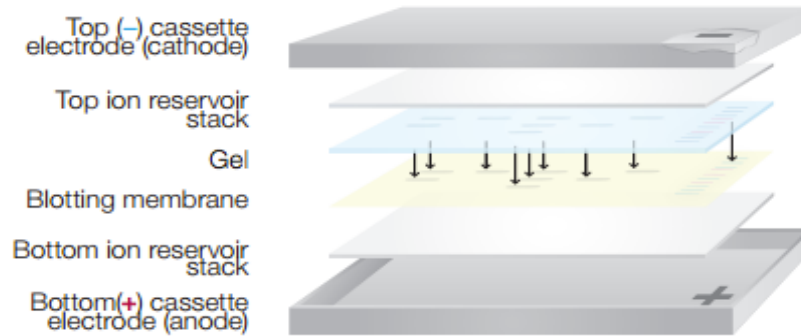
İlk olarak *Resolver* Solüsyonu hazırlanır. Kitin içerisinde bulunan *Resolver A* ve *Resolver B* solüsyonlarından 6 mL falcona konuldu. %10'luk 30 µl APS ve 3 µl TEMED çözeltiye eklenir. İkinci aşama olarak *Stacker* Solüsyonu hazırlanır. Kitin içerisinde bulunan *Stacker A* ve *Stacker B* solüsyonlarından 1 mL falcona konuldu. %10'luk 10 µl APS ve 2 µl TEMED çözeltiye eklenir. 10 kuyucuya sahip 0.75mm'lik cam plaklar ile hazırlanan jel dökme sistemine dökülen jelin tarağı yerleştirilir ve polimerize olması için en az 30 dakika beklenir.

Jel Dökme işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin konsantrasyon tayini yapılır. *Bradford Assay* kullanılarak örneklerin konsantrasyonları belirlenir. *Bradford Assay* için 1 µg/mL *Bovine Serum Albumin (BSA)* kullanılarak 5 adet kalibrant (1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.05 µg/mL) oluşturulur. *5X Bradford Reagent* distile su ile 1X olacak şekilde hazırlanır. *Microplate* kullanılarak ölçüm yapılır. Her bir kuyuya 5 µl kalibratlardan ve örneklerden pipet yardımı ile konur.

Çoklu pipet ile her bir örneğin üzerine 195 μ l 1X *Bradford Reagent* eklenerek. 5 dakika bekletilir. Ve 595nm abzorans değeri ile ölçüm yapılır.

Konsantrasyon ölçümleri tamamlandıktan sonra her bir kuyuya 20 μ g protein konulacak şekilde hesaplama yapılır. Ve örnekler 2X *Laemmli* Tampon çözeltisi (95 μ l 2X *Laemmli* tampon çözeltisi + 5 μ l beta-mercaptoethanol (β – *mercap*)) ile 1:1 oranında karıştırılır. Elektroforez sistemi kurulur. +4⁰C bekletilen 1X *Running* Tampon çözelti sistemin içerisine yeterli miktarda konur. Daha sonra ilk kuyuya moleküler standarttan 10 μ l konur sonrasında sırası ile yükleme örnekleri kuyucuk hacmine göre yüklenir. Boş kalan kuyucuklar hazırlanan *Laemmli* tampon çözelti ile yüklenir. 50V ile 5 dakika olarak başlatılan yürütme işlemi kademeli olarak artırılır. 100V, 1 saat ve sonrasında 150V, 30 dakika olmak üzere.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jelde yer alan proteinlerin *PVDF membrane*'a aktarma işlemi için *Trans-Blot^R TurboTM RTA Mini PVDF Transfer Kit* kullanılarak yapılır. İlk olarak kitin içerisinde bulunan *Transfer Stack* aynı kitin içerisinde bulunan 5X *Transfer* Tampon çözelti içerisinde bekletilir ve *Trans-Blot^R TurboTM* sistemine yerleştirilir üzerine ilk olarak metanol içerisinde sonra 5X *Transfer* Tampon çözelti içerisinde bekletilen *PVDF membrane* yerleştirilir. Onun üzerine jel konur ve tekrar *Transfer Stack* yerleştirilir ve transfer işlemine başlanır. Cihaza 2,5 A 25V'da 7 dakika olacak şekilde transfer gerçekleştirilir.



Resim5.1:Western Blot Transfer sistemi katmanları

Transfer işleminden hemen sonra *PVDF membrane* PBS-t çözeltisinin içerisine alınır ardından %5 yağsız süt (5gr süt tozu 95 mL PBS-t içerisinde) içerisinde oda sıcaklığında sallanarak 1 saat bırakılır. 1 saatin sonunda %5'lik yağsız süt ile

hazırlanan primer antikör [anti-LOX (1:200), anti-RAS (1:200)] içerisinde +4°C'de gece boyunca sallanarak bırakılır. Primer Antikör 3 kere 5'er dakika olmak üzere PBS-t ile yıkanır. Ardından primer antikora uygun şekilmiş önerilen dilüsyonda hazırlanan HRP konjuge ikincil antikör (1:2000) koyularak 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bırakılır. Ardından tekrar 3 kere 5'er dakika olmak üzere PBS-t ile yıkanır ve *Clarity Western ECL Blotting* Kiti kullanılarak görüntülemeye uygun hale getirilir. BioRAD, ChemiDoc sistemi ile görüntüleme yapılır.

Yürütme kontrolü olarak beta aktin için *Strip* Solüsyonu (%10'luk SDS, 0.5 M Tris/HCl, 0.8 mL β – mercap, ph: 6.8) hazırlanır. Etüv ve hazırlanan *Strip* Solüsyonu 55°C olmalıdır. *PVDF membrane* hazırlanan solüsyonun içerisinde 30 dakika 55°C olan etüvde bekletilir. 15. Dakikada *PVDF membrane* çalkalanır ve sonrasında 6 kez 5'er dakika PBS-t ile yıkama işlemi yapılır ve yukarıda bahsedilen *Blocking* işlemi ile birlikte süregelen tüm işlemler tekrarlanır.

Görüntülenen bantlar, ImageJ yazılımı kullanılarak ve yürütme kontrol (beta aktin) bantlarına göre normalize edilerek tek kuruklu *Student-t* test istatistiksel testi kullanılarak analiz yapıldı.

5.2.7. Morris Su Tankı Davranış Testi

Deneyler için 93 cm çapı ve 42 cm yüksekliği olan Morris Su Labirenti kullanıldı. Fareler testin başlangıç günü yüzme alıştırmaları için platformsuz tank içinde 120 saniye yüzdürüldü. Takiben ilk 4 gün Öğrenme Fazı deneyleri ve 5. gün Hafıza Fazı deneyleri yapıldı.

Morris Su Labirenti dört kadrana bölündü. Öğrenme fazında, kadranslardan birine suyun 1 cm altında kalacak şekilde yüzey alanı 10 cm² olan bir platform kondu. Farelerin platformu görmesi engellendi. Bu fazda, fareler her bir kadrandan 20 dakika ara ile bırakılarak her defasında 120 saniye boyunca yüzdürüldüler. Farelerin 120 saniye içinde odanın duvarında bulundurduğumuz işaretlerden hiza almak suretiyle yüzerek gizli platformu bulması beklendi. Platformu bulan fareler 30 saniye platform üzerinde bekletildi. 120 saniye içinde platformu bulamayan fare araştırmacı tarafından sudan alınıp platform üzerine bırakıldı ve 30 saniye boyunca etrafı gözlemesi beklendi.

Hafıza fazında ise farelerin boşluksal bellek fonksiyonları incelendi. Suyun altına gizlenen platform kaldırıldı ve fareler daha önce platformun bulunduğu kadranın karşısındaki kadrandan suya bırakılarak 60 saniye yüzdürüldü. Hafıza fazında platform alanında geçirilen süre, hedef kadrana girme sıklığı ve toplam yüzülen mesafe ölçüldü.

Farelerin su tankındaki davranışları kamera ile bilgisayara aktarıldı ve veriler EthoVision yazılımı ile değerlendirildi. Kontrol ve 5xFAD fareler arasındaki istatistiki karşılaştırmalar Student t testi ile yapıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiki anlamlılık olarak değerlendirildi.



6. BULGULAR

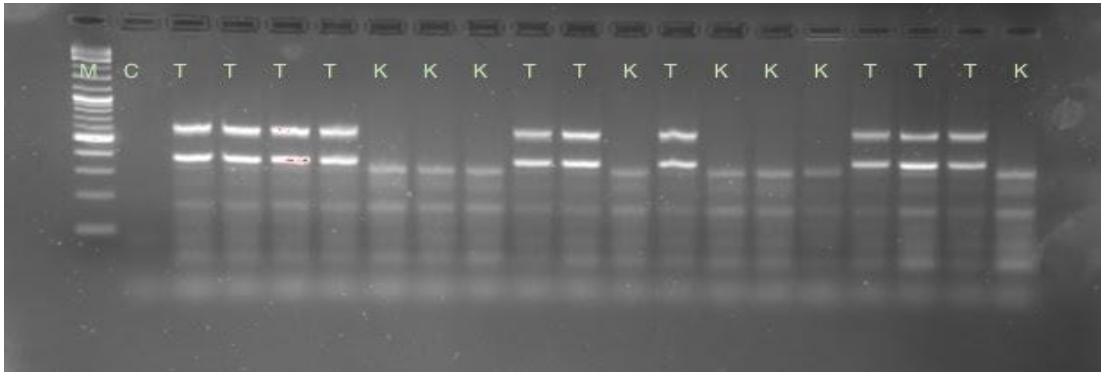
6.1. Deney gruplarının oluşturulması

Tüm deneysel çalışmalar için transgenik fare modeli ve onların aynı batından doğan transgenik olmayan kontrol grubu olarak kullanıldı (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: Deneysel çalışmalarda kullanılan hasta ve kontrol grupları

	3 Aylık		6 Aylık	
	5xFAD	LM	5xFAD	LM
Doku	Hipokampus	Hipokampus	Hipokampus	Hipokampus
AH Mutasyonları	2 PSEN1 3APP	---	2 PSEN1 3APP	---
Örnek Sayısı	5	5	5	5
Cinsiyet	Dişi	Dişi	Dişi	Dişi

Üç ve altı aylık deney grupları yapılan method kısmında açıklandığı gibi genotipleme yapılarak her bir grup 5 fareden oluşacak şekilde 2 farklı yaş grubunda hasta ve kontrol olmak üzere 4 grup oluşturuldu (Şekil 6.1).

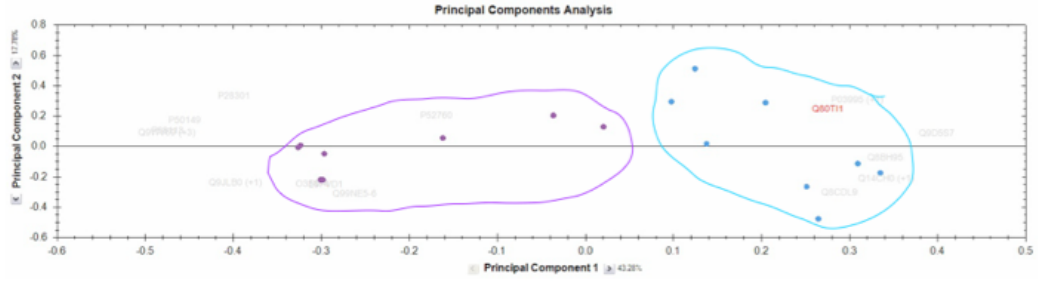


Şekil6.1: Genotipleme sonucu agaroz jel görüntüsü. T: Transgenik fare, K: Kontrol grubu, M:Marker, C: pozitif kontrol

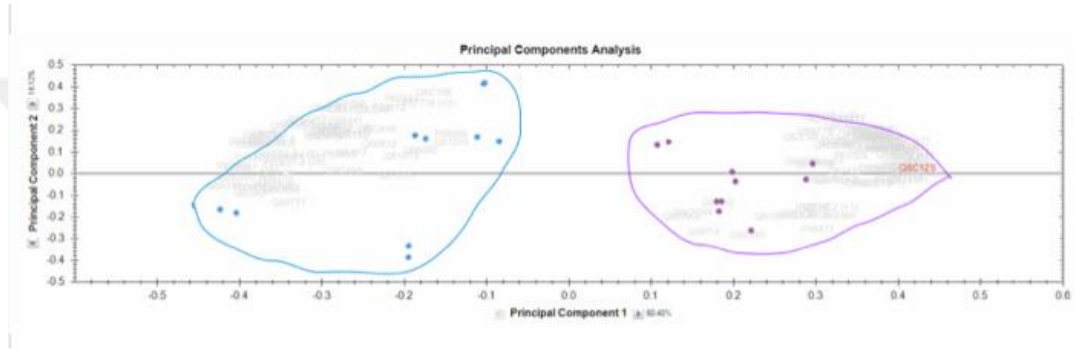
6.1 Proteomik Çalışmalar:

LC-MS/MS analizi ile hasta ve kontrol gruplarının hipokampus bölgelerinde bulunan peptitlerin m/z (kütle/yük) değerleri belirlendi. Daha sonra analiz sonucu elde edilen bu veriler Progenesis QI programı ile tanımlamaları yapıldı. Yapılan bu analiz sonucu fare veri tabanı kullanılarak üç aylık deney grubunda hipokampus bölgesinde 1540, altı aylık deney grubu hipokampus bölgesinde ise 1513 protein tanımlandı. PCA grafikleri, üç ve altı aylık deney grupları için kendi içlerinde hasta ve kontrol gruplarının proteomlarının farklı olduğunu gösterdi (Şekil 6.2). Deney grupları ile birlikte aynı anda analiz edilen QC analizleri sonucu cihazın hata payının %10 olduğu belirlendi. Transgenik ve kontrol grupları arasında 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 üç aylık deney grubu için 15 iken altı aylık deney grubu için 122 olarak tanımlandı. Üç ve altı aylık farklı deney gruplarında tanımlanan bu proteinlerden farklı yönde ekspresyon gösteren yalnızca bir tane ortak protein (RIMS1) belirlendi. Üç aylık deney grubunda tanımlanan proteinlerin 6 tanesinin ekspresyonu transgenik fare hipokampusünde arttığı, 9 tanesinin azaldığı belirlenmiştir (Tablo 6.2). Altı aylık transgenik fare hipokampusünde kontrol grubuna göre 72 proteinin ekspresyonu azalırken 50 proteinin ekspresyonunda artış olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 6.3).

A. 3 aylık deney grubu



B. 6 aylık deney grubu



Şekil 6.2: (A) 3 aylık deney grubu hipokampus bölgesi. (B) 6 aylık deney grubu hipokampus bölgesi.

Tablo 6.2: 3 aylık deney grubu hipokampusünde başlıca değişen Proteinler listesi

Uniprot Numarası	Protein	Ortalama Değişim Oranı (5xFAD/WT)	p-değeri
Artan Proteinler			
Q80T11	Pleckstrin homology domain containing family H member 1	1,710	0,003
Azalan Proteinler			
O35874	Neutral amino acid transporter A	2,226	0,021
P28301	Protein-lysine 6-oxidase	1,928	0,009
P50149	Guanine nucleotide-binding protein G(t) Subunit alpha 2	1,878	0,012

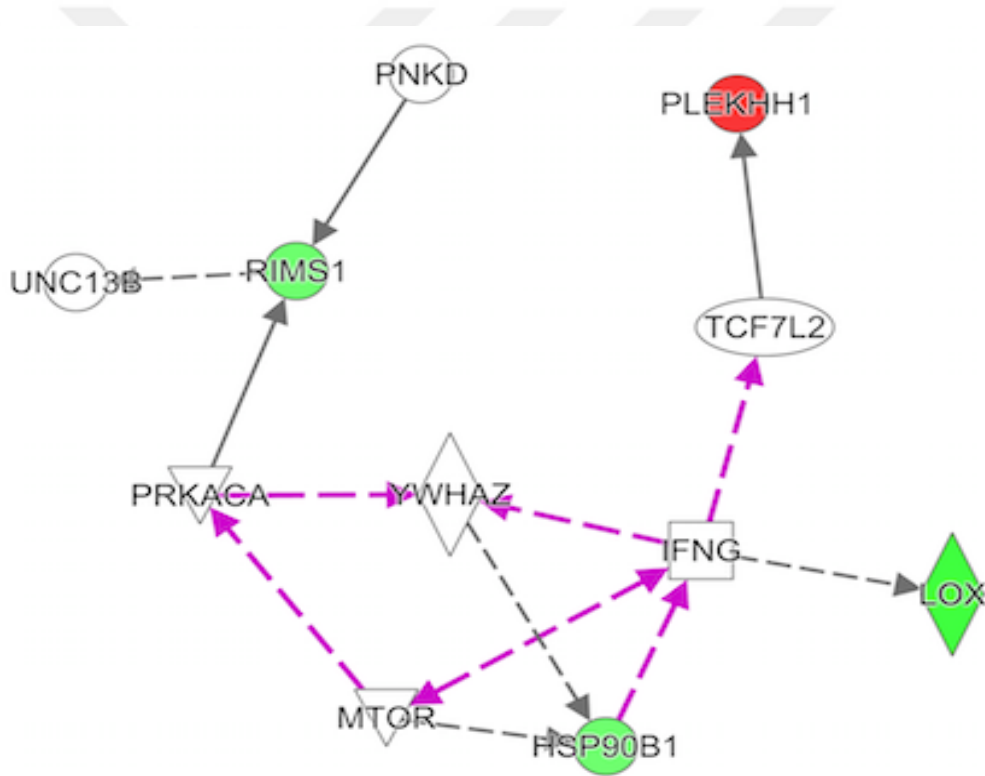
Tablo 6.3: 6 aylık deney grubu hipokampusünde başlıca değişen Proteinler listesi

Uniprot Numarası	Protein	Ortalama Değişim Oranı (5xFAD/WT)	p-değeri
Artan Proteinler			
Q8BYR5-6	Isoform 6 of Calcium-dependent secretion activator 2	4,901	3,02E-06
A2RT62	F-box/LRR-repeat protein 16	3,582	0,003
P98086	Complement C1Q subcomponent subunit A	3,196	0,022
Q9JIK5	Nuclear RNA helicase 2	3,189	4,81E-05
Q8CGK3	Lon protease homolog, mitochondrial	2,664	2,94E-05
P10637-4	Isoform Tau-C of microtubule-associated protein tau	2,251	0,001
P62843	40S ribosomal protein S15	2,100	0,013
Q80VP2	Spermatogenesis-associated protein 7 homolog	2,074	0,0008
O35593	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	1,908	4,91E-07
Q9D5V5	Cullin-5	1,780	2,76E-05
Azalan Proteinler			
P35279	Ras-related protein Rab-6A	4,362	0,0004
Q69ZT9	TBC1 domain family member 30	3,621	0,002
Q8C1Z8	tRNA methyltransferase 10 homolog A	3,201	2,67E-09
O35075	Down syndrome critical region protein 3 homolog	2,823	0,003
Q3UMC0	Spermatogenesis-associated protein 5	2,685	0,0004
O70585-2	Isoform 2 of Dystrobrevin beta	2,545	0,0001
Q80Y83-2	Isoform 2 of Dixin	2,527	0,0002
P40201	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	2,470	0,0003
Q9D8B3	Charged multivesicular body 4b	2,386	4,60E-06
Q99LD8	N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	2,035	6,83E-06

6.2. IPA Yolak Analizi

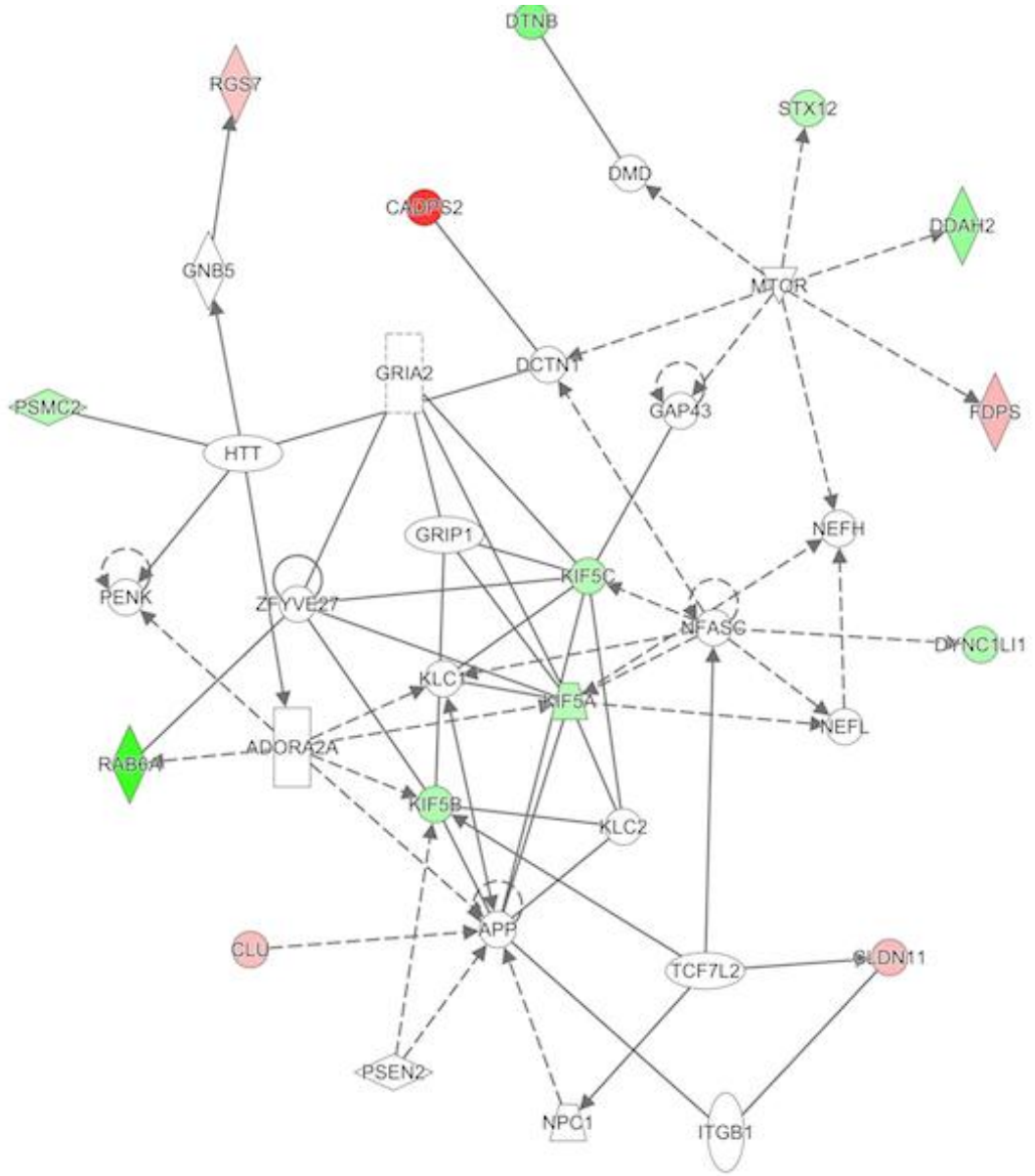
Farklı yaş gruplarında (3 ve 6 aylık deney grupları) hipokampus bölgesinde değişen proteinlerin IPA programı ile yolak analizleri yapıldı. IPA programında elde edilen veriler bize ekspresyonun hangi proteinler tarafından düzenlendiği (*upstream regulators*) (Tablo4, Tablo 6.5), moleküler ve hücresel fonksiyonlar ile ilişkisi, proteinlerin hastalıklar ile ilişkisi, ilişkili olduğu yollar hakkında bilgi edildi (Tablo 6.3). En ön plana çıkan fonksiyonel ağlar belirlendi (Şekil6.2, Şekil 6.3)

A.



Şekil 6.3 : IPA analizi sonucu en ön plana çıkan ağlar. 3 aylık hipokampuste değişen proteinler.

B



Şekil 6.4 : IPA analizi sonucu en ön plana çıkan ağlar. 6 aylık hipokampuste değişen proteinler

Tablo 6.4: 3 aylık 5xFAD hipokampusünde bulunan *Upstream regulators*

Upstream Regulators	Molekül Tipi	p-değeri	Hedef Moleküller
PKND		1,15E-03	RIMS1
YWHAZ	Enzim	2,86E-03	HSP90B1
MTOR	Kinaz	3,61E-02	HSP90B1

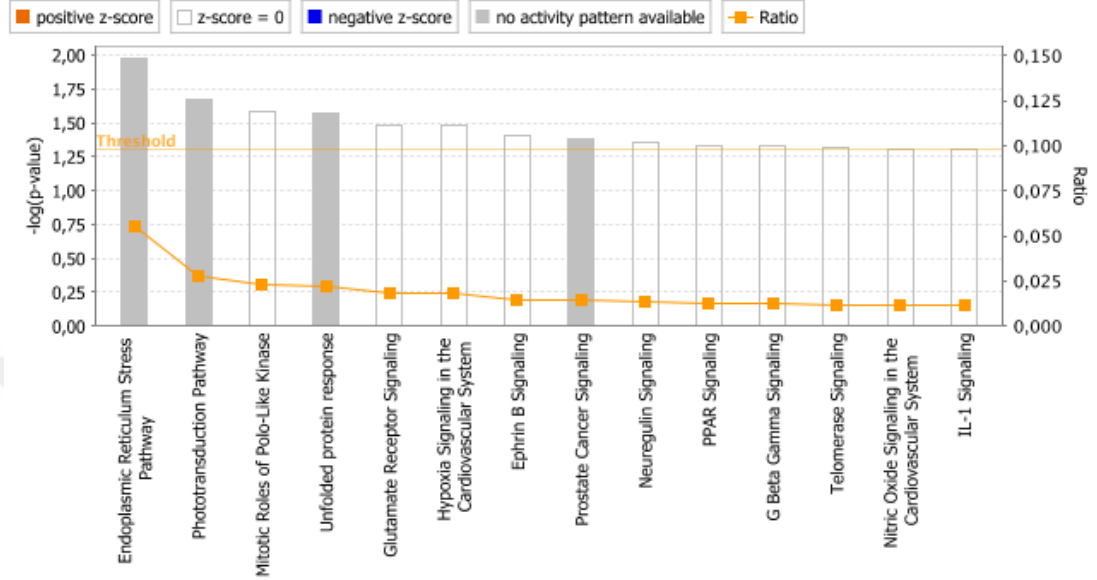
Tablo 6.5 : 6 aylık 5xFAD hipokampusünde bulunan *Upstream regulators*

Upstream Regulator	Molekül Tipi	p-değeri	Hedef Moleküller
NFASC		1,92E-04	DYNC1LI1, KIF5A, KIF5C
NEUR0D6	Transkripsiyon Düzenleyici	6,80E-03	CNTN2
NAGLU	Enzim	6,80E-03	MAPT
MTOR	Kinaz	9,38E-03	DDAH2, FDPS, STX12
GNB5	Enzim	1,36E-02	RGS7
Dst		1,36E-02	MAPT
ADORA2A	G-protein çifti receptörü	1,89E-02	KIF5A, KIF5B, RAB6A
SIRT1	Transkripsiyon Düzenleyici	2,74E-02	KIF5C, MAPT
NEUR0D2	Transkripsiyon Düzenleyici	3,35E-02	CNTN2
PSEN2	Peptidaz	3,75E-02	C1QA, KIF5B
KISS1R	G-protein çifti receptörü	4,67E-02	DDX3Y

IPA analizi sonucu ön plana çıkan yollar belirlendi (Şekil6.4). 3 aylık verilere göre en çok endoplasmik retikulum stres yolağı ile ilişkili proteinlerde değişim gözlenirken 6 aylık verilerin sonucunda Nöronlardaki Reelin Sinyal yolağı ön plana çıkmıştır.

A. 3 aylık deney grubu

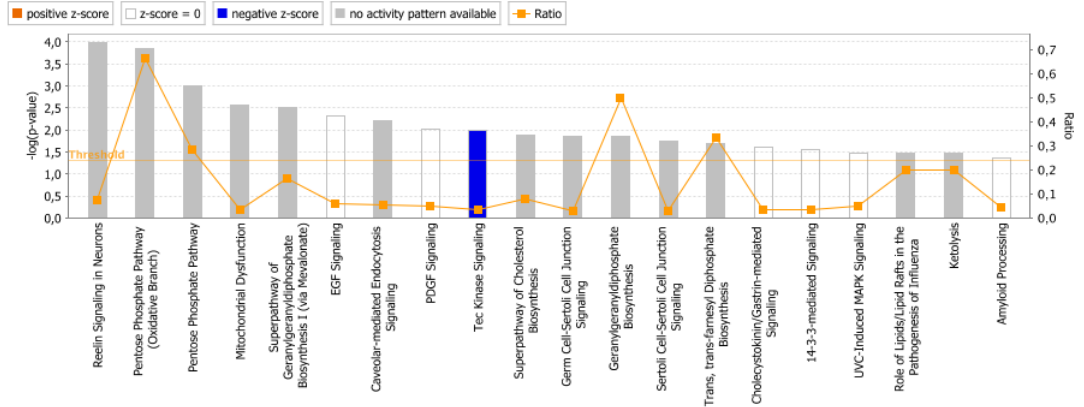
Analysis: AysegulArzuman_3m_hippo.csv – 2016-03-25 09:20 AM



© 2000–2016 QIAGEN. All rights reserved.

B. 6 aylık deney grubu

Analysis: AysegulArzuman_6m_hippo.csv – 2016-03-25 09:24 AM



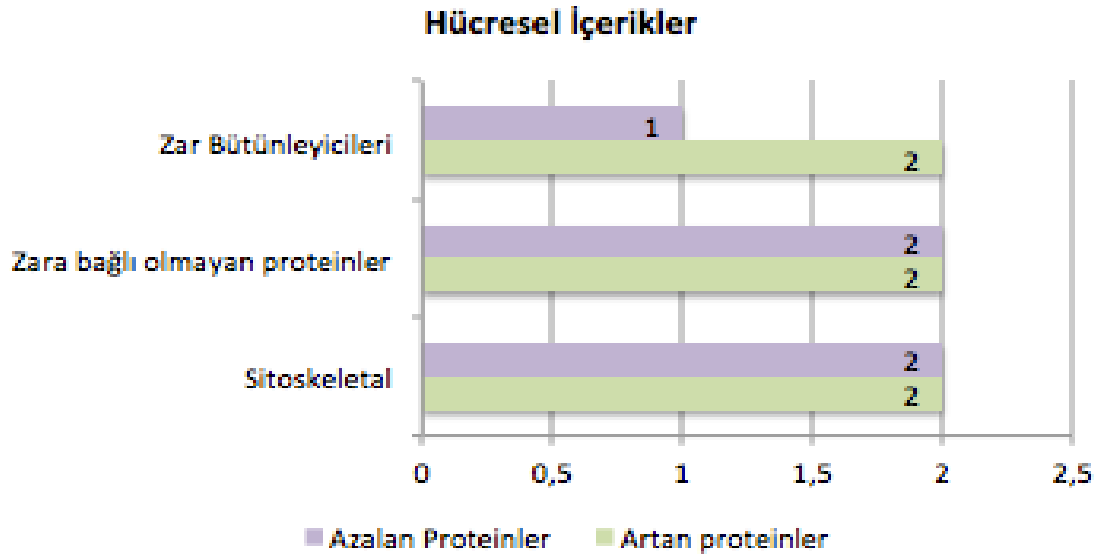
© 2000–2016 QIAGEN. All rights reserved.

Şekil 6.5: IPA analizi sonucu ön plana çıkan yollar. (A) 3 aylık hipokampus ile ilişkili yollar. (B) 6 aylık hipokampus ile ilişkili yollar.

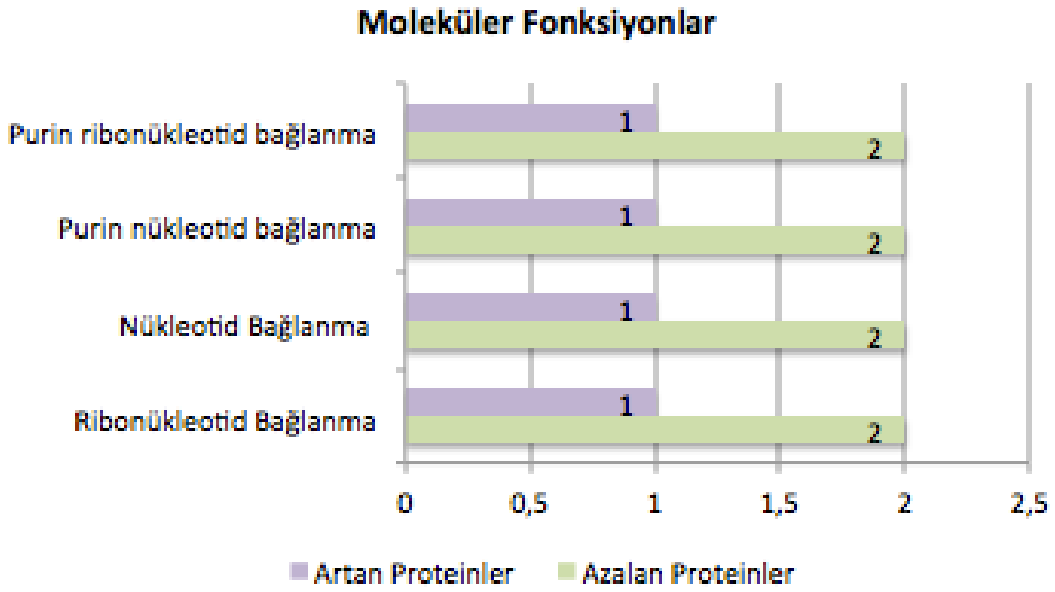
6.3. DAVID

DAVID programı kullanılarak 3 ve 6 aylık 5xFAD ve onların aynı yaş ve cinsiyete ait kontrollerinin hipokampusunda değişen proteinleri fonksiyonlarına göre kategorize edildi. Bu kategoriler şu şekilde oluşturuldu; biyolojik süreçler, hücresel içerikleri ve moleküler fonksiyonlarıdır. 3 aylık hipokampus verilerine göre tanımlanan proteinler 15 protein moleküler fonksiyonlarına ve hücresel içeriklerine göre kategorize edildi (Şekil6.5).aylıkhipokampusünde tanımlana 122 proteinde fonksiyonlarına göre kategorize edildi (Şekil 6.6). Biyolojik işleyişlerine göre en çok değişim mikrotübülüs tabanlı hareketler ile ilişkili proteinler gözlemlenirken, hücresel içeriklerine göre sitoskeletal ile ilgili proteinlerde en çok değişim olduğu belirlendi. Nükleotid bağlanma ile ilişkili proteinler hem 3 hem 6 aylık hipokampuslerde en çok değişim gösteren protein gruplarını oluşturmaktadır.

A.

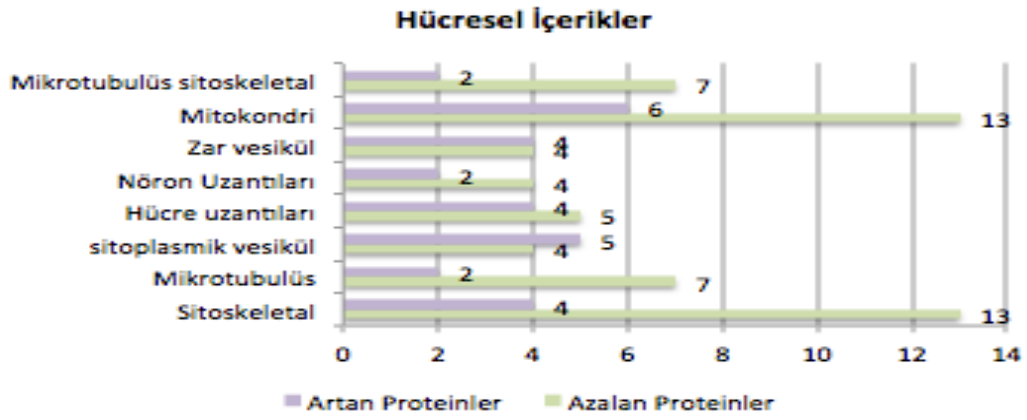


B.

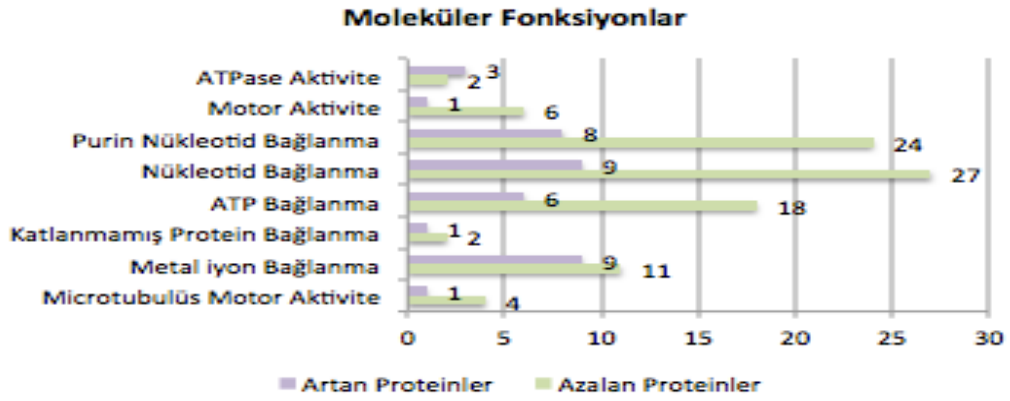


Şekil 6.6: DAVID fonksiyonel gen ontoloji kullanılarak 3 aylık 5xFAD hipokampusünde değişmiş proteinlerin analizi (A) Hücresel içerikler. (B) Moleküler Fonksiyonlar

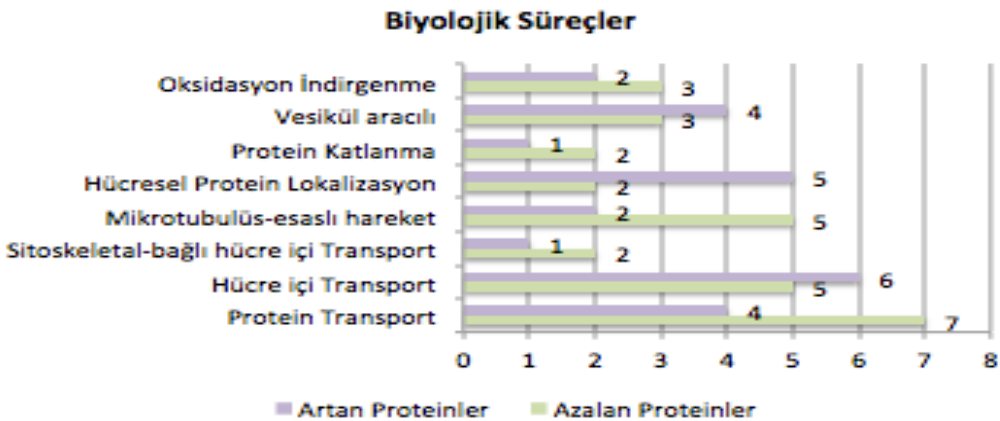
A.



B.



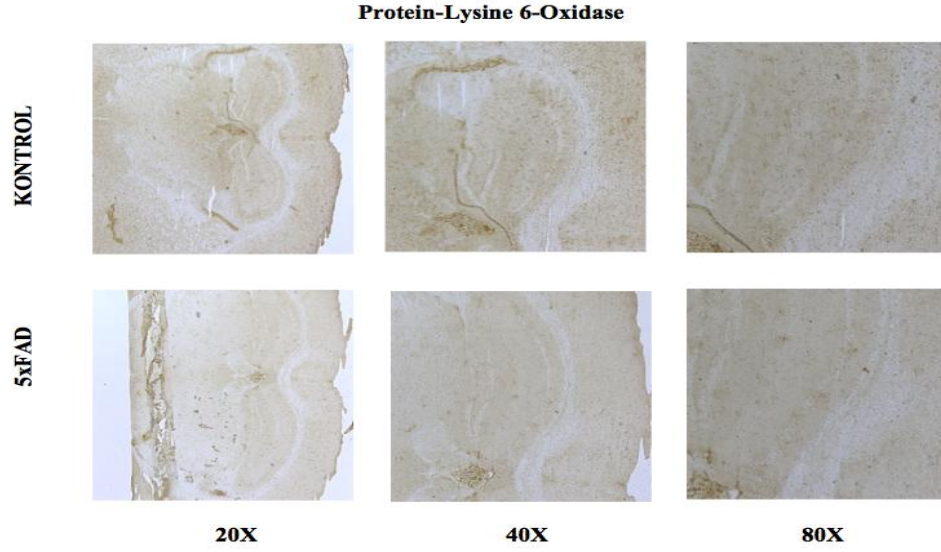
C.



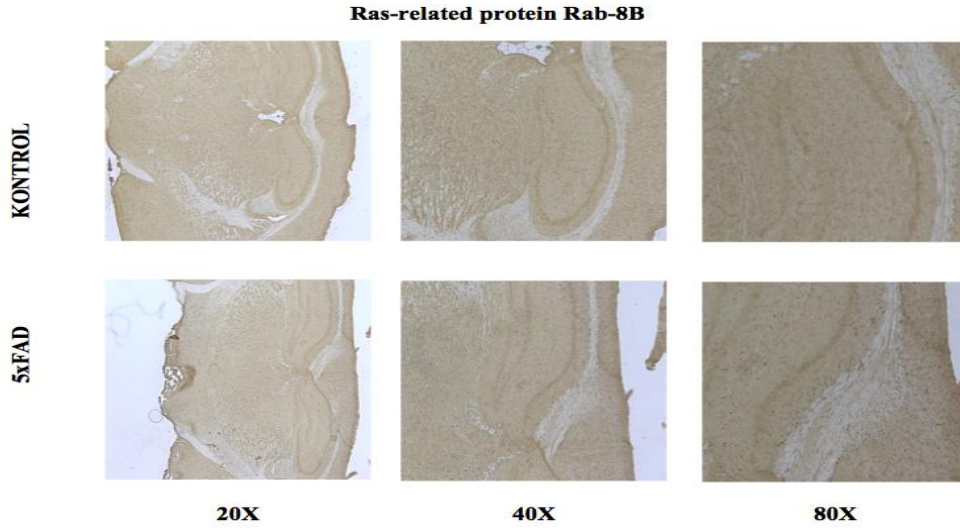
Şekil 6.7:Şekil: DAVID fonksiyonel gen ontoloji kullanılarak 6 aylık 5xFAD hipokampusünde değişmiş proteinlerin analizi (A) Hüresel içerikler. (B) Moleküler Fonksiyonlar. (C) Biyolojik İşlevler

6.4. İmmunohistokimyasal Analiz

3 ve 6 aylık hipokampus beyin dokusu alınan 5xFAD transgenik fareler ve onların kontrolleri immunohistokimyasal yöntem ile boyanıp, 3 aylık dokuda LOX protein ekspresyon değişimi (Resim6.2) ve 6 aylık dokuda RAB8B protein ekspresyon değişimi gözlemlendi (Resim 6.3).



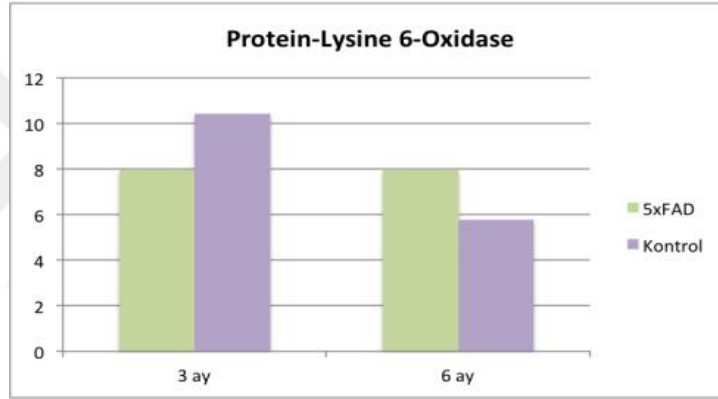
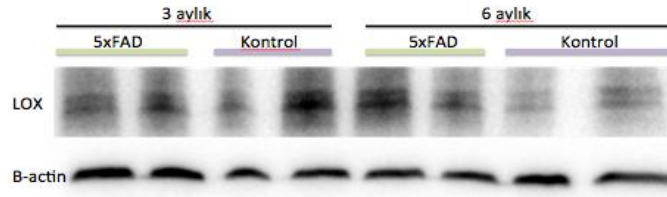
Resim 6.1: 3 aylık 5xFAD ve kontrol grubundaki protein-lysine 6-oxidase (LOX) immunohistokimya yöntemi ile belirlenmesi.



Resim 6.2: 6 aylık 5xFAD ve kontrol grubundaki ras-related protein Rab8B (RAB8B) immunohistokimya yöntemi ile belirlenmesi.

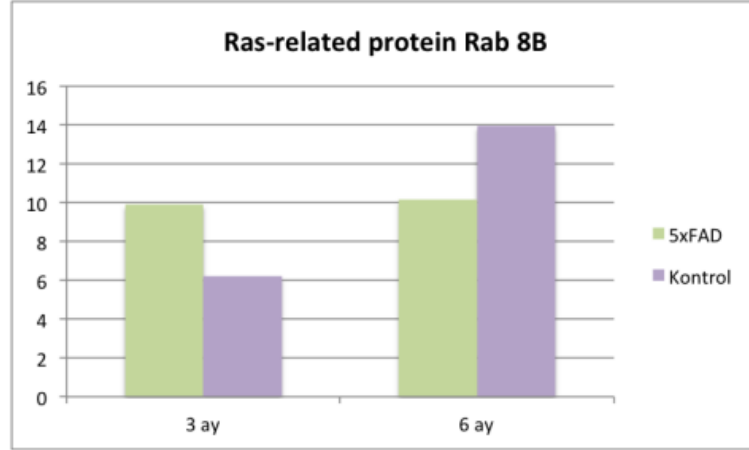
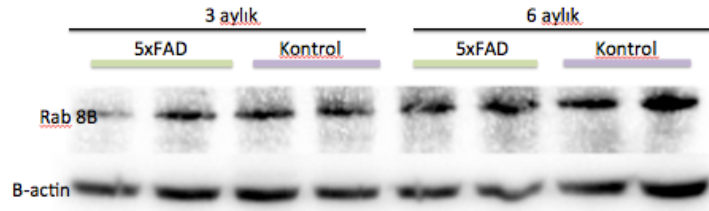
6.5. Western Blot Analiz

3 aylık 5xFAD transgenik fareler ve onların yaş ve cinsiyetçe eşleniği olan kontrol farelerden alınan hipokampus dokusunda protein-lysine 6-oxidase (LOX) proteinin yapılan proteomik analizleri sonucu ile benzerliğini kontrol etmek için western blot yöntemi kullanıldı. Western Blot sonucuna göre kontrol grubunda 5xFAD farelere göre daha fazla miktarda LOX görüldü (Şekil6.7).



Şekil6.8: LOX Western blot görüntüsü ve analizi (p < 0.05)

Elde ettiğimiz LC-MS/MS sonuçlarına göre ras-related protein Rab 8B 6 aylık 5xFAD transgenik fare modeli hipokampusünde kontrol grubu farelere oranlan azaldığı gözlemlendi. LC-MS/MS sonucunu doğrulamak için western blot yöntemi kullanılarak farelerden alınan hipokampus dokularında ras-related protein Rab 8B proteinine bakıldı. 6 aylık 5xFAD farelerde kontrol grubuna göre Rab 8B proteininde azalma görüldü(Şekil 6.8).



Şekil 6.9: Rab 8B Western blot görüntüsünü ve analizi ($p < 0.05$)

6.6. Morris Su Tankı

Üç ve altı aylık fareler için yapılan davranışsal test sonucu. Öğrenme fazındaki sonuçlar kontrol grubu hayvanlarının ilk gün platformu 5xFAD transgenik farelere göre daha hızlı bulduğu fakat daha sonrasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Hafıza fazı sonuçlarına göre ise platform alanında geçirilen süre, hedef kadrana gitme sıklığı ve toplam yüzme mesafesi gibi incelenen tüm parametreler kontrol grubunda 5xFAD transgenik fare grubuna göre daha fazla iken istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi. Sonuçlara göre 3 ve 6 aylık farelerde kognitif bozukluğun daha tam olarak ortaya çıkmadığı gözlemlenmiştir.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

AH en yaygın görülen demanstır. Bilişsel bozuklukların ve yaşa bağlı dejeneratif patolojilerin oluşmasındaki en büyük risk faktörünü beynin yaşlanması oluştururLace et al. (31). Yaşa bağlı olarak patolojik değişimlerden en çok etkilenen bölgelerden biri hipokampus bölgesidirValle et al. (32). Bu tez çalışması kapsamında; yaş ile birlikte beynin hipokampus bölgesindeki protein profil değişimleri 5xFAD fare modeli kullanılarak incelenmiştir. 3 ve 6 aylık 5xFAD transgenik fare modeli ve onların cinsiyet ve yaşça eş olan kontrol grupları oluşturulmuş ve ileri teknoloji proteomik cihazları kullanılarak gruplar arasındaki protein ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir. Daha sonrasında uygulanan biyoinformatik yazılımlar ile değişim görünen proteinlerin yollar ile ilişkisi, hangi proteinler tarafından düzenlendiği (*upstream regulators*), moleküler ve hücresel fonksiyonları belirlenmiştir. Yapılan *Principle Component Analysis* sonucu hasta ve kontrol grubunun hipokampus bölgesinde değişim gösteren proteinler birbirinden ayrıldığı açıkça gözlenmiştir. 3 aylık 5xFAD hipokampus bölgesinde 15, 6 aylık 5xFADhipokampus dokusunda 122 adet istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen ($p < 0.05$, max fold change > 1.4) proteinler tanımlanmıştır. Tanımlanan bu proteinlerin çoğunluğunun kontrol grubuna göre azalan yönde bir protein ekspresyon değişimi olduğu saptanmıştır. NanoLC-MS/MS kullanılarak işaretleme yapılmadan tanımlanan bu proteinlerin validasyonu için immünohistokimya tekniği ve western blot yöntemi kullanılarak 3 aylık verilerde görülen en fazla oranda azalan proteinlerden biri olan Protein-Lysine 6-oxidase (LOX) proteinine bakıldı ve ekspresyonunun 3 aylık 5xFAD hipokampusünde kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Aynı şekilde ras-related protein RAB8B proteini 6 aylık hipokampus verilerinden seçilerek bakıldı. Ve RAB8B proteininde kütle spektrometresi sonuçları ile paralellik göstererek 6 aylık 5xFAD hipokampus dokusunda azaldığı belirlendi.

3 aylık 5xFAD ve onların kontrollerinin hipokampus bölgesinde 15 proteinin tanımlanmış bu proteinlerin büyük bir kısmı kontrol grubuna göre 5xFAD transgenik farelerde azalmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu bu zaman dilimi için 3 tane *upstream regulators*(YWHAZ, MTOR ve PKND) belirlenmiştir. Enzim olan

YWHAZ ve kinaz olan MTOR'un hedef molekülü heat shock protein 90 beta-1 (HSP90B1)'dir. HSP90B1 protein katlanmamış proteinler ve hücre canlılığı ile ilişkilendirilmiş olup endoplasmik retikulum stres yolağında yer almaktadır (Rutkowski et al. (33), Schroder (34)). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre, HSP90B1 proteini 1,441 kat azalmış olarak görüldü ve AH'nın erken döneminde bu proteinin sebep olduğu endoplasmik retikulum stres yolağının etkilendiği belirlendi yapılan IPA biyoinformatik analiz sonucunda. Elde ettiğimiz bu verilerden yola çıkarak erken dönemde YWHAZ tarafından regüle edilen HSP90B1 proteininin ekspresyonunun azalması ile endoplasmik retikulum stres yolağında ki bozukluğun daha sonraki dönemlerde protein taşıma mekanizmasında bozukluğa sebep olabileceği düşünülmüştür.

6 aylık hipokampus verileri değerlendirildiğinde upstream regülatör olan Neurofascin (NFASC) proteinin düzenlediği cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1 (DYN1LC1), kinesin heavy chain isoform 5A (KIF5A) ve kinesin heavy chain isoform 5C (KIF5C) proteinleridir. DYN1LC1, KIF5A ve KIF5C proteinleri iki büyük motor protein ailesine ait proteinlerdir (Dynein ve kinesin) ve 6 aylık 5xFAD hipokampusünde kontrole göre azaldığı gözlemlenmiştir. Bu üç protein aksonal taşıma mekanizması ile ilişkilidir. Motor proteinler ile düzenlenen aksonal transport mekanizması, yerel protein homeostasisini destekler (Bingol et al. (35), Stokin et al. (36)). Bizim elde ettiğimiz proteomik analizlerine göre, NFASC tarafından regüle edilerek ekspresyonu azalan DYN1LC1, KIF5A ve KIF5C proteinleri mikrotübülüs tabanlı hareket mekanizmasında bozukluğa sebebiyet oluşturabileceği düşünülmektedir. Yapılan biyoinformatik analizler bu düşüncüyü desteklemektedir. Bu proteinlerin aksonal taşıma mekanizmasında bozukluğa sebebiyet oluşturabileceği bunun içinde hücresel protein lokalizasyonunun etkilenebileceği düşünülmektedir. 6 aylık hipokampus dokusunda değişim gösteren proteinleri etkileyen göze çarpan diğer upstream regülatörlerde, ADORA2A, NAGLU ve SIRT1, mikrotübülüs tabanlı hareketi etkileyen proteinleri düzenlerler. Özetle, 6 aylık 5xFAD hipokampus dokusunda değişim gösteren proteinler sınıflandırıldığında mikrotübülüs tabanlı hareket ile ilişkili proteinler ve onları düzenleyen regülatörler tanımlanan proteinlerin büyük bir çoğunluğunu

oluşturmaktadır. 6 aylık 5xFAD hipokampus dokusu hücresel işleyişlerine göre incelendiğinde de tanımlanan proteinlerin büyük bir çoğunluğu sitoskeletal ve mitokondri ile ilişkilendirilmiş proteinler olduğu belirlendi. AH patolojisinin altında yatan en kritik sebepleri mitokondrial Disfonksiyon bozuklukları ve oksidatif stres oluşturmaktadırChakrabarti et al. (37), Leuner et al. (38). Alzheimer hastalığında cytochrome c oxidase (COX) proteinin yetersizliği mitokondrial elektron taşıma enzimlerinde önemli bir bozukluğa sebep olduğu AH plaklarında ve post-mortem beyin örneklerinde yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştırCardoso et al. (39), Kish et al. (40). İmmünohistokimya analizleri sonucu AHlarında COX aktiviteleri azaldığı ortaya çıkmıştırLeuner et al. (38). Bunlara ek olarak, COX aktivitesinin azalması ile bilişsel bozukluk arasında ilişki olduğu belirtilmiştirAgin et al. (41), Berndt et al. (42). Bizim sonuçlarımıza göre, 6 aylık 5xFAD transgenik fare modeli hipokampusünde mitokondrial disfonksiyon ve COX5B proteininin ekspresyonunda kontrole göre önemli oranda azalma olduğu saptanmıştır. AH'nın gelişimindeki önemli olaylardan biride oksidatif streştirShen et al. (43). Eğer homeostazisi bozulursa, pro-oksidantalar üretilir ve oksidatif stres meydana gelmeye başlar. Elde ettiğimiz veriler bize gösterdi ki, 6 aylık 5xFAD hipokampus bölgesinde bulunan oksidatif-indirgeme işlevi ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunda bir dengesizlik belirlenmiştir. Fakat, 6 aylık 5xFAD hipokampus dokusunda gördüğümüz oksidatif-indirgenme işlevi ilk olarak 3 aylık 5xFAD hipokampus bölgesinde değişimi görülen HSP90B1 ve Enoly-CoA hydaratase proteinlerinden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Yani, 3 aylık 5xFAD hipokampusündeki değişimler yaş ile birlikte 6. ayda oluşan biyolojik işlevleri etkilediği söylenebilir.

Bu çalışma, yeni ve hızlı bir şekilde gelişen sistem biyolojisi kapsamında yer alan proteomik teknikler kullanılarak yapılmıştır. Proteomik teknikler AH'nin temel mekanizmasını almak, biyomarker keşfetmek, ilaç geliştirmek için kullanılmaktadır. Biz bu çalışmamızda, AH'nin temel mekanizmasını anlamak için farklı iki yaş grubu 5xFAD fare ve onların cinsiyetçe ve yaşça eşitliği olan kontrol fareler kullanılarak protein profil değişimlerini inceledik. Kullandığımız fare modeli erken başlangıç gösteren beş mutasyonlu ailesel AH gösteren transgenik bir modeldir. Bu fare modelinde NFY oluşumu ve yayılımı gözlenmez fakat A-beta plak oluşumu, sinaptik kayıp ve bilişsel bozulma görülmektedir. Bizim 5xFAD transgenik fare modelini bu

çalışmada kullanılmakta olan amacımız erken dönemde yaş ile birlikte değişen protein ekspresyon farklılıkları ve bu farklılıkların yol açtığı moleküler, biyolojik bozukluklar ve etkili olduğu yolları proteomik teknikleri biyoinformatik yazılımlar ile birlikte kullanarak incelemektedir.

Bu çalışmada sunduğumuz veriler AH'da hipokampus bölgesinde yaş ile birlikte değişen protein ekspresyon farklılıklarını göstermek ve bu farklılıkların birbirini etkileyip etkilemediğini araştırarak AH temel mekanizmasını açıklığa kavuşturmayı hedeflemiştir. Elde ettiğimiz veriler iki farklı zaman diliminde de ortak olarak Hipokampus bölgesindeki proteinlerin 5xFAD transgenik fare modelinde kontrole göre çoğunluğunun ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. 3 aylık hipokampus bölgesindeki değişim 6 aylık döneme göre daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fakat, az değişim görülen erken dönemin daha ileri ki dönemlerde olan moleküler ve biyolojik fonksiyonların alt yapısını oluşturduğu düşünülmektedir. Bizim bulduğumuz sonuçlara göre 3.ayda hipokampus bölgesinde ekspresyonu azalan bazı proteinler ER stres yolağını etkilemekte ve bu yolaktaki değişim ileriki dönemde (6.ayda) mikrotübül hareket bozukluğu, protein taşıma sistemi bozukluğu, mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif strese sebebiyet oluşturduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışma ile yaşa bağlı hipokampus bölgesinde değişim gösteren protein ekspresyonları proteomik teknikler kullanılarak 5xFAD fare modelinde incelenmiş ve hastalığın temel mekanizmasının anlaşılması hedeflenmiştir.

8. KAYNAKLAR

1. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 2010;464(7288):529-35.
2. Hartl D, Rohe M, Mao L, Staufenbiel M, Zabel C, Klose J. Impairment of adolescent hippocampal plasticity in a mouse model for Alzheimer's disease precedes disease phenotype. *PLoS one*. 2008;3(7):e2759.
3. Maya-Vetencourt JF, Carucci NM, Capsoni S, Cattaneo A. Amyloid plaque-independent deficit of early postnatal visual cortical plasticity in the 5XFAD transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014;42(1):103-7.
4. O'Brien C, Augustine D. and Alzheimer's disease. *Science*. 1996;273(5271):28.
5. Selkoe DJ, Wolfe MS. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell*. 2007;131(2):215-21.
6. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;349(6311):704-6.
7. Mullan M CF, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992;3:345-7.
8. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Human molecular genetics*. 1997;6(12):2087-9.
9. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(5):333-44.
10. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30.
11. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*. 1994;7(2):180-4.
12. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-3.
13. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:1121-59.
14. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*. 2001;81(2):741-66.

15. Hooper NM. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 2):335-8.
16. Hernandez F, Avila J. Tauopathies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(17):2219-33.
17. Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(10):783-93.
18. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*. 1992;99(2):195-231.
19. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*. 1973;232(2):331-56.
20. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 2004;429(6993):761-6.
21. Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *European neurology*. 1993;33(6):403-8.
22. Mann DM. Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*. 1996;5(4):423-7.
23. Bilkei-Gorzo A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;142(2):244-57.
24. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(40):10129-40.
25. Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Sakharkar AJ, Pandey SC, Feinstein DL. The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2012;33(8):1651-63.
26. Devi L, Ohno M. Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. *PloS one*. 2010;5(9):12974-9.
27. Girard SD, Baranger K, Gauthier C, Jacquet M, Bernard A, Escoffier G, et al. Evidence for early cognitive impairment related to frontal cortex in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;33(3):781-96.
28. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2012;33(1):196 e29-40.

29. Kimura R, Ohno M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiology of disease*. 2009;33(2):229-35.
30. Basaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. GENOMİK, PROTEOMİK, METABOLOMİK KAVRAMLARINA GENEL BAKIŞ VE UYGULAMA ALANLARI. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010;67(2).
31. Lace G, Savva GM, Forster G, de Silva R, Brayne C, Matthews FE, et al. Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1324-34.
32. del Valle J, Bayod S, Camins A, Beas-Zarate C, Velazquez-Zamora DA, Gonzalez-Burgos I, et al. Dendritic spine abnormalities in hippocampal CA1 pyramidal neurons underlying memory deficits in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2012;32(1):233-40.
33. Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(10):469-76.
34. Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(6):862-94.
35. Bingol B, Sheng M. Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*. 2011;69(1):22-32.
36. Stokin GB, Goldstein LS. Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annual review of biochemistry*. 2006;75:607-27.
37. Chakrabarti S, Mohanakumar KP. Aging and Neurodegeneration: A Tangle of Models and Mechanisms. *Aging and disease*. 2016;7(2):111-3.
38. Leuner K, Hauptmann S, Abdel-Kader R, Scherping I, Keil U, Strosznajder JB, et al. Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? *Antioxidants & redox signaling*. 2007;9(10):1659-75.
39. Cardoso S, Proenca M, Santos S, Santana I, Oliveira C. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiology of aging*. 2004;25:105-10.
40. Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, et al. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 1992;59(2):776-9.
41. Agin V, Chicher R, Chichery MP. Effects of learning on cytochrome oxidase activity in cuttlefish brain. *Neuroreport*. 2001;12(1):113-6.
42. Berndt JD, Callaway NL, Gonzalez-Lima F. Effects of chronic sodium azide on brain and muscle cytochrome oxidase activity: a potential model to investigate environmental contributions to neurodegenerative diseases. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2001;63(1):67-77.

43. Shen L, Chen C, Yang A, Chen Y, Liu Q, Ni J. Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage. *Journal of proteomics*. 2015;123:101-13.



9.EKLER

9.1. İstatiksel olarak anlamlı değişim gösteren tüm 3 aylık 5xFAD hipokampus dokusu proteinleri

Accession No:	Anova (p)	Max fold change	Protein
Q80TI1	0.003113952974	1.710264012	Pleckstrin homology domain-containing family H member 1
Q8CDL9	0.003933864271	1.482739161	Coiled-coil domain-containing protein 87
P08113	0.004777603024	1.441067874	Endoplasmin
P03995	0.00486399468	1.487233581	Glial fibrillary acidic protein
P28301	0.009856447415	1.928203597	Protein-lysine 6-oxidase
P50149	0.01244780861	1.878493922	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-2
Q9WV69	0.0138309215	1.570256328	Dematin
Q8BH95	0.01448985214	1.62667348	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial
Q14CH0	0.01633857349	1.507813501	Protein FAM171B
Q9D5S7	0.01753572109	1.563797869	Leucine-rich repeat and guanylate kinase domain-containing protein
Q9JLB0	0.02179673924	1.41650234	MAGUK p55 subfamily member 6
O35874	0.02187500937	2.226225353	Neutral amino acid transporter A
P52760	0.03127394902	1.432972522	Ribonuclease UK114
Q99NE5-6	0.03651349593	1.456363321	Isoform 6 of Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1
E9PVD1	0.04722647043	1.626054466	Coiled-coil domain-containing protein 62

9.2. İstatiksel olarak anlamlı değişim gösteren tüm 6 aylık 5xFAD hipokampus dokusu proteinleri

Accession No:	Anova (p)	Max fold change	Protein	Changes
Q8C1Z8	2.67E-09	3.2011487	tRNA methyltransferase 10 homolog A	↑
Q61656	1.05E-07	1.445624816	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	↓
Q920A7	3.55E-07	3.331949233	AFG3-like protein 1	↑
Q9CPQ1	3.64E-07	1.430173207	Cytochrome c oxidase subunit 6C	↑
O35593	4.91E-07	1.907517274	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	↓
Q9JMH9	1.43E-06	2.116231593	Unconventional myosin-XVIIa	↑
Q9Z1B3	1.44E-06	1.756518793	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	↓
Q8BGG7	1.56E-06	1.81034109	Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein B	↑
Q61532	1.95E-06	1.753305415	Mitogen-activated protein kinase 6	↓
P60469	2.28E-06	1.569555316	Liprin-alpha-3	↓
Q3U410	2.83E-06	1.636121119	Kelch-like protein 21	↑
Q62059	2.96E-06	1.536199681	Versican core protein	↑
Q8BYR5-6	3.02E-06	4.901224317	Isoform 6 of Calcium-dependent secretion activator 2	↓
P22892	3.44E-06	1.636000129	AP-1 complex subunit gamma-1	↓
Q8JZN7	3.97E-06	1.971034853	Mitochondrial Rho GTPase 2	↑
Q9D8B3	4.60E-06	2.38623105	Charged multivesicular body protein 4b	↑
Q02357	4.68E-06	1.637322828	Ankyrin-1	↓
P28661	6.65E-06	3.122816151	Septin-4	↑
P28740	6.79E-06	3.736122365	Kinesin-like protein KIF2A	↓
Q99LD8	6.83E-06	2.035108918	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	↑
O54829	6.98E-06	1.405564378	Regulator of G-protein signaling 7	↓
A7XUZ6	7.10E-06	1.479045881	Selection and upkeep of intraepithelial T-cells protein 6	↑
Q8BWR2	8.58E-06	1.757041026	PITH domain-containing protein 1	↓
P19536	1.10E-05	1.595232495	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	↑
Q9D6P8	1.27E-05	1.45790839	Ca ²⁺ odulin-like protein 3	↑

P47809	2.02E-05	1.521433784	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	↑
Q9D2V7	2.12E-05	1.93112071	Coronin-7	↑
Q99MK9	2.44E-05	1.536664352	Ras association domain-containing protein 1	↑
Q9D5V5	2.76E-05	1.780975343	Cullin-5	↓
Q8CGK3	2.94E-05	2.663526407	Lon protease homolog, mitochondrial	↓
Q8R317	3.06E-05	1.787460789	Ubiquilin-1	↓
Q8CIE6	4.05E-05	1.444491023	Coatomer subunit alpha	↓
Q3THE2	4.62E-05	1.591552086	Myosin regulatory light chain 12B	↑
Q9JIK5	4.81E-05	3.189710117	Nucleolar RNA helicase 2	↓
P14685	5.01E-05	2.055660384	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	↑
P08103-2	5.12E-05	1.481272854	Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase HCK	↑
P54071	5.30E-05	1.418498003	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	↑
P62751	6.54E-05	1.576797886	60S ribosomal protein L23a	↑
Q62095	7.14E-05	1.71697016	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	↑
Q80TS3-3	7.35E-05	1.634065768	Isoform 3 of Latrophilin-3	↓
Q8BP47	7.77E-05	1.451303367	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	↓
Q9ERR1	7.93E-05	1.41265554	Nuclear distribution protein nudeE-like 1	↓
P46471	8.85E-05	1.438335808	26S protease regulatory subunit 7	↑
Q6P4U0	9.36E-05	1.498402757	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B	↓
P61028	0.000140872627	1.797223222	Ras-related protein Rab-8B	↑
O70585-2	0.0001486245154	2.544516015	Isoform 2 of Dystrobrevin beta	↑
Q6IFX3	0.0001504912815	1.411079388	Keratin, type I cytoskeletal 40	↑
P28738	0.0001570681638	1.497179358	Kinesin heavy chain isoform 5C	↑
P80318	0.0001573538831	1.628269553	T-complex protein 1 subunit gamma	↑
Q8CAS9	0.0001796385937	2.881057345	Poly [ADP-ribose] polymerase 9	↑
O88653	0.00018817782	1.741997534	Ragulator complex protein LAMTOR3	↑
P63037	0.0002198181362	1.904643652	DnaJ homolog subfamily A member 1	↓
Q9D7N9	0.0002219980463	1.810301599	Adipocyte plasma membrane-associated protein	↑
Q80Y83-2	0.0002932748855	2.526834986	Isoform 2 of Dixin	↑
Q8K386	0.0003083795674	1.581382485	Ras-related protein Rab-15	↑
P40201	0.0003551557361	2.470145545	Chromodomain-helicase-DNA-binding	↑

protein 1				
P05480	0.0004182776357	1.528754855	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	↑
Q920E5	0.0004190514225	1.752335166	Farnesyl pyrophosphate synthase	↓
Q9CQI6	0.0004280990512	1.707316544	Coactosin-like protein	↑
P35279	0.0004792783295	4.362650854	Ras-related protein Rab-6A	↑
Q7TPM6	0.0004826337595	1.604235405	Fibronectin type III and SPRY domain-containing protein 1	↑
Q3UMC0	0.0004982936393	2.684903124	Spermatogenesis-associated protein 5	↑
Q6NY15	0.0005754539519	1.654375249	Testis-specific gene 10 protein	↑
Q99MP8	0.000624374358	2.361316706	BRCA1-associated protein	↓
Q9ER00	0.0006676335835	1.418150217	Syntaxin-12	↑
Q6PHN9	0.0006731087309	1.453041774	Ras-related protein Rab-35	↓
Q3V3A1	0.0008099466169	1.662660794	Cyclin-dependent kinase 15	↑
Q810T2	0.0008197475508	2.638882667	G2/mitotic-specific cyclin-B3	↓
Q80VP2	0.000864638318	2.073791035	Spermatogenesis-associated protein 7 homolog	↓
Q80ZQ3	0.0008713838359	2.147183032	Uncharacterized protein C8orf74 homolog	↓
Q99LR1	0.0009209677398	2.019745624	Monoacylglycerol lipase ABHD12	↓
P80315	0.0009349480672	1.466943754	T-complex protein 1 subunit delta	↑
Q6A065	0.0009630824986	1.491132697	Centrosomal protein of 170 kDa	↑
Q61768	0.0009678793842	1.627888379	Kinesin-1 heavy chain	↑
P10637-4	0.001058812321	2.25053221	Isoform Tau-C of Microtubule-associated protein tau	↓
Q9QYR9	0.001182561791	2.175791532	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	↑
P14824	0.001238885225	1.656769359	Annexin A6	↑
Q9D2A5	0.001274068407	2.053084093	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 4	↓
P33175	0.001358566209	1.444007951	Kinesin heavy chain isoform 5A	↑
Q60771	0.001441208743	1.601442947	Claudin-11	↓
Q9JLN9	0.00165954465	1.49749426	Serine/threonine-protein kinase mTOR	↑
Q3UUF8	0.001675972682	1.552951983	Ankyrin repeat domain-containing protein 34B	↑
Q99MD9	0.001792634647	1.602512099	Nuclear autoantigenic sperm protein	↑
Q9D8Y0	0.001800925093	1.55647487	EF-hand domain-containing protein D2	↓

Q922J9	0.001979697729	1.460230671	Fatty acyl-CoA reductase 1	↑
Q9QXN5	0.002035783832	1.516580187	Inositol oxygenase	↓
Q8BGB7-2	0.002114428822	1.482530432	Isoform 2 of Enolase-phosphatase E1	↓
Q8R1Q8	0.002180467473	1.591887876	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	↑
Q9CQ60	0.002279857229	1.679181257	6-phosphogluconolactonase	↑
P15920	0.002387686615	1.544901806	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 2	↑
Q99NE5	0.002391086913	1.579828662	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	↓
Q8CAY6	0.00265328253	1.451866359	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	↓
Q69ZT9	0.0027542247	3.621078114	TBC1 domain family member 30	↑
O35075	0.003042491426	2.823088447	Down syndrome critical region protein 3 homolog	↑
O88441	0.003083537449	1.513692363	Metaxin-2	↓
Q9DCJ9	0.003348541655	1.751580865	N-acetylneuraminate lyase	↑
A2RT62	0.003400667886	3.582444071	F-box/LRR-repeat protein 16	↓
Q9CYW4	0.003725015027	1.503713298	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	↑
Q9JIF7	0.003890936325	1.572388135	Coatomer subunit beta	↓
Q61330	0.003992010575	1.451475662	Contactin-2	↓
Q6PD05	0.004807620284	1.469271665	Zinc finger protein 821	↓
Q8K0Y7	0.006773055996	1.587806226	Protein PAXX	↑
Q68EF6	0.006796892673	1.445463948	Brain-enriched guanylate kinase-associated protein	↑
Q61081	0.007128135135	2.651411188	Hsp90 co-chaperone Cdc37	↑
P5777	0.00749917127	1.745213906	Mitogen-activated protein kinase 8	↑
Q62433	0.01039125891	1.455006987	Protein NDRG1	↑
Q8C166	0.01158977436	1.508020407	Copine-1	↓
P20612	0.01267435559	4.281138762	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	↓
Q8R4B8	0.01288893184	1.626913152	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	↑
P62843	0.01303368158	2.100168462	40S ribosomal protein S15	↓
P62315	0.01307725193	1.420658747	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	↓
A2AP18	0.01330224599	1.659821046	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-2	↑

Q00612	0.0135724657	1.453940925	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	↓
Q9Z0X1	0.01551625102	1.407320634	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	↑
Q9DAK3	0.01633558998	1.567149281	Rho-related BTB domain-containing protein 1	↑
P98086	0.02211362757	3.19668493	Complement C1q subcomponent subunit A	↓
Q81110	0.02566138309	1.449312838	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	↑
Q61233	0.02879056964	1.541798324	Plastin-2	↓
P67871	0.0291868117	1.83089298	Casein kinase II subunit beta	↑
Q497I4	0.03047788535	1.629392934	Keratin, type I cuticular Ha5	↑
Q06890	0.03931560855	1.569422066	Clusterin	↓
P57776	0.04062219662	1.459356176	Elongation factor 1-delta	↓



10. ETİK KURULONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANI



Sayı : 38828770-604.01.01-E.709
Konu : Etik Kurulu Kararı

14/01/2016

Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluma yapmış olduğunuz "Alzheimer Hastalığında Yaşa Bağlı Hipokampusteki Protein Profil Değişimi ile Meydana Gelen Farklılıklar ve İlişkili Yolakların Transgenik 5xFAD Fare Modeli Üzerinde İncelenmesi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 14.01.2016 tarihinde e-İmzalanmıştır.
Doğrulama Kodu: <http://cbys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCode/DocumentViewer.aspx?Code=8B5B8354XA>



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/01/2016	07		Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

"Alzheimer Hastalığında Yaşa Bağlı Hipokampusteki Protein Profil Değişimi ile Meydana Gelen Farklılıklar ve İlişkili Yolakların Transgenik 5xFAD Fare Modeli Üzerinde İncelenmesi" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Aralık 2015-Ocak 2016

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanevi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşegül Sümeyye	Soyadı	ARZUMAN
Doğum Yeri	Kırklareli	Doğum Tarihi	12.06.1991
Uyruğu	Türk	TC Kimlik No	27377116004
E-mail	aysegul.arzuman@gmail.com	Tel	0535 986 40 27

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	2016
Lisans	Fatih Üniversitesi	2014
Lise	Tekirdağ Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre
1.	Proje Asistanı	Acıbadem Üniversitesi	2015-2016
2.	Araştırmacı	İstanbul Medipol Üniversitesi	2014-2015
3.	Stajyer	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2013
4.	Stajyer	University College London	2012

Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	İyi
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES puanı	67,85929	68,19973	64,08480

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	Çok İyi
C programlama Dili	Orta
Java	Orta