

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞINA SAHİP BİREYLERDE SERUM
KÖKENLİ OLASI BİYOMARKERLARIN LC-MS/MS
KULLANILARAK İNCELENMESİ VE TANIMLANMASI**

Şeyma TÜRKSEVEN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji
Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2015

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞINA SAHİP BİREYLERDE SERUM
KÖKENLİ OLASI BİYOMARKERLARIN LC-MS/MS
KULLANILARAK İNCELENMESİ VE TANIMLANMASI**

Şeyma TÜRKSEVEN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji
Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL ve Yrd. Doç. Dr. Naci ÇİNE

KOCAELİ
2015

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Parkinson Hastalığı'na sahip bireylerde serum kökenli olası biyomarkerların LC-MS/MS kullanılarak incelenmesi ve tanımlanması

Tez yazarı: Şeyma TÜRKSEVEN

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL ve Doç. Dr. Naci ÇİNE

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:		
ÜYE(DANIŞMAN):		
ÜYE:		
ÜYE:		
ÜYE:		

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2015

Prof.Dr. Mustafa YILDIZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Parkinson Hastalığı'na sahip bireylerde serum kökenli olası biyomarkerların LC-MS/MS kullanılarak incelenmesi ve tanımlanması

Amaç: Parkinson hastalarından alınan kan serumu örneklerinin, hastalığın tanısını kolaylaştıracak proteinlerin tanımlanması amacıyla, LC-MS/MS proteomik yöntemi kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: *parkin* geni mutasyonlarına sahip Parkinson Hastaları ile sağlıklı bireylerden alınan serumlarda bulunan yüksek miktardaki proteinler afinite kolon yardımıyla uzaklaştırıldı. Protein ekstraksiyonu sonrasında elde edilen triptik peptitler, etiketsiz bottom-up ters faz LC-MS/MS proteomik yöntemi ile proteinlerin ekspresyon farklılıkları analizinde kullanıldı. Peptidlerin kantifikasyonu MS ile yapılırken, MS/MS ile fragmentlerine kadar parçalanmasına izin verilerek aminoasit dizileri tanımlandı.

Bulgular: İstatiksel olarak ekspresyon farklılıkları anlamlı olan 97 farklı protein tanımlandı ve proteinlerin serum içindeki miktarları ölçüldü. Progenesis yazılımında tanımlanan proteinlerdeki ekspresyon farklılıkları IMPaLA yolak analizi ile değerlendirildi.

Sonuç: Serum biyomarker kaynağı olarak kullanılan bir biyolojik sıvıdır. HPLC serumda fazla miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması için, LC-MS/MS ise protein ekspresyon değişimlerini göstermek için kullanılacak yöntemlerin başında gelmektedir. Bulduğumuz proteinlerin yalnızca 11 tanesinin daha önce literatürde Parkinson hastalığı ile ilişkisi olduğu saptanmıştır. Geriye kalan 86 proteinin PH ile bağlantısı olabilir ve olası biyomarker olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Serum, LC-MS/MS, Parkinson Hastalığı

ABSTRACT

The investigation and identification of possible serum biomarkers in patients with Parkinson's Disease via LC-MS/MS analysis

Aim: In order to facilitate the diagnosis of the Parkinson's Disease, investigation of the blood serum samples of Parkinson Disease patients by using LC-MS/MS as a proteomic research tool was aimed.

Yöntem: High –abundant serum proteins were immunodepleted from serum samples which were obtained from healthy people and Parkinson patients who carry mutations on their *parkin* gene with affinity colon. The tryptic peptides that were obtained from protein extraction were used in protein expression analysis by using Label-free bottom-up RP LC-MS/MS method. The quantification of the peptides was carried out by MS analysis and the identification of their aminoacid sequences was achieved by MS/MS analysis.

Findings: It was observed that statistically meaningfull expression difference in 97 different proteins and amount of them in the serum samples were quantified. The differences in protein expression defined in *Progenesis* software was evaluated by Impala pathway analysis.

Results: Serum is a biological fluid that used as a biomarker source. HPLC is a commonly used to remove the high-abundant proteins in the serum while the protein expression difference can be observed by performing LC-MS/MS analysis. The associations of 11 proteins which in the differently expressed 97 proteins that we analyzed with Parkinson Disease. The other 86 ones may also be associated with the disease and they are candidate biomarkers.

Keywords: Serum, LC-MS/MS, Parkinson' s Disease

TEŞEKKÜR

Kocaeli Üniversitesi ve TÜBİTAK ortak yüksek lisans programını oluŐturmada emeği bulunan ve bize bu programda yer alma fırsatı tanıyan tüm yetkililere,

Yardımları, bitmeyen sabrı ve her zaman en iyisi olmak için bizleri teşvik eden tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal' a ve Yrd. Doç. Dr. Naci ÇİNE' ye, çalışma materyaline hızlı bir şekilde ulaşmamızı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Ebba

Lohmann' a

Desteđini her zaman hissettiren aileme,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
EKLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç ve kapsam.....	1
1.2. Hipotezler	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Parkinson Hastalığı.....	3
2.2. Parkinson hastalığının semptomları ve ilerleyişi.....	4
2.3. Parkinson hastalığının patofizyolojik tanısı	4
2.4. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi	5
2.5. Parkinson hastalığı biyomarker kaynağı olarak serumun seçilmesi	6
2.6. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Ekspresyon Analizi Yöntemi	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Parkinson hastalarının ve sağlıklı bireylerin serumlarından Proteomik Çalışması için Protein Eldesi	12
3.2. HPLC İle Serum Proteinlerinin İmmündepleasyonu.....	12
3.2.1. HPLC ile Serum Proteinlerinin Deplete Edilmesi Protokolü	12
3.3. Proteinlerin FASP Metodu ile Peptide Dönüştürülmesi.....	13
3.3.1. Kullanılan Çözeltiler	13
3.3.2. FASP Protokolü.....	14
3.4. Kromatografik Ayırıştırma	15

3.4.1. 1D Ters Faz Kromatografisi (RP):	15
3.5. MS ve MS/MS Deney Kurulumu:	16
3.5.1. MS ^E Deney Kurulumu:	16
3.6. <i>Progenesis QI for Proteomics</i> ile proteinlerin belirlenmesi ve kantifiye edilmesi.....	16
4. BULGULAR	18
4.1. LC-MS/MS sonuçları	18
4.2. <i>Progenesis QI for Proteomics</i> ile protein kantifikasyonu	18
4.3. IMPaLA yolak analizi	30
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR.....	39
EKLER.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH: Alzheimer Hastalığı

BEH : Etil köprülü hibrit

ESI-QTOF : Elektrosprey iyonizasyon- kuadrupol uçuş zamanı

FASP : Filtre yardımıyla örnek hazırlığı

HPLC : Yüksek performans-sıvı kromatografisi

IgA: İmmunoglobulin A

IgG: İmmunoglobulin G

LBs : Lewy cisimcikleri

LC-MS^E : Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi^E

PH: Parkinson hastalığı

RP : Ters faz

SCX : Güçlü katyon değişim

UPLC : Nano akış sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. : Parkinson hastası bireylerin ortalama yaşam süresi (van der Made, 2011)	4
Şekil 2.2. : PH bireylerde <i>substantia nigra</i> ' da meydana gelen kayıp (A.D.A.M., Inc. National Institutes of Health).	5
Şekil 2.3. : Parkinson hastalığı genetik sıklığı. Başlangıç yaşına göre ayrılan farklı gruplarda hastalığın sıklığı (Klein and Schlossmacher 2006).	6
Şekil 2.4. : Parkinson Hastalığı proteomik çalışmalar için potansiyel kaynaklar (Licker ve Burkhard, 2014).	7
Şekil 2.5. : Kütle spektrometresi ile protein analizi (Baykal, 2011).	8
Şekil 2.6. : LC-MS/MS'de Peptitlerin analizi. A. Peptitlerin belirlenmesi. B. Örneğe ait peptitlerin kromatogram ile gösterimi (Baykal, 2011).	9
Şekil 3.1: LC-MS/ MS cihazı (Baykal, 2011).	15
Şekil 4.1. : PH' da ekspresyonunda artış olan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.	23
Şekil 4.2. : PH' da ekspresyonunda artış olan proteinlerin biyolojik sınıflarına göre sınıflandırılması.	23
Şekil 4.3. : PH' da ekspresyonunda artış olan proteinlerin hücrel içeriklerine göre dağılımı.	24
Şekil 4.4. : PH' da ekspresyonunda azalış olan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.	28
Şekil 4.5. : PH' da ekspresyonunda azalış olan proteinlerin biyolojik sınıflarına göre sınıflandırılması.	29
Şekil 4.6. : PH' da ekspresyonunda azalış olan proteinlerin hücrel içeriklerine göre dağılımı.	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. : Deneyde kullanılan gereçler.....	11
Çizelge 3.2. : HU14, 4.6× 50mm kolonu için Sıvı Kromatografi Metodu.Solvent A: Tampon A; Solvent B: Tampon B. Maksimum Basınç: 60 bar.....	13
Çizelge 4.1. : Proteomiks analizlerinde kullanılan hasta ve kontrol örneklerinin dağılımı.	18
Çizelge 4.2. : <i>Progenesis QI for Proteomics</i> analizi sonucunda PH' da ekspresyonunda artış olan proteinler.....	19
Çizelge 4.3. : <i>Progenesis QI for Proteomics</i> analizi sonucunda PH' da ekspresyonunda azalma olan proteinler.....	25
Çizelge 4.4. : Temsili yolak analizi.....	30
Çizelge 4.5. : Wilconx zenginleştirme analizi.....	31

EKLER DİZİNİ

Ek 1. : Temsili yolak analizi.....	45
Ek 2. : Wilconx zenginleştirme analizi	50

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı, Avrupa’ da 1.2 milyon insanı ve Amerika’ da 1 milyon insanı etkilemektedir ve bu sayının batı popülasyonlarında 2030 yılına kadar iki katına çıkacağı beklenmektedir (Olesen ve ark, 2012; Thomas ve ark, 2007; Dorsey ve ark, 2007). İlerleyen teknolojiye rağmen şu an için tedavisi olmayan PH toplumu ekonomik ve sosyal olarak olumsuz etkilemektedir(Dorsey ve ark 2013; Kowal ve ark 2013; Wimo ve Prince 2010).

Proteomik çalışmalar PH’nın moleküler mekanizmasını anlamak ve erken teşhis için biyomarker geliştirmede kullanılmaktadır (Xie ve ark., 2011; Mila ve ark., 2009; Rite ve ark., 2007). Kolay, ucuz ve çok miktarda elde edilebilirliği ve protein içeriği bakımından zengin olması serumu biyomarker çalışmaları için ideal bir biyolojik sıvı haline getirmektedir.

Günümüzde yaşam kalitesini artırmak için ilerleyen teknolojiye rağmen PH’nın altında yatan mekanizmaların çözülememesi uygun biyomarker geliştirilememesine, hastalığın teşhisinin ve tedavisinin erken fazlarda belirlenememesine yol açmaktadır. Tez çalışmamızda, biyolojik sıvı ve doku gibi örnek çeşitlerinden proteinlerin tanımlama ve ölçümünün doğru ve hızlı yapılmasına imkan sağladığı ve protein profili incelendiğinde değişmeyen veya bozukluğa uğrayan proteinleri (Shi ve ark, 2009) gösterdiği için LC-MS/MS proteomik yöntemi uyguladık.

1.1. Amaç ve kapsam

İnsan proteomunun en kompleks içeriklerinden birini oluşturan serum proteomu herhangi bir hastalık durumunda bireyde gözlenen patolojik ve fizyolojik değişimleri protein düzeyinde yansıtmaktadır (Thadikkaran ve ark, 2005).

Bu çalışma kapsamında amacımız Parkinson hastası ve sağlıklı olduğu bilinen bireylerde serum proteomunu karşılaştırmaktır. Hasta ve kontrol grubu proteomunun belirlenmesi için ilk olarak serumun içinde çok fazla miktarda bulunarak düşük miktardaki olası biyomarkerların belirlenmesini engelleyen yüksek miktardaki proteinlerin HPLC ile uzaklaştırılması sağlandı, elde edilen protein ekstraktı tripsin enzimi aracılığıyla peptid karışımı haline dönüştürüldü. Protein ekspresyon farklılıkları RP- LC-ESI-qTOF-MS/MS ile belirlendi. Elde edilen istatistik veriler olası serum biyomarkerlerini tanımlamak için kullanıldı.

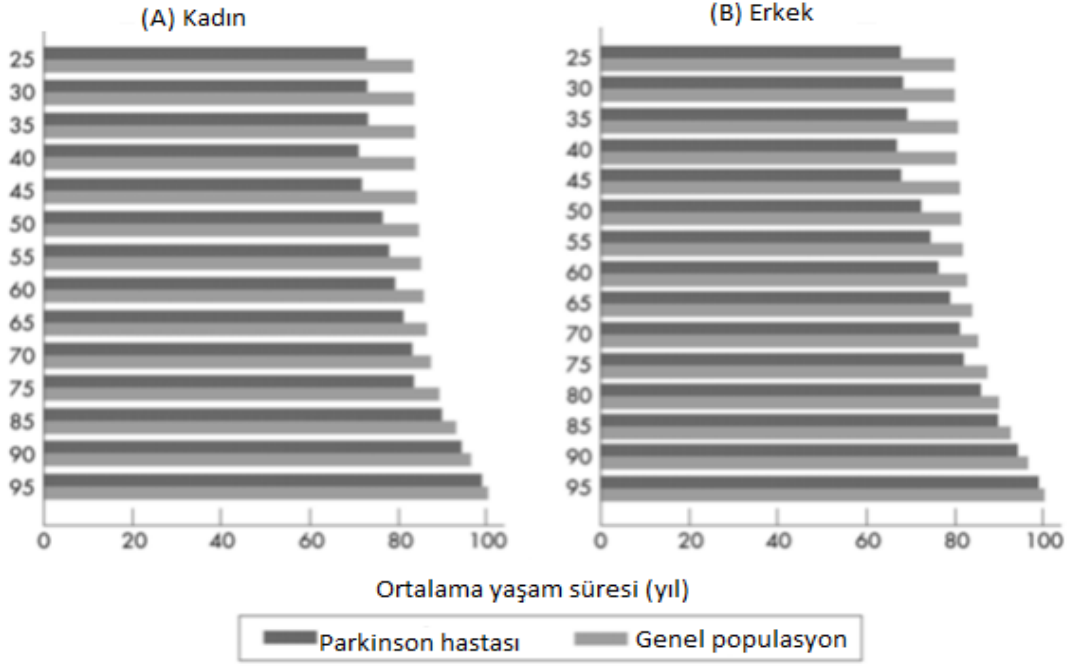
1.2. Hipotezler

Serebrospinal sıvı dejenerasyona uğrayan beyin yapılarına yakın olduğu için nörodejeneratif hastalıkları anlamada teşhis kaynağı olarak kullanılabilir. Ancak hasta kişilerden Lumbar puncture ile serebrospinal sıvıyı elde etmek kolay değildir ve her gün yaklaşık yarım litre serebrospinal sıvı kana geçmektedir. Bu çalışma kapsamında, hasta ve kontrol grubu arasında Parkinson hastalığına ilişkin serumda bulunan protein ifade farklılıklarının değişeceğini ve bu değişimde rol oynayan proteinlerin hastalık sürecinde biyomarker olarak kullanılabileceğini ileri sürdük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Parkinson Hastalığı

PH, AH' ndan sonra en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (Gardner 2010; Ruipérez ve ark., 2010) ve hareketlerde yavaşlama, kas sertliği, titreme ve duruş bozukluğu ile karakterize edilir (Holt ve ark., 2010). Hastalığın erken başlangıçlı PH ve geç/ileri başlangıçlı PH olmak üzere iki çeşidi vardır. Erken başlangıçlı PH idiyopatik PH olarak adlandırılırken geç/ileri başlangıçlı PH ailesel olarak adlandırılmakta ve hasta kişilerin % 85 ini oluşturmaktadır (Simunovic ve ark., 2009). Hastalığın başlangıç yaşı 60 olarak düşünülse de bu spektrum oldukça geniştir bazı bireylerde 20 yaş öncesi bazılarında 90 yaşından sonra görülmektedir (Schrag ve ark., 1998; Bower ve ark., 1999). 1994 den 2008' e kadar yapılan çalışmalar göz önüne alındığında dünya çapında yaklaşık 6.3 milyon insan PH'ne yakalanmıştır. Endüstrileşmiş toplumlarda Hastalığın yaygınlığı tüm popülasyonun %3'ü ve 60 yaş üstü kişilerde ise %1 olarak kabul edilmektedir (Nussbaum ve Ellis 2003) ve çalışmaların çoğunda erkeklerde daha yüksek oranla görülmektedir (Mayeux ve ark., 1995; Hofman ve ark., 1998). Olası bir ihtimal steroid hormonların nörolojik oluşumları azaltarak kadınları koruduğudur (Alves ve ark., 2009). Genel popülasyonla karşılaştırıldıklarında özellikle 50 yaşından önce gelişmeye başlayan erken başlangıçlı Parkinson hastalığında hastaların yaşam süresi oldukça kısadır ancak başlangıç yaşı artığı için bu farklılıklar gittikçe küçülür (şekil 2.1.) (Ishihara ve ark., 2007).



Şekil 2.1. : Parkinson hastası bireylerin ortalama yaşam süresi (van der Made, 2011)

Ölüm oranındaki artış hastalık süresi, cinsiyet farklılığı (erkek cinsiyeti), duruş bozukluğu, yürüyüş zorluğu ve demansın gelişmesi ile ilişkilendirilmektedir (Lo ve ark., 2009; De ve ark., 2005). Hastalığın teşhisinden sonraki yıllarda bilişsel bozukluğun ve halüsinasyonların ölüm riskini artırdığı bilinmektedir (Lo ve ark., 2009). Malignansi, iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler hastalıklar ve zatürre Parkinson hastalarındaki en yaygın ölüm sebepleridir (Lo ve ark., 2009; Ben-Shlomo ve Marmot 1995; Hely M A ve ark., 1999; Fall P A ve ark., 2003; Diez Gross R ve ark., 2008; Pennington ve ark., 2010).

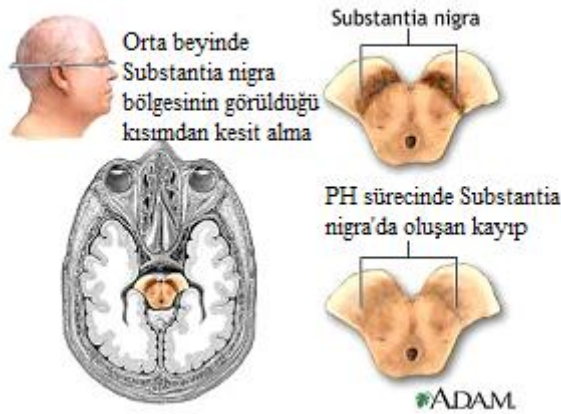
2.2. Parkinson hastalığının semptomları ve ilerleyişi

PH farklı dönemlerden meydana gelmektedir. Başlangıç döneminde, öğrenme, hafıza, planlama ve problem çözme yeteneklerinde bozukluklar meydana gelmektedir (Poewe W. 2008; Dubois ve Pillon, 1997). Sonraki dönemde, brakidinezya, kontrolsüz kas hareketleri, duruş bozukluğu ve titreme meydana gelmektedir (Korczyn ve Gurevich, 2010; Isaacson ve Hauser 2009; Eriksen ve ark., 2005). Hastalığın son döneminde hastalarda ruhsal denge bozuklukları ve ardından bunaklık görülmektedir (Korczyn ve Gurevich, 2010).

2.3. Parkinson hastalığının patofizyolojik tanısı

PH *substantia nigra pars compacta* (Şekil 2.2.) ve bazal ganglia, beyin kökü, otonomik merkezi system ve serebral korteks'te bulunan dopaminerjik nöronların ilerleyici dejenerasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Striatumda dopamin eksikliğine sebep olan dopaminerjik nöronların kaybı hastada ait titreme, kas sertliği, brakidinezya, duruş

bozuklukları gibi semptomların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Simunovic ve ark., 2009; Dekker ve ark., 2003; Cantuti-Castelvetri I, ve ark., 2007; Zhu X ve ark., 2006; Beyer ve ark., 2009; Damier P ve ark., 1999; Williams A ve ark., 2010; Pereira ve ark., 2006). Ayrıca yanlış katlanmış ve ömrünü doldurmuş proteinlerin parçalanması için gerekli olan ubiquitin-proteozom sistemi ve otofaji-lizozomal sistemlerin fonsiyonlarındaki değişiklik PH gelişiminde rol oynar (Beyer ve ark., 2009) ve hasta kişilerde *substantia nigra pars compacta*'da proteozomal fonsiyon bozukluğu belirlenmiştir (Chesselet 2003). Tanıyı kolaylaştıracak diğer özellik ise hasarlı dopaminerjik nöronlarda LBS'lerin oluşmasıdır. LBS genel olarak α -sinüklein ve ubiquitin içeren inklüzyonlardır (Beyer ve ark., 2009; Cieślak ve ark., 2008; Kövari E ve ark., 2009), beyin kökünde ve orta beyinde *substantia nigra*' da görülmektedir (Zhu X ve ark., 2006; Chesselet M-F. 2003). Beyin kökünde belirlenen LBS α -sinüklein, ubiquitin, fosforillenmiş nörofilamentler, parkin, moleküler şaperonlar, lipidler ve ubiquitin-proteozom sisteminin bileşenleridir (Zhu X ve ark., 2006; Beyer ve ark., 2009; Chesselet 2003; Obeso ve ark., 2010). LBS'lerini sadece PH'da değil aynı zamanda AH'nda, yaşlı insanlarda ve multiple system atropi gibi nörolojik koşullara sahip kişilerde de görülmektedir (Gibb ve Lees, 1988).

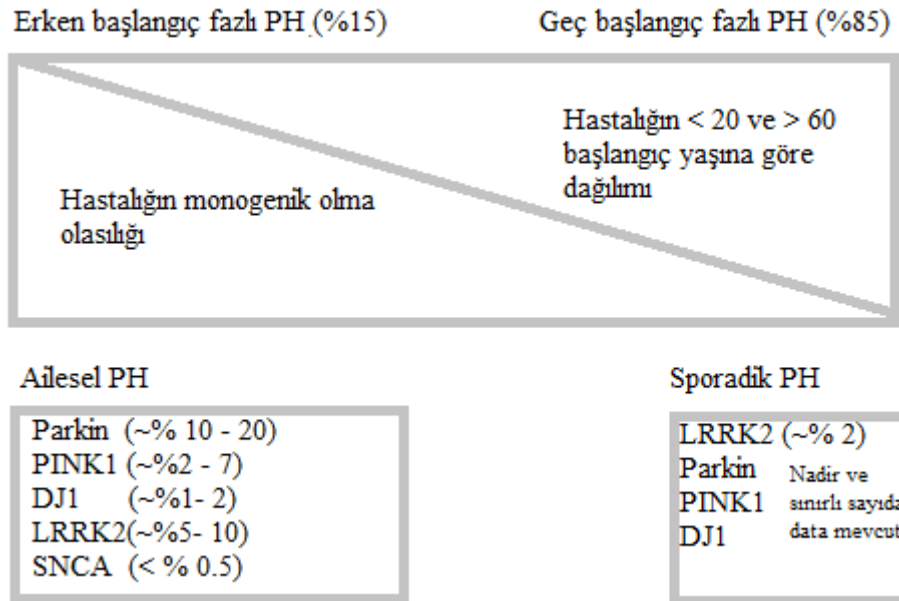


Şekil 2.2. : PH bireylerde *substantia nigra*' da meydana gelen kayıp (A.D.A.M., Inc. National Institutes of Health).

2.4. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi

Hastalığın en yaygın görülen çeşidi olan sporadik PH'ı, genetik yatkınlık ve çevresel faktörler etkilemektedir. Otozomal dominant parkinsonizm'e alfa- sinüklein ya da LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2, dardarin) kodlayan genlerdeki mutasyonlar sebep olurken, parkin, PINK1 (PTEN-induced kinase 1), DJ-1, ya da ATP13A2 kodlayan genlerdeki mutasyon otozomal resesif parkinsonizm olarak adlandırılır (Şekil 2.3.). Ailesel formlar tüm hastaların %10' u unu oluşturmaktadır (Pilsel ve Winklhofer 2011). Bu çalışma kapsamında Parkin mutasyonu

olan PH ile çalışılmıştır. Parkin *PARK2* geni tarafından kodlanan bir proteindir (Kitada ve ark., 1998; Matsumine ve ark., 1998). Parkin genindeki mutasyonlar, otozomal resesif parkinsonizmin juvenil formuna sebep olmaktadır (Kitada ve ark., 1998). Normal gen ürünü olan parkin proteini 465 aminoasitten oluşmaktadır. N terminalinde Ubikütin-benzeri bir bölge C terminalinde ise RING-finger (Really interesting New Gene) motifi içeren iki bölge ve bu iki bölge arasındaki tanımlı domain sekans bilgisi içermeyen IBR(in between ring) bölgelerini içermektedir(Kitada ve ark., 1998; Abbas ve ark., 1999; Zhang ve ark, 2000). Sitoplazmanın altında lokalize olan parkin proteini E3 ubikütin ligaz aktivitesi vardır, dopaminerjik nöronların hayatta kalma sürecinin devam etmesi, mitokondriyal fonksiyonların bakımı, stres faktörlerinden korunmayı sağladığı için nöroprotektant gibi davranmaktadır. *PARK2* mutasyonlarının çoğunluğunda E3 ubikütin ligaz aktivitesini fonksiyonlarında kayıp meydana gelmekte dolayısıyla yukarıda bahsedilen özelliklerde bozulmalara yol açmakta ve dejenerasyon yapılamamaktadır (Brüggemann N. Ve Klein C., 2001).

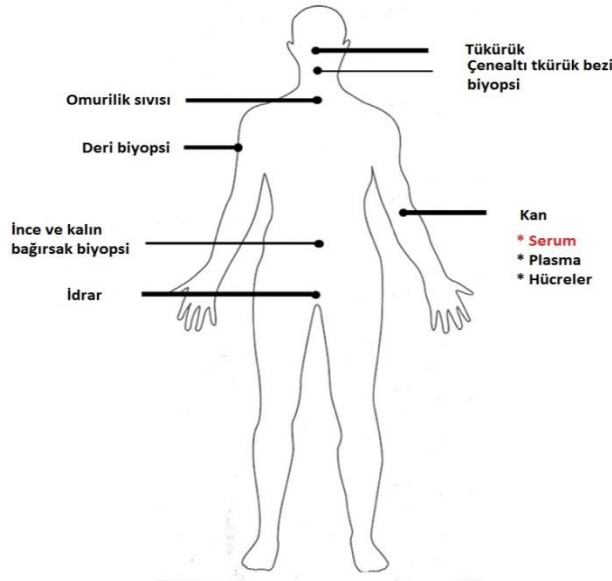


Şekil 2.3. : Parkinson hastalığı genetik sıklığı. Başlangıç yaşına göre ayrılan farklı gruplarda hastalığın sıklığı (Klein and Schlossmacher 2006).

2.5. Parkinson hastalığı biyomarker kaynağı olarak serumun seçilmesi

Hastalığın patolojisine ait doku örneklerinin ulaşımın sınırlı olmasından dolayı çoğu proteomik çalışma çeşitli post mortem beyin dokusu ve çeşitli biyosıvuların analizine dayanmaktadır (Şekil 2.4.). Beyin omurilik sıvısı dejenerasyona uğrayan beyin yapılarına yakın olduğu için potansiyel bir teşhis kaynağıdır ve patolojik koşullardaki biyokimyasal

durum direk olarak bu sıvıda gözlenmektedir ancak lomber puncture yaparak yaşlı bireylerden serebrospinal sıvıyı invazive şekilde elde etme yollarından biri olsa da kan daha kolay şekilde elde edilir ve her gün yaklaşık yarım litre serebrospinal sıvı kana geçmektedir (Lu ve ark., 2014). Ayrıca kan hastadan kolay bir şekilde elde edilmektedir ve kan-beyin bariyeri boyunca meydana gelen bozuklukları yansıtmaktadır (Licker ve Burkhard 2014). Kan proteinleri organ ve hücre tipinden kökenlendikleri için kompleks örneklerdir ve protein konsantrasyonunun dinamik aralığı 10^{12} 'ye kadar varabilmektedir ve total kan proteininin yaklaşık %95'ini oluşturan yüksek miktardaki 12 protein bulunmaktadır (Hortin ve Sviridov 2010). İdrar ve tükürük, nörodejeneratif hastalık proteomiksinde kullanılsa da az protein içermesi ve bireyler arasında yüksek çeşitlilik göstermesi analizde teknik sorunlara sebep olmaktadır. Serumda total serum proteininin %85'ini oluşturan (Lu ve ark., 2014) çok fazla miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması sağlanarak patolojik bir durumun potansiyel biyomarkerı olan düşük miktarda bulunan proteinlerin saptanması kolaylaşacaktır.



Şekil 2.4. : Parkinson Hastalığı proteomik çalışmalar için potansiyel kaynaklar (Licker ve Burkhard, 2014).

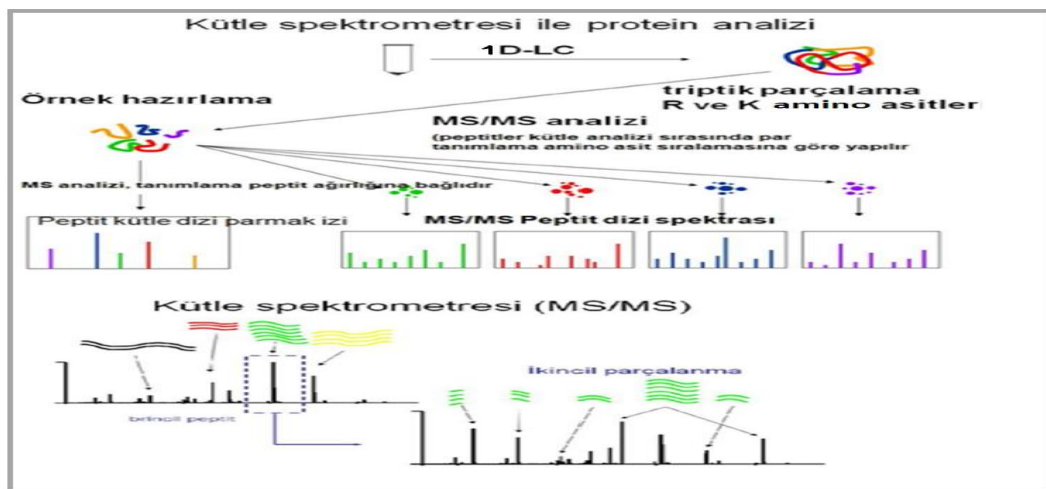
2.6. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Ekspresyon Analizi Yöntemi

İlerleyen proteomik teknikler sonucunda UPLC' nin ESI-QTOF kütle spektrometresi ile birleştirilmesi ile protein ifade farklılıklarının hesaplanmasının yanında translasyon sonrası modifikasyonların da derinlemesine analiz edilebileceği bir alan oluşmaktadır.

Çalışma kapsamında, PH bireylerden ve sağlıklı bireylerden elde edilen serum örneklerinin analizi için LC-MS^E denilen ileri bir teknik kullanıldı. Bu teknolojiyle proteinler FASP yöntemi kullanılarak tripsin eşliğinde parçalandıktan sonra güçlü katyon değişim (SCX) ve ters faz (RP) kromatografisinde ayrıştırılmaları sağlanır ve ardından peptid ağırlıklarının belirlenebilmesi için MS analizine, amino asit dizisinin belirlenmesi için ise MS/MS analizleri yapılır. Bu yöntem deteksiyon limiti içerisindeki bütün proteinlerin tanımlanmasına olanak vermektedir (Şekil 2.5.).

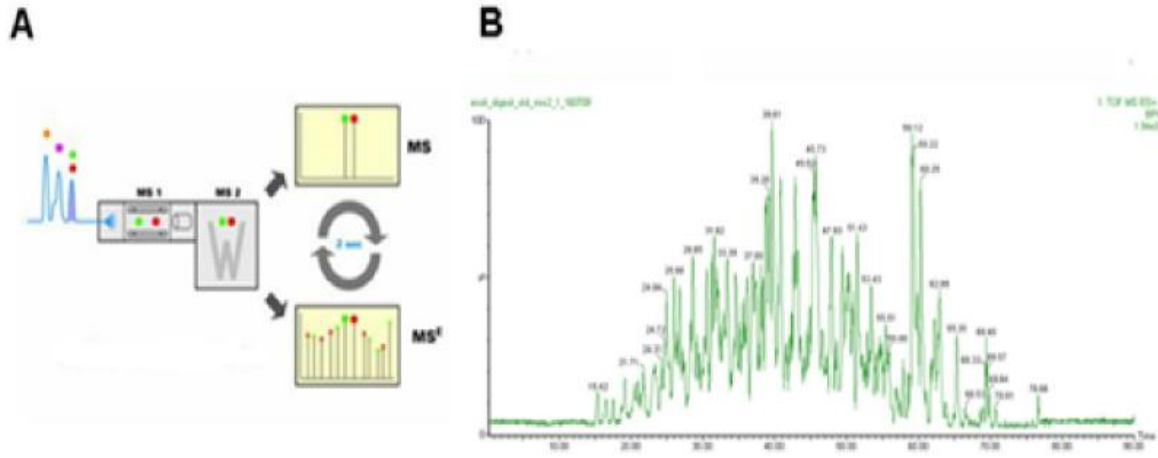
Karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kararlı, yüksek çözünürlükte ve yüksek hassasiyette çalışabilen, gelişmiş kromatografik sistemlere ihtiyaç duyulur. UPLC, örneklerin çok yüksek düzeyde kromatografik ayrımlarını, tekrar edilebilir ve yüksek hassasiyette yapılmasına olanak vermektedir. Bu sistemde pik kapasitesi ve pik şeklindeki gelişmelerden dolayı analiz edilebilen parçacık sayısında ciddi artışlar görülmektedir. UPLC, 10,000 psi basınçta çalışabilmektedir ve bu özellik 2 mikrondan küçük dolgu maddesi içeren daha uzun kolonların kullanılmasını gerektirmektedir. İki boyutlu sıvı kromatografisi için optimize edilmiş olan bu sistem, 200 nl/dk ile 100 µl/dk akış hızlarında çalışabilmektedir. Böylece kromatografik ayrımlar, 50-300 mm uzunluktaki kolonlar ile gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle etil köprülü hibrit (BEH) adı verilen dolgu maddelerinin kullanıldığı kolonların çok kararlı olması, formik asitin kromatografik olarak daha net piklerin elde edilmesini sağlayarak çözünürlüğü direkt olarak etkilemektedir.

Laboratuvarımızda kurulu olan yüksek çözünürlük kütle spektrometresi (SYNAPT-HDMS), “Triwave” teknolojisi sayesinde peptit analizinde çok büyük gelişmeleri beraberinde getirmiştir.



Şekil 2.5. : Kütle spektrometresi ile protein analizi (Baykal, 2011).

Farklı örnek gruplarının karşılaştırılarak protein ifade farklılıklarının hesaplanması için iki temel proteomik yaklaşım vardır. Birincisi etiketli analiz olarak adlandırılan iTRAQ, SILAC ve ^{18}O profillemidir. Bu metodlar ile peptitler kovalent bağlarla bir kimyasal etikete bağlanır ve analiz sırasında etiketlerden elde edilen sinyale dayanarak ifade farklılıkları hesaplanır. Fazla sayıda örnek için kullanılamaması, en az 100 ug proteinin gerekli olması, kimyasal etiketlerin pahalı olmasından dolayı bu yaklaşım tercih edilmedi. Bu çalışma kapsamında analiz edilen örnek sayısı ilk başta 39 adet olduğu için etiketli analiz tercih edilmedi.



toplanır (Şekil 2.6.a). Protein karışımları binlerce peptidi içerdiği için ayrıştırma gücü çok fazla olan kolonların kullanılması gerekmektedir. UPLC sisteminde dolgu maddesi 1.7Å olan BEHC18 partikülleri kullanılmakta ve kolon uzunluğu 30 cm kadar olabilmektedir, bu şekilde peptit yükleme miktarı artırılmakta ve 300 nL/dk akış hızları ile 8000 psi basınç altında çok iyi ayrıştırma gerçekleştirilmektedir. Bu düzenek ile 500 ng peptit karışımından 200-400 proteinin tanımlanması mümkün olmaktadır. Karşılaştırmalı protein analizinin gerçekleştirilmesi için UPLC sisteminin tekrar edilebilir ve kararlı olması gerekmektedir. Peptit miktarlarının analizi iyon kromatogramında elde edilen piklerin integrasyonu ile gerçekleştirildiğinden peptitlerin farklı örnekler içinde analiz edilebilmesi için kromatografik alıkonulma zamanlarının örtüşmesi gerekmektedir (Şekil 2.6.b).

LC-MS/MS analizi kompleks örneklerden binlerce proteinin belirlenmesine ve göreceli olarak miktar tayinine imkan sağlamaktadır. Her bir LC-MS/MS analizi büyük ve fazla miktarda data üretmektedir dolayısıyla en iyi proteom doğruluğunu sağlayan, çalışma için anlamlı olan datanın ekstrakte edilmesi ve uygun bir şekilde işlenmesi için sofistike analize ihtiyaç duyulmaktadır. *Progenesis QI for proteomics* bu amaçla geliştirilmiştir. Etkili ve objektif analiz için işlenmiş data dosyalarından referans bir çalışma seçilerek diğer çalışmalar software tarafından otomatik olarak hizaya sokulmaktadır. Sonraki aşamada, LC-MS çalışmaları hizalanma skorlarıyla objektif olarak karşılaştırılmakta ve görsel görüntüler güvenilir ölçümler oluşturmak için potansiyelleri değerlendirilmektedir. *Progenesis QI for Proteomics*, Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Ekspresyon Analizi Yönteminin avantajlarını kullanarak kompleks data örneklerini kantifiye ve belirlemeye imkan sağlamaktadır. MS/MS datası bulunan tüm piklerin kantifikasyonu, etiketsiz karşılaştırmanın getirdiği avantajlardan, iyon miktarı baz alınarak güvenilir kantifikasyon, objektif ve otomatik data işleme sürecine sahip olması, eşsiz peptidler üzerinden Protein kantifikasyonu gibi avantajları bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çizelge 3.1. : Deneyde kullanılan gereçler

Kullanılan gereçler	Marka ve ürün kodları
FASP™ Protein Digestion Kit	Expedeon # 44250
Trypsin	Thermo Scientific # 90055
Proteaz İnhibitör Kokteyl	Sigma # P8340
LiChrosolv® Su	Merck Millipore
Formik Asit	Fluka # 94318-50ML-F
Enolaz	MassPrep™ # PN 186002325
Vortex	DragonLab MX-S
İnkübatör	Nüve EN 025
Santrifüj	Sigma
Pipet ve Pipet uçları	Eppendorf
Liyofilizatör	Alpha 1-4 Freeze Drying
Spin filtre	Agilent Technologies # 5185-5990
Thermo Shaker TS-100	BioSan # BS-010120-BK
Ultrasonikatör	Bandelin Sonopuls
Pur-A-Lyzer™ Mini 6000 Dialysis Kit	Sigma # PURN60100-1KT
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Tech.
Su banyosu	Bandelin Sonorex
HPLC	Agilent Technologies # 5185-5987
HPLC kolonu	Agilent Technologies # 5188-6557
LC- Vial	Supelco # 29413- U
Lobind Tüpler	Eppendorf # Z666505, Z666491- 100 EA
Nitril Eldiven	Supreno Plus, Powder Free

3.1. Parkinson hastalarının ve sağlıklı bireylerin serumlarından Proteomik Çalışması için Protein Eldesi

Protein ekstraktı elde edilmesi için, örneklere sırayla 5ul protein inhibitör kokteyli eklendi. 40°C / 15 dakika çalkalandı. Ardından 14000 X g' de 10 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıdan 500ul alındı ve 0.22um olan selüloz asetat spin filtreli kolondan geçirildi. 1000 X g' de 5 dakika santrifüjlendi ve temiz lobind ependorf tüplerine alındı.

3.2.HPLC İle Serum Proteinlerinin İmmündepleasyonu

Serum albumin, immunoglobulin, transferrin ve macroglobulin gibi yüksek miktarda bulunan protein grupları içermektedir ve bu proteinler total serum proteinin % 85'ini oluşturmaktadır. Düşük miktarda bulunan proteinlerin belirlenmesini kolaylaştırmak için insan kanında yüksek miktarda olan proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir (Lu ve ark, 2014). Bu çalışma kapsamında, serumda fazla miktarda bulunan 14 adet protein HU14 immündepleasyon kolonu (4.6x50mm) kullanılarak HPLC yardımı ile ayrılmıştır.

3.2.1. HPLC ile Serum Proteinlerinin Deplete Edilmesi Protokolü

Tampon A (yükleme, yıkama ve dengeleme için kullanıldı) ve Tampon B (yürütmek/ayırmak için kullanıldı) mobil faz olarak ayarlandı. 30 dakika 0.125 ml/dakika akış hızıyla hemen ardından birkaç dakika 1.0 ml/ dakika akış hızıyla Tampon A ve Tampon B hattı yıkandı. HPLC protokolü çizelge 2.7' deki gibi oluşturuldu. Kolon takılarak 0.125 ml/dakika akış hızıyla ardından 1.0 ml/dakika akış hızıyla yıkandı ve bu şekilde kolonun oda sıcaklığında dengelenmesi sağlandı. Örnekler HU14 Tampon A ile 5 kat seyreltildi ve akış hızı 0,125 ml/dakika olarak HPLC'ye enjekte edildi. Toplanan fraksiyonlar sıvı azotta dondurularak -20°C'de saklandı. Kolon Tampon A ile birkaç dakika 1 ml/dakika akış hızında yıkanması sağlandı böylece kolon temizlenmiş oldu. Tüm örnekler deplete edildikten sonra -63°C'de, 0.035mbar' da liyofilize edilerek 150 ul (1:1 oranında 50 mM Üre: LC-H₂O) çözeltisinde vortex, sanrtifüj, su banyosu yardımıyla tamamen çözünmeleri sağlandı. Proteomik için örnek hazırlanmasında kullanılacak olan FASP metodu için örneklerden 3:1 (v: v) oranında alındı, 50 mM üre total hacim 230 ul olacak şekilde tamamlanarak FASP'a başlandı.

Çizelge 3.2. : HU14, 4.6× 50mm kolonu için Sıvı Kromatografi Metodu.Solvent A: Tampon A; Solvent B: Tampon B. Maksimum Basınç: 60 bar.

	Zaman	%B	Akış Hızı	Max. Basınç
1	0,00	0,00	0,125	60
2	9,50	0,00	0,125	60
3	9,51	0,00	1,000	60
4	11,50	0,00	1,000	60
5	11,51	100,0	1,000	60
6	16,00	100,0	1,000	60
7	16,01	0,00	1,000	60
8	25,00	0,00	1,000	60

3.3. Proteinlerin FASP Metodu ile Peptide Dönüştürülmesi

FASP metodu üre solüsyon çözeltisinde zarar verici düşük moleküler ağırlıklı içeriklerin sindirilmesi, tiollerin karboamidometilasyonu, proteinlerin sindirilmesi ve peptidlerin elüsyonu aşamalarından oluşur. Sıvıdaki ve dokudaki çözünebilir ve çözünemeyen proteinler için örnek hazırlamada tercih edebilir. FASP protein sindirim kitinin avantajları tam proteomun çözündürülmesi, deterjanın sindirimi/azaltılması ile örnek temizlenmesi, proteinlerin yüksek verimli proteolitik enzim sindirimidir.

3.3.1. Kullanılan Çözeltiler

FASP Protein Sindirim Kiti: Kitin içeriği 8 örneklidir. Kit açılmaya kadar oda sıcaklığında, daha sonra +4°C’de saklandı.

Kit içeriği; 0.75g üre (toz halde), tris-hidroklorür çözeltisi, iyodoasetamid (toz halde), 50 mM, 20ml amonyum bikarbonat çözeltisi, 0.5 M NaCl çözeltisi, spin filtreler, tüpler

Üre çözeltisinin hazırlanması: Kitin içerisindeki 1,5 ml’lik tüplerin içerisinde hazır olarak bulunan toz haldeki üre üzerine yine kitin içeriğinde olan Tris-Hidroklorür çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Çözününceye kadar oda sıcaklığında vortkeslendi ya da 40°C’de çalkalanmaya konuldu.

10X İyodoasetamid çözeltisinin hazırlanması: 10X iyodoasetamid çözeltisi kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı ve folyo yardımıyla ışıktan korundu. 200 ml’lik tüplerde toz halde bulunan iyodoasetamid üzerine 100 ml hazırlanışı yukarıda

anlatılmış olan üre çözeltisinden eklendi. Tamamen çözününceye kadar pipet yardımıyla karıştırıldı.

Sindirim çözeltisinin hazırlanması (Tripsin Endoproteinaz): Liyofilize halde 20 mg tripsin şeklinde gelir. Proteinlerin sindirilmesi için 1,5 ml 50 mM Amonyum Bikarbonat çözeltisi eklenerek her bir örneğe 1 mg/75 ml olacak şekilde ilave edildi.

Formik Asit Çözeltisinin hazırlanması: LC-MS çalışmaları için uygun %98 saflıkta formik asit çözeltisidir. Çözelti 1 ml LC-su içine 1ul formik asit konularak %0.1'lik şekilde kullanıma hazırlandı.

3.3.2. FASP Protokolü

İdrar ve serum'dan elde edilen olan protein örneklerinin nanodop ile konsatrasyonları belirlendi ve 100 ug'ı 30 ul LC-su içerisinde olacak şekilde hazırlandı. Temiz ve kuru bir tüp içerisine eklenen 200 ml üre çözeltisi ile karıştırılarak tamamı spin filtreye aktarılarak 14, 000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Spin filtre üzerine 200 ml üre çözeltisinden eklenerek 14, 000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Filtreden süzülerek tüpte toplananlar atıldı. 10X iyodoasetamid 3.3.1.'deki gibi hazırlandı. Her bir örnek için 10X iyodoasetamid çözeltisinden 10 ml alınarak 90 ml üre çözeltisi karıştırılarak spin filtreye eklendi. Kısa bir süre karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Spin filtredeki örnekler 14, 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Spin filtre üzerine 100 ml üre çözeltisinden eklenerek 14, 000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu aşama iki kez daha tekrarlandı. Filtreden süzülerek tüpte toplananlar atıldı/döküldü. Spin filtre üzerine 100 ml 50 mM Amonyum Bikarbonat çözeltisi ilave edilerek 14, 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu aşama iki kez daha tekrarlandı. Proteinlerin sindirilmesi için 1 mg / 75 ml tripsin eklendi. Enzimin her noktaya ulaşabilmesi için yavaşça sallanır ve 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Tripsin inkübasyonunun ardından filtrelerin altındaki tüpler yeni ve temizleriyle değiştirildi ve iki kez 40 ml 50 mM Amonyum Bikarbonat çözeltisi ilave edilerek 14, 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Spin filtre üzerine 50 ml 0.5 M NaCl çözeltisi ilave edilerek 14, 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Spin filtrelerin alt kısmında peptid içeren çözeltinin toplanılarak tamamı alınarak temiz ve kuru tüplere konuldu ve tüplerin kapakları tepelerinden delinerek sıvı azota konuldu ve donduruldu ardından -63°C'de, 0.035mbar' da liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonrası toz haldeki örnekler 20 ml %0.1 formik asit çözeltisinde çözülerek NanoDrop ile konsantrasyon tayini

yapıldı. Her bir örnekten 5mg/50ml yeni tüplerde hazırlandı ve içerisine dahili standart olarak 1 ml (50 fmol) enolaz eklendi ve LC vialine aktarılarak cihaza verildi.

3.4. Kromatografik Ayırıştırma

Kompleks ve karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kütle spektrometresi analizi öncesinde bu örneklerin karışımın basitleştirilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde yüksek miktardaki proteinler düşük miktarda bulunan proteinleri maskeleyecek ve tanımlamanın kısıtlı olmasına neden olacaktır.



Şekil 3.1: LC-MS/ MS cihazı (Baykal, 2011).

3.4.1. 1D Ters Faz Kromatografisi (RP):

Kromatografik yöntemde peptitler, C18 kolon dolgu maddesini içerisinde rölatif hidrofobik etkileşimlerine dayanarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Bu da peptidin (2cm, C18 kolonu) kolondaki alıkonmasını vermektedir. Ardından nano pompa ile oluşturulan asetonitril gradienti ile tuzak kolondan ayrılan peptitler C18 analitik kolonunda hidrofobik etkileşimler ile ayırıştırılarak kolondan çıkar. Karmaşık peptit karışımının ayırıştırılması için 1.7 um BEH C18, 75 um x 250 mm nano LC kolonu ile 300 nL/dk akış hızında 90 dk' lık ters faz kromatografisi uygulanmıştır. 250 mm nano LC kolonunun toplam peptit yükleme kapasitesi 500 ng olarak belirlenmiştir. Bunun üzerinde örnek yüklemesi, kromatografik çözünürlüğü düşüreceğinden ayırıştırılmayı olumsuz etkiler. Kolona örnek yüklemesi öncesinde yapılan nanodrop protein konsantrasyon tayini ile

enjekte edilen her mikrolitreye karşılık ne kadar peptit bulunduğu saptandı ve böylelikle fazla yüklemeler önlendi.

3.5. MS ve MS/MS Deney Kurulumu:

MS analizi, peptitlerin bütünü hakkında bilgi toplamak için gerçekleştirilir. MS/MS analizi ise peptitlerin amino asit dizi bilgisinin bulunmasıdır. Peptitlerin analizi için Waters'ın MSE sistemi diye adlandırılan ve SYNAPT-HDMS sisteminde önce 5 eV daha sonra 25-40 eV çarpışma enerjisindeki analiz yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde her bir çarpışma enerjisinde 1.5 sn kadar veri toplandı ve belirli m/z aralığında olan peptitler tarandı. Bu şekilde hem peptidin bütünü hakkında hem de amino asit sekansı hakkında daha fazla bilgi alınabildi.

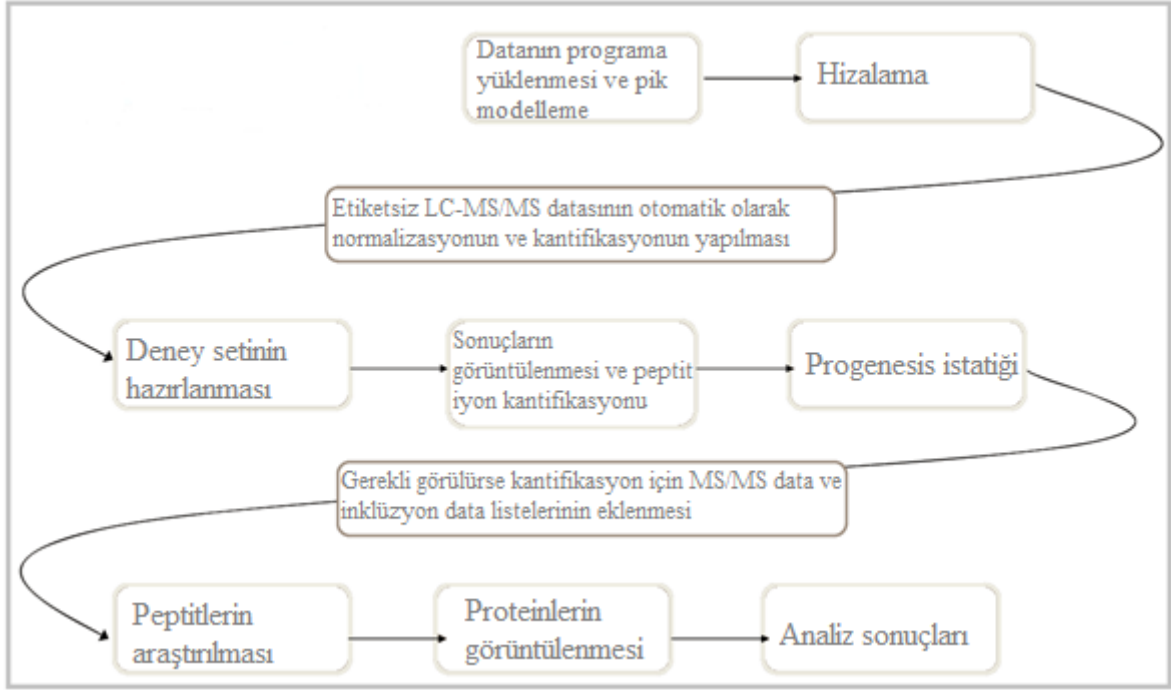
3.5.1. MS^E Deney Kurulumu:

Peptit aminoasit dizi bilgisinin analizi için, çalışmada öncelikli olarak kullandığımız yöntem MSE'dir. Geçmiş dönemlerde ESI-QTOF kütle spektrometrelerinde sadece DDA metodu kullanılabiliyordu fakat 2008 yılında Waters firmasının ürettiği SYNAPT-HDMS cihazı ile bu yeni metot kullanılmaya başlanmış oldu. DDA metodundan temel farkı 'precursor' denen peptit seçimlerinin yapılmaması ve kromatografik ayırtırmadan sonra elüe olan bütün peptitlerin aynı anda miktarlarındaki farklılıklar gözetmeksizin parçalanmaya başlanmasıdır. Aynı anda parçalanan peptitlerden ayrılan parçaların hangi peptitten geldiği yani aminoasit dizi bilgisi "Time-Aligne" fonksiyonu ile ilişkilendiriliyor. Bu yöntemin kullanıcı açısından yararı, DDA metodundan çok daha az parametre ayarlanması gerektiği ve temel olarak sadece hangi m/z aralığında peptitlerin taranmasını istediğinizi (genellikle 50-1990 ya da 100-1600) belirtmenizdir. MS^E metodu, teorik olarak tripsin ile bir proteinin parçalanmasından sonra elde edilebilecek triptik peptitlerin gerçekte kaç tanesini gördüğünüz % sekans tanımlamasını belirler, yani daha fazla peptit tanımlanmış ise protein tanımlaması daha güçlüdür. Her bir peptitte parçalanma sonrasında oluşan *b* ve *y* iyon serileri olarak adlandırılan parçacıkların sayısının fazlalığı amino asit dizisinin daha doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi sağlar. Sonuç olarak MS^E yöntemi ile daha doğru ve daha fazla sayıda proteinin tanımlaması gerçekleştirilecektir.

3.6. Progenesis QI for Proteomics ile proteinlerin belirlenmesi ve kantifiye edilmesi

Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics), LC-MS datasının yüksek kalitede sekanslama baz alınarak uygulanan etiketsiz analiz yöntemidir (Şekil 2.9.). Bütün peptid iyonlarının

deteksiyonu ve kantifikasyonu ekspresyon analizinin ardından yapılır ve proteinlerin nereden kökenlendikleri belirlenir. *Progenesis* LC-MS v2.0., database araştırması ve LC-MS/MS analizleri sonucunda çıkan kalitatif protein belirlenmesi ile peptid iyon ölçümlerini birleştirerek kantifikasyonu sağlar. Yazılım parçalanmış kompleks protein karışımlarının farklılaşmış ekspresyon analizini yapabilir ve tek bir örnek içerisindeki peptid iyonları baz alınarak protein karakterizasyonu için kullanılabilir.



Şekil 3.2. : Progenesis LC-MS/MS datası iş akışı şematik gösterimi(Gorman ve ark.)

4. BULGULAR

Proteomik analizler için Parkinson hastalarına ve kontrol grubuna ait serum örnekleri kullanıldı. Bu amaçla toplam 8 hasta ve 15 kontrol örneği kullanıldı. Hasta ve kontrollerin dağılımı çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. : Proteomiks analizlerinde kullanılan hasta ve kontrol örneklerinin dağılımı.

	Hasta	Kontrol
Örnek tipi	Serum	Serum
PH ile ilgili taşıdıkları mutasyon	Parkin	-----
Örnek sayısı	8	15
Cinsiyet	5 ♂, 3 ♀	8 ♂, 7 ♀
Yaş (ort.)	36.5	46.5

* MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) ve *de novo* sekanslama ile *Parkin* genindeki nokta mutasyonları belirlenen hasta örnekleri kullanıldı. PARK2 protein seviyesinde meydana gelen mutasyonlar, mRNA dizileri tahmin edilerek yapıldı.

4.1. LC-MS/MS sonuçları

LC-MS/MS analizi yapılan hasta grubu ve kontrol grubu örneklerinden protein ekstraksiyonu ardından FASP yöntemi kullanılarak triptik peptidler elde edildi. Bu peptidler, 100 ug/ml konsantrasyonda hazırlanarak ilk olarak nano akış sıvı kromatografisinde ayrıştırıldı. Ayrımın ardından MS ile peptidlerin kantitatif olarak ölçümleri yapıldı. MS/MS deneyleri ile de peptidler parçalanarak amino asit dizilimleri belirlendi. Serum örneklerinde tanımlanan protein sayısı 226 ve $p < 0.05$ olan protein sayısı 141 tanedir.

4.2. Progenesis QI for Proteomics ile protein kantifikasyonu

LC-MS/MS analiz dataları, Şekil 2.9. daki iş akışı uygulanarak istatistiksel olarak anlamlı olan proteinlerin kantifikasyonu, normalizasyonu ve belirlenmesi sağlandı. Parkinson hastalarında protein ekspresyonunda artış olan 51 protein ve ekspresyonunda azalma olan 46 protein tanımlandı. Proteinlerin erişim numaraları, isimleri, fonksiyonları, Uniprot protein data bankasından alındı. Maksimum kat değişikliği, hasta kişilerde meydana gelen ekspresyon farklılığındaki artış ve azalışı ifade etmektedir. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı T-test (student's two-sample t-test) uygulanarak gösterildi.

Çizelge 4.2. : *Progenesis QI for Proteomics* analizi sonucunda PH' da ekspresyonunda artış olan proteinler

*PH' da çok fazla ekspresyonu belirlendi.

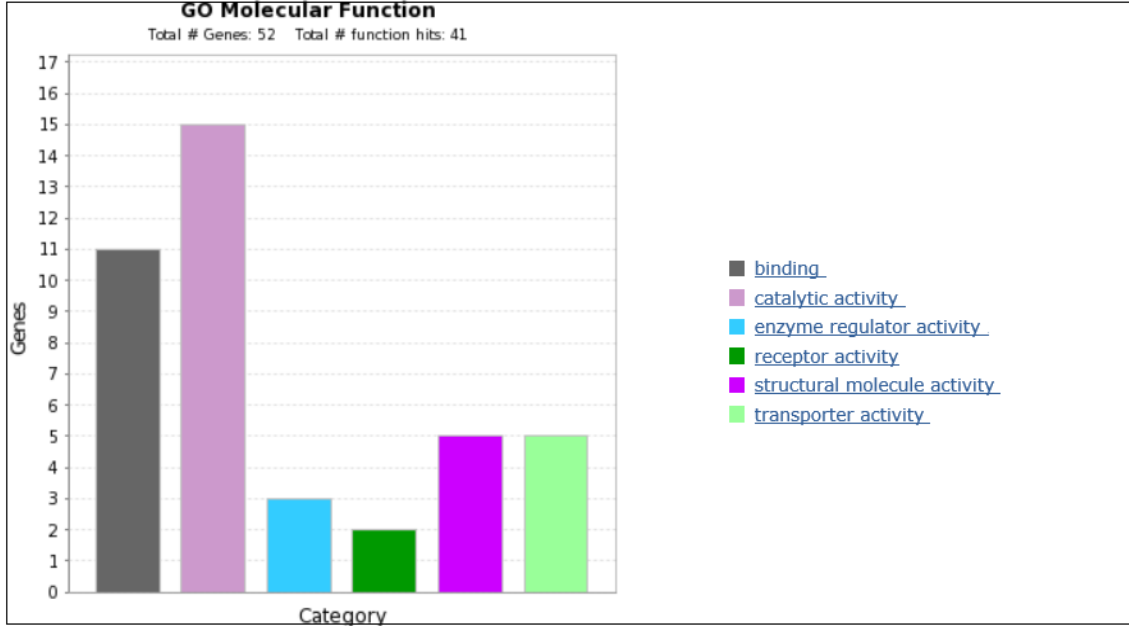
UniProt Protein Numaraları	Protein ismi	T test	Max kat değişikliği	Foksiyonları
P10909-2	Isoform 2 of Clusterin	4.35E-13	1.6	Yanlış katlanmış protein bağlanması, ubiquitin protein ligaz bağlanması
Q99848	Probable rRNA-processing protein	1.11E-12	Baskın*	Poly(A) RNA bağlanması
Q15195	Plasminogen-like protein A	1.26E-12	3.6	Plasminojenin yapısında bulunan lizin bağlanan proteinlere non-kovalent bir şekilde bağlanabilir
Q6ZMV9	Kinesin-like protein	7.84E-12	2.3	ATPaz aktivitesi ve bağlanmasında görevli, mikrotübül motor aktivitesi
Q9P2Q2	FERM domain-containing protein 4A	2.72E-10	11.7	İnsan epitel hücrelerde kutupların oluşmasında etkili
Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	5.45E-10	1.7	Peptidoglikan reseptör aktivitesi, peptidoglikan bağlanması, çinko iyon bağlanması, N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz aktivitesi
P18428	Lipopolysaccharide-binding protein	4.57E-08	1.9	Lipopolisakkarit bağlanması, reseptör bağlanması ve lipoteşikoik asit bağlanması
P07225	Vitamin K-dependent protein S	7.18E-08	1.7	Kalsiyum bağlanması ve endopeptidaz inhibitör aktivitesi
P00740-2	Isoform 2 of Coagulation factor IX	9.33E-08	1.8	Kalsiyum bağlanması ve serin-tip endopeptidaz aktivitesi, kandaki faktör 9 'un eksikliğinde hemofili B'yi oluşturur
P09871	Complement C1s subcomponent	9.74E-08	1.5	Kalsiyum ve aynı proteinlerin bağlanması, serin-tip endopeptidaz aktivitesi, eksikliğinde çeşitli immün sistem hastalıklarına yol açmaktadır (Dragon-Durey ve ark, 2001).
P02654	Apolipoprotein C-I	2.27E-07	2.0	Yağ asidi, fosfotidilkolin, fosfolipaz inhibitör, lipaz inhibitör bağlanması, fosfotidicolin-sterol O-açıltransferaz aktivator aktivitesi

P02655	Apolipoprotein C-II	2.39E-07	4.4	Lipaz inhibitör aktivitesi, lipoprotein lipaz aktivitesi, fosfolipaz ve lipit bağlanması, fosfolipaz aktivatör ve protein homodimerizasyon aktivitesi
P08185	Corticosteroid-binding globulin	4.17E-07	1.6	Serin-tip endopeptidaz inhibitör aktivitesi, steroid bağlanmasında görev almaktadır
O95433	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	1.05E-06	1.6	ATPaz aktivitesi ve şaperon bağlanmasında görevlidir
Q8IUR7-8	Isoform 8 of Armadillo repeat-containing protein 8	1.11E-06	21.9	İskeletin yapısına katılmaktadır (Tewari ve ark, 2010)
Q70J99	Protein unc-13 homolog D	1.81E-06	1.6	Lenfositlerde meydana gelen sitotik eksositozda rol oynamaktadır
P82970	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	2.90E-06	2.8	Kromatin bağlanması, poly(A) RNA bağlanması ve DNA bağlanmasında rol oynamaktadır
Q9P127	Leucine zipper protein 4	2.90E-06	33.5	
P00748	Coagulation factor XII	4.22E-06	1.5	Serin-tip endopeptidaz aktivitesi, serin-tip aminopeptidaz aktivitesi ve yanlış protein katlanmasında görev almaktadır.
P00734	Prothrombin	7.55E-06	1.5	Kalsiyum iyonu bağlanması, reseptör bağlanması, büyüme faktörü aktivitesi, serin-tip endopeptidaz aktivitesi, trombospondin reseptör aktivitesi
P02647	Apolipoprotein A-I	7.75E-06	2.7	APOA1 reseptör bağlanması, beta amiloid, kolesterol, enzim, fosfolipid bağlanması ve lipaz inhibitör aktivitesi, transport
Q13882	Protein-tyrosine kinase 6	7.82E-06	44.4	ATP bağlanması, protein serin/treonin kinaz aktivitesi, non-membran protein kinaz aktivitesi
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	9.16E-06	1.5	Endopeptidaz inhibitör aktivitesi, serin-tip endopeptidaz inhibitör aktivitesi
Q8IVL1-5	Isoform 5 of Neuron navigator 2	1.05E-05	4.8	ATP bağlanması, helikaz aktivitesi ve heparin bağlanması
Q96K76	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	1.65E-05	1.5	Ubikitin-spesifik proteaz aktivitesi, WD40 domain bağlanması

Q05BV3	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5	6.37E-05	1.4	Katalitik aktivite
Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31	6.54E-05	1.5	Ubikitin-spesifik proteaz aktivitesi
Q68DA7	Formin-1	7.29E-05	2.3	Aktin bağlanması
P06681	Complement C2	7.73E-05	1.5	Metal-iyon bağlanması, serin-tip endopeptidaz aktivite
P02649	Apolipoprotein E	9.61E-05	1.6	Antioksidan aktivite, beta amiloid bağlanması, lipid, lipoprotein ve fosfolipid bağlanması, tau protein bağlanması, protein homodimerizasyon aktivitesi...
Q9Y4F4	Protein FAM179B	9.66E-05	2.4	Yapısal molekül aktivitesi
P02743	Serum amyloid P-component	0.0001143	1.5	Kalsiyum iyon bağlanması, virion bağlanması, katlanmamış proteinlerin bağlanmasında, karbonhidrat ve komplement komponent C1q bağlanmasında
Q5T442	Gap junction gamma-2 protein	0.00021108	5.9	Gap junction kanal aktivitesi
Q9H2R5-4	Isoform 4 of Kallikrein-15	0.00037796	1.5	Serin-tip endopeptidaz aktivitesi, serin-tip peptidaz aktivitesi
P02775	Platelet basic protein	0.00048172	1.6	Glukoz- transmembran transporter aktivitesi
Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	0.00069882	2.1	DNA bağlanması, poly (A) bağlanması, çinko iyon bağlanması, RNA polimeraz II bağlanması
P02656	Apolipoprotein C-III	0.00096413	1.8	Kolesterol bağlanması, enzim düzenleme aktivitesi, lipaz inhibitör aktivitesi, fosfolipit bağlanması, yüksek yoğunluktaki lipoprotein partiküllerine reseptör bağlanması
Q9C0C2	182 kDa tankyrase-1-binding protein	0.00180089	1.7	Ankirin bağlanması
P55056	Apolipoprotein C-IV	0.00337219	1.6	Lipit- transporter aktivitesi
A4GCJ1	Nuclear export protein	0.00372655	2.3	RNA taşınması, viral süreç
A8MTZ0-4	Isoform 4 of BBSome-interacting protein 1	0.00457002	1.5	Protein transport ve tüylerin biraraya gelmesi
Q15848	Adiponectin	0.00719736	1.5	Sitokin aktivitesi, reseptör bağlanması, hormon aktivitesi, protein homodimerizasyon aktivitesi, sialik asit bağlanması
Q9H2J7	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2	0.01004746	2.0	Nörotransmitter transporter aktivitesi
P42025	Beta-centractin	0.0114849	3.1	ATP bağlanması

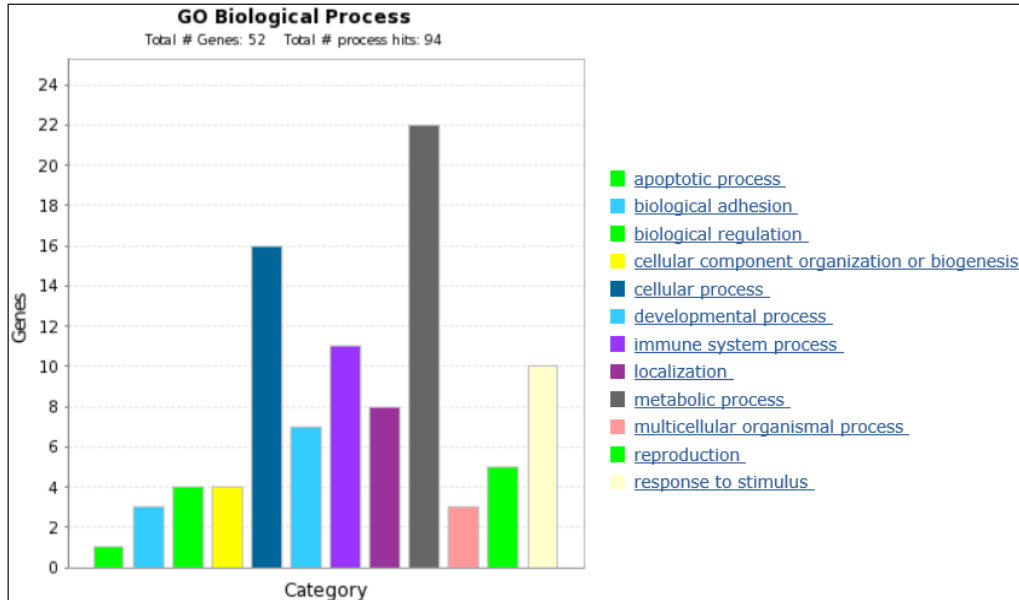
O75665-3	Isoform 3 of Oral-facial-digital syndrome 1 protein	0.01245913	2.3	Alfa-tübülün ve gama-tübülün bağlanması
Q6XUX3	Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase	0.01804612	1.5	ATP bağlanması, protein serin/ treonin/ tirozin kinaz aktivitesi, protein tirozin aktivitesi ve protein serin/ treonin kinaz aktivitesi
Q6ZVQ6	Putative uncharacterized protein FLJ42213	0.02314629	2.1	
P40197	Platelet glycoprotein V	0.02356671	2.2	Hücre düzeyinde fonksiyonları tam olarak belirlenememesine karşın biyolojik düzeyde hücre adezyonu, homostasi ve kan regülasyonunda görevli
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.02387836	1.4	Fosfolipid bağlanması, kalsiyum iyonu bağlanması, protein homodimerizasyon aktivitesi, arildialkilfosfotaz ve arilesteraz aktivitesi
Q8TDM6	Disks large homolog 5	0.04292653	1.6	Beta-katenin bağlanması, hücre iskeleti protein bağlanması, reseptör sinyali kompleks scaffold aktivitesi
Q96G23	Ceramide synthase 2	0.04523237	2.3	DNA bağlanması, spingozin N-açiltransferaz aktivitesi

Progenesis QI for Proteomics ile yapılan analiz sonrasında, ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı olan ekspresyonu fazla olan 51 proteinin moleküler fonksiyonları (Şekil 4.1.), biyolojik süreçlerde nasıl rol oynadıkları (Şekil 4.2.), hücresel bileşenleri (Şekil 4.3.) hakkında bilgi edinmek için Panther sınıflama sistemi kullanıldı. Q15195, A4GCJ1, A8MTZ0, O75665, Q6ZVQ6 numaralarına sahip proteinler, Panther veri bankasında bulunmadı.



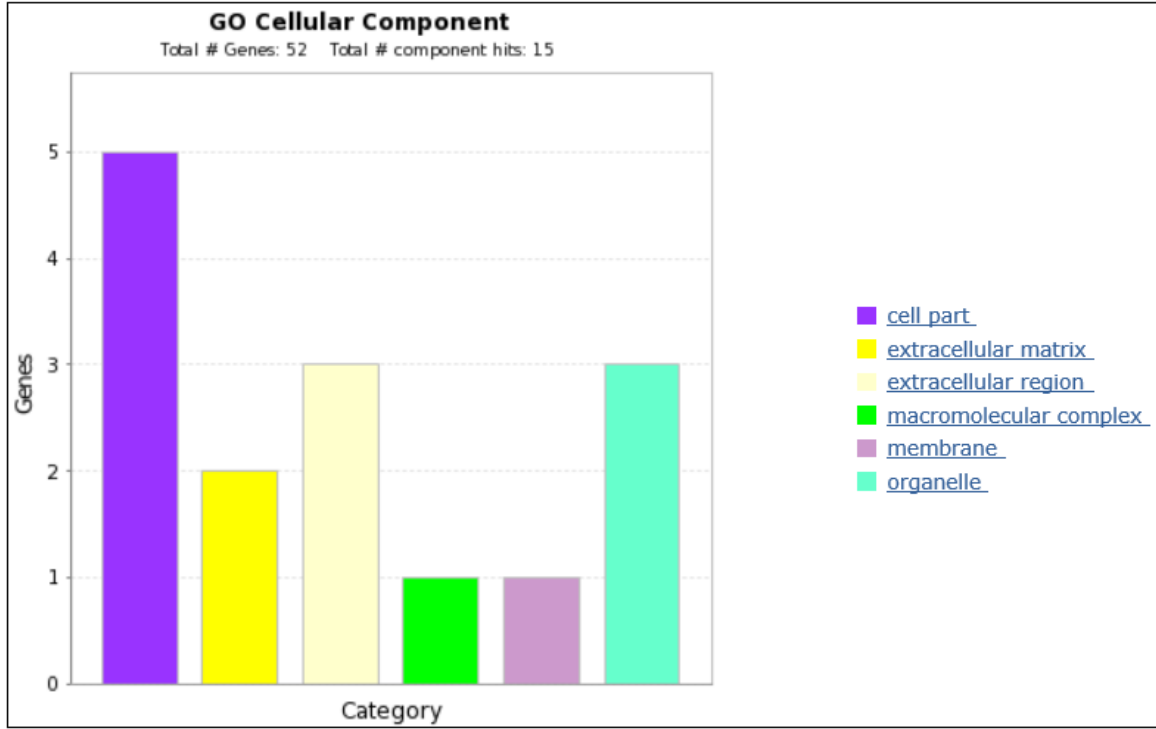
Şekil 4.1. : PH' da ekspresyonunda artış olan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.

Proteinler moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırıldığında, 41 proteinin fonksiyonu hakkında bilgi edinildi. En fazla protein sayısı katalitik aktivitede gözlemlendi. Alt sınıflarına bakıldığında bunların, enzim regülatör aktivitesi, hidrolaz aktivitesi, ligaz aktivitesi ve transferaz aktivitesinde görevli olduğu bulundu. En az protein sayısı ise taşıyıcı aktivitesinde gözlemlendi.



Şekil 4.2. : PH' da ekspresyonunda artış olan proteinlerin biyolojik sınıflarına göre sınıflandırılması

Proteinler biyolojik sınıflarına göre sınıflandırıldığında en fazla protein sayısı metabolik süreçte gözlemlenirken; en az protein sayısı apoptotik süreçte gözlemlendi.



Şekil 4.3. : PH’ da ekspresyonunda artış olan proteinlerin hücresel içeriklerine göre dağılımı.

Proteinler hücresel içeriklerine göre sınıflandırıldığında, en fazla protein sayısı plazma membranı ve hücre içi kategorisindeyken; en az protein sayısı membran ve organel kategorisinde bulundu.

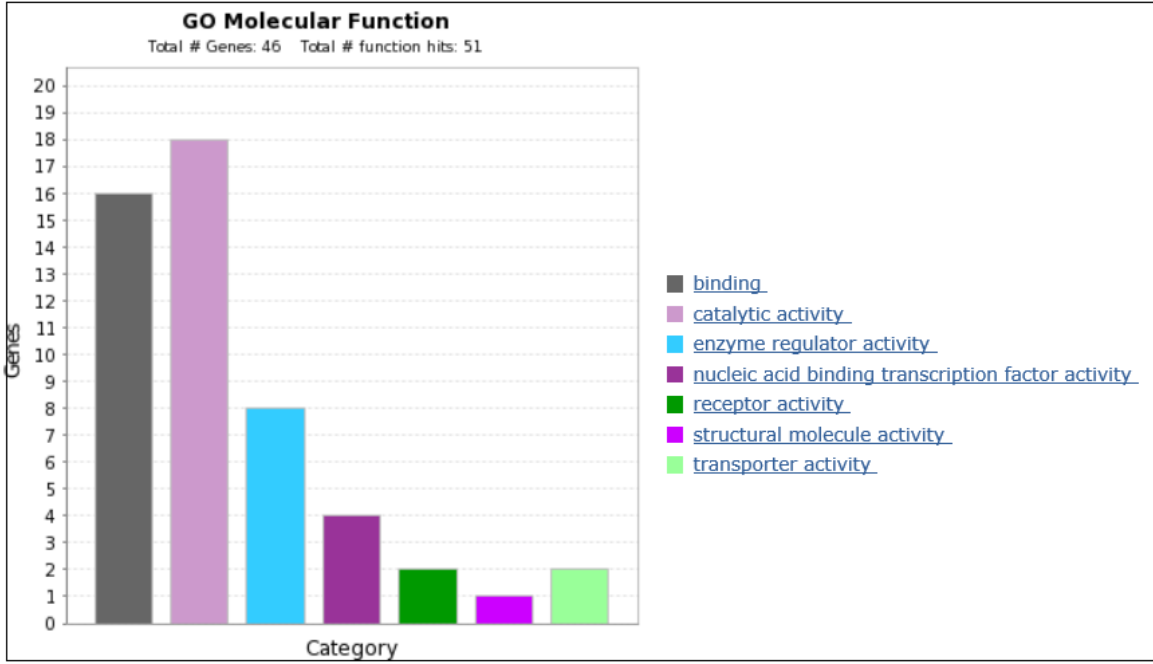
Parkinson hastalarında, ekspresyonu azalan istatistiksel olarak anlamlı 46 protein tanımlandı. Proteinlerin erişim numaraları, isimleri, fonksiyonları Uniprot protein data bankasından alındı. Proteinin moleküler fonksiyonları (Şekil 4.4), biyolojik süreçlerde nasıl rol oynadıkları (Şekil 4.5.), hücresel bileşenleri (Şekil 4.6.) hakkında bilgi edinmek için Panther sınıflama sistemi kullanıldı. P20848, Q9PZT0, Q14153, Q83885, Q6V1Q9, Q5TCX8 numaralarına sahip proteinler panther veri bankasında bulunmadı.

Çizelge 4.3. : *Progenesis QI for Proteomics* analizi sonucunda PH' da ekspresyonunda azalma olan proteinler.

UniProt Protein Numaralar 1	Protein İsimleri	t- testi	Max. Kat değişikliği	Foksiyonları
Q9Y3D0	Mitotic spindle-associated MMXD complex subunit MIP	4.5186E-14	Baskın*	Kromozomların ayrılmasında ve küçük moleküllerin metabolik sürecinde görevlidir
P20848	Putative alpha-1-antitrypsin-related protein	1.676E-11	11.1	Serin kökenli endoproteazların inhibitör aktivitesinde görevlidir
P01024	Complement C3	1.0826E-10	3.1	Komplement alternatif yolağı, komplement yolağı, yağ asidi metabolizması, bağışıklık, inflamatuvar cevap, lipid metabolizması
Q9BYV7-6	Isoform 6 of Beta,beta-carotene 9',10'-oxygenase	1.9319E-10	4.2	Oksidoreduktaz aktivitesi ve metal iyon bağlanmasında rol oynamaktadır
P04003	C4b-binding protein alpha chain	2.7352E-10	2.2	Poly(A) RNA binding
Q6P1L5	Protein FAM117B	7.5051E-09	2.7	
P02760	Protein AMBP	1.1106E-08	2.6	Serin kökenli endopeptidazların inhibitör aktivitesi,kalsiyum oksalat bağlanması(referans), IgA ve küçük molekül ve hemin bağlanması, kalsiyum kanalında inhibitör etkisi. Tripsin inhibisyonunda görevlidir.
O15091	Mitochondrial ribonuclease P protein 3	5.5157E-08	2.5	Mitokonriyal t-rna nın olgunlaşması (Holzman et al,2008)
P03952	Plasma kallikrein	5.7133E-08	1.6	Serin kökenli endopeptidazların aktivitesi, Arg ve Lys'den bağlarını kırarak katalitik aktivite göstermektedir
Q6IN85-2	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	1.5376E-07	1.8	Glukoneogenezin düzenlenmesinde ve protein defosforilasyonunda etkili
Q9PZT0-2	Isoform VP2 of Capsid protein VP1	1.5867E-07	1.7	Metal iyon bağlama, yapısal molekül aktivitesi
Q99666	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6	2.7185E-07	3.1	Golgiye protein hedefleme
Q96IY4	Carboxypeptidase B2	4.3396E-07	2.4	Metallokarboksipeptidaz aktvitesi, çinko iyonu bağlanması
P02751-4	Isoform 4 of Fibronectin	1.104E-06	12.3	Kollajen bağlama, integrin bağlama, proteaz bağlama, heparin bağlanma ve peptidaz aktivatör aktivitesi

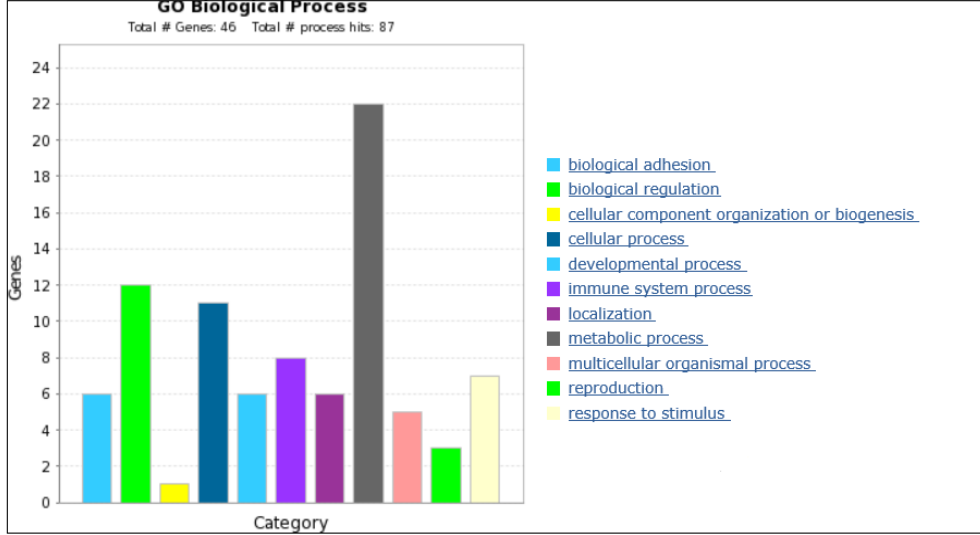
P02753	Retinol-binding protein 4	1.8016E-06	1.5	Retinaya bağlanma ve transporter aktivitesi
Q9Y639-3	Isoform 3 of Neuroplastin	4.3502E-06	1.9	Hücre adezyon moleküllerinin ve tip 1 fibroblast büyüme faktörü reseptörünün bağlanması
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	6.6438E-06	1.8	Sistin endopeptidaz aktivitesi ve kinaz inhibitör aktivitesi
Q9UGM5	Fetuin-B	7.108E-06	1.9	Sistin endopeptidaz inhibitör aktivitesi ve metallopeptidaz inhibitör aktivitesi
Q9H8G1	Zinc finger protein 430	9.1383E-06	2.4	Transkripsiyonel düzenlemede, metal iyon ve DNA bağlanması
P43251-2	Isoform 2 of Biotinidase	1.3645E-05	1.6	Biyotin karboksilaz ve biyotidinaz aktivitesinde etkili
P43652	Afamin	1.5861E-05	1.4	Vitamin E bağlanması, oksidatif strese karşı nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir
Q8N573	Oxidation resistance protein 1	1.6586E-05	3.6	oksidatif hasardan koruduğu düşünülmekte (Volkert et al 2000; Elliott and Volkert, 2004)
P19224	UDP-glucuronosyltransferase 1-6	1.7906E-05	1.5	Enzimlerin bağlanması, heterodimerizasyon aktivitesi, protein homodimerizasyon aktivitesi, glukuronosiltransferaz aktivitesi
Q9BQS8	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	1.8013E-05	2.0	Metal iyon bağlanması
Q96NU0	Contactin-associated protein-like 3B	1.9724E-05	1.9	Hücre adezyonunda görevli
Q9NUA8	Zinc finger and BTB domain-containing protein 40	2.2088E-05	1.7	Transkripsiyonel düzenlemede, metal iyon ve DNA bağlanması
P02774	Vitamin D-binding protein	3.4689E-05	1.5	Aktin, vitamin D, kalkidiol bağlanması ve vitamin transporter aktivitesinde görevli
P20742	Pregnancy zone protein	4.8817E-05	1.6	Endopeptidaz inhibitör aktivitesi ve serin-tip endopeptidaz inhibitör aktivitesi
Q14153	Protein FAM53B	5.8399E-05	2.8	Vertabratelardaki homologu olan Simplex gene(smp) embriyogenezde MSS hücrelerin çoğalmasında rol oynadığı bulunmuş(Thermes ve ark, 2006).
Q14161	GTPase-activating protein GIT2	6.3651E-05	3.1	Çinko iyon bağlanmasında ve ARF GTPaz aktivatör aktivitesinde
Q5SSQ6	Suppressor APC domain-containing protein 1	0.00010355	1.5	
Q9Y510	Protocadherin alpha-13	0.00023984	1.5	Kalsiyum iyon bağlanmasında rol oynamakta

Q5TEU4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 5	0.00053989	1.5	Metiltransferaz aktivitesi (Sugiana ve ark, 2008)
P31270	Homeobox protein Hox-A11	0.00081489	1.6	Sekans-spesifik DNA bağlanması
Q86WC6	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 27	0.00082396	5.9	Fosfotaz bağlanması ve protein fosfotaz inhibitör aktivitesi (Hendrickx ve ark, 2008)
P06276	Cholinesterase	0.0009403	1.4	Asetilkolinesteraz,katalitik,kolinesteraz,identikal protein, beta amiloid , kolin ve enzim bağlamada rol oynamaktadır
Q01484-2	Isoform 2 of Ankyrin-2	0.00102262	1.8	ATPaz bağlama,iyon kanalı,protein,spektrin,enzim,protein kinaz bağlanmasında ve potasyum kanalı regulator aktivitesi,iskeletin yapısında görev almaktadır.
Q83885	Protein VP2	0.00128924	1.8	Virionların parçalanması ve degrades olmasını engelleyen, RNA genom paketlenmesinde rol oynayabilir (Bertoletti-Ciarlet ve ark, 2003)
Q6V1Q9	Polymerase cofactor VP35	0.00161599	1.5	RNA bağlanmasında etkili
Q86W92-2	Isoform 2 of Liprin-beta-1	0.00294553	1.4	Fokal adezyonların parçalanmasını düzenler
Q5TCX8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4	0.00535341	1.5	ATP bağlanması, protein homodimerizasyon aktivitesi, protein tirozin kinaz aktivitesi, MAP kinaz aktivitesi
Q9Y2Z9-3	Isoform 3 of Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	0.00777439	1.7	Flavin adenin dinukleotid bağlanması, oksidoreduktaz aktivitesi
Q49A88-3	Isoform 3 of Coiled-coil domain-containing protein 14	0.01015389	1.6	Substantia nigranın gelişimde rol oynar
P10070	Zinc finger protein GLI2	0.01856623	1.5	Kromatin bağlanması, çinko iyon bağlanması, sekansa-spesifik DNA bağlanması ve transkripsiyon faktör aktivitesi, transkripsiyon düzenleyici bölge DNA bağlanması
Q5VZM2	Ras-related GTP-binding protein B	0.03002407	1.5	GTP bağlanması ve guanil ribonükleotid bağlanması
P00738	Haptoglobin	0.03617954	1.7	Antioksidant aktivitesi, hemoglobin bağlanması, serin-tip endopeptidaz aktivitesi



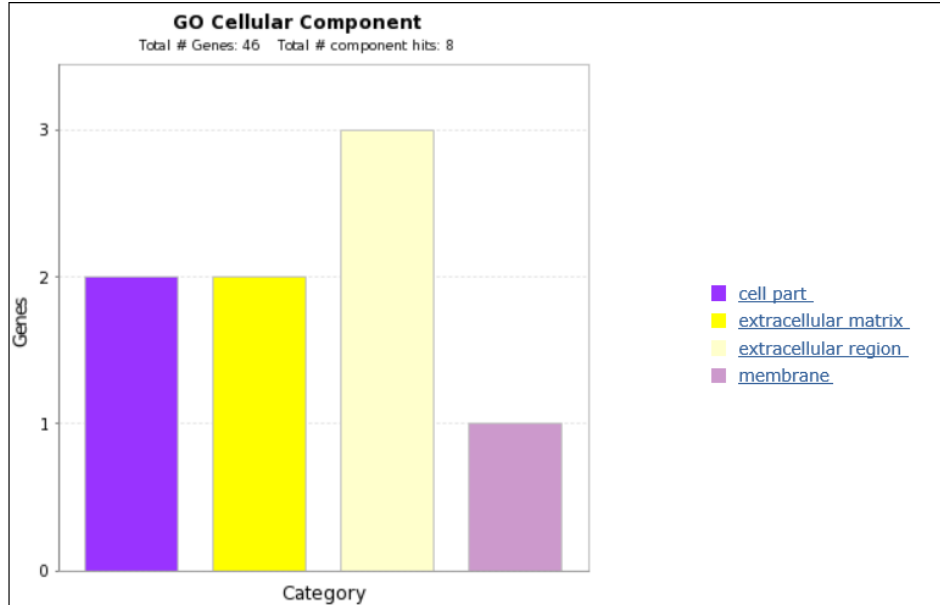
Şekil 4.4. : PH' da ekspresyonunda azalış olan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.

Proteinler moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırıldığında en fazla protein sayısı ekspresyonu artan proteinlerde de olduğu gibi katalitik aktivitede gözlemlendi. Alt sınıflarına bakıldığında bunların, enzim regülatör aktivitesi, hidrolaz aktivitesi, oksidoredüktaz aktivitesi ve transferaz aktivitesinde görevli olduğu bulundu. En az protein sayısı yapısal molekül kategorisinde gözlemlendi. Ekspresyonu az olan proteinlerde, nükleik asit bağlayan transkripsiyon faktör aktivitesi ekspresyonu artan proteinlere göre farklı olarak ortaya çıktığı bulundu.



Şekil 4.5. : PH' da ekspresyonunda azalış olan proteinlerin biyolojik sınıflarına göre sınıflandırılması.

Proteinler biyolojik sınıflarına göre sınıflandırıldığında, en fazla protein sayısı, ekspresyonu artan proteinlerdeki gibi, metabolik süreçte gözlenirken; en az protein sayısı hücrel organizasyon ya da biyogenezde gözlemlendi.



Şekil 4.6. : PH' da ekspresyonunda azalış olan proteinlerin hücrel içeriklerine göre dağılımı

Proteinler hücrel içeriklerine göre sınıflandırıldığında, en fazla protein sayısı, hücre dışı matriks kategorisindeyken; en az protein sayısı membran bulundu. Makromoleküler kompleks ve membranın yapısına katılan protein kategorileri, ekspresyonu azalan grupta çıkmadı.

4.3. IMPaLA yolak analizi

IMPaLA, gene ekspresyonu ya da protein miktarı ve metabolomik yolak analizi için geliştirilen bir metottur. Metot, temsili yolak veya Wilconx zenginleştirme analizini kullanarak çalışır. Temsil üzerine analiz çeşidinde, max. kat değişikliği 1.4 ve $p < 0.05$ olmak üzere filtrelenerek, data IMPaLA'ya yüklendi. Çizelge 4.4.'te verilen p değerleri, daha önceden tanımlanan ayarlarla, bizim yüklediğimiz listenin ne kadar örtüştüğünü göstermektedir.

Çizelge 4.4. : Temsili yolak analizi

Yolak ismi	Yolak kaynağı	Çaşıyan genlerin sayısı	Çaşıyan genlerin UniProt isimleri	Yolakta bulunan bütün genler	p değeri	q değeri
Lipoprotein metabolism	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	30 (30)	6.65E-06	0.00174
Complement cascade	Reactome	5	P04003;P07225;P09871;P06681;P01024	57 (80)	3.55E-06	0.001
Regulation of Complement cascade	Reactome	4	P04003;P07225;P06681;P01024	23 (23)	2.20E-06	0.00067
intrinsic prothrombin activation pathway	BioCarta	4	P00748;P03952;P00734;P07225	23 (23)	2.20E-06	0.00067
Retinoid metabolism and transport	Reactome	5	P02655;P02656;P02649;P02753;P02647	42 (42)	7.55E-07	0.00028
Intrinsic Pathway	Reactome	4	P00748;P03952;P00734;P40197	17 (17)	6.01E-07	0.00024
Chylomicron-mediated lipid transport	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	17 (17)	6.01E-07	0.00024
HDL-mediated lipid transport	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	15 (15)	3.47E-07	0.00018
Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade)	Reactome	5	P00748;P03952;P00734;P40197;P07225	32 (32)	1.84E-07	0.00011
Statin Pathway	Wikipathways	5	P02655;P02656;P02649;P02654;P02647	29 (31)	1.10E-07	8.03E-05
Statin Pathway_ Pharmacodynamics	PharmGKB	5	P02655;P02656;P02649;P02654;P02647	25 (25)	4.97E-08	4.54E-05

Temsil üzerine yapılan analiz sonucunda etiketleri oluşturularak filtrenen proteinlerin, 281 farklı yolakta görevli olduğu bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı sayılması için $p < 0.05$ alındığında, 97 farklı yolak elde edildi. Çizelge 4.4.' te, protein yolaklarının isimleri, hangi yolak kaynağının kullanıldığı, daha önceki data bankalarında bu yolakta kaç tane genin etkili olduğu ve bunlardan hangilerinin bizim datamızda çıktığını p ve q değerleri gösterilmiştir.

Wilconx zenginleştirme analizinde, etiketler kaldırılarak Progenesis programından proteinler excel dosyası halinde alındı. Genellikle genom gen ifadesini ya da iki farklı fenotipleri proteom çapında bir protein bolluğu yansıtmaktadır. Wilcoxon testi fenotip arasındaki fonksiyonel set genlerin kombine ölçüm farklılıklarının tesadüfen ortaya çıkma ihtimallerini baz alarak p değerlerini hesaplıyor.

Çizelge 4.5. : Wilconx zenginleştirme analizi

Yolak ismi	Yolak kaynağı	Çaışan genlerin sayısı	Çaışan genlerin UniProt isimleri	Yolakta bulunan bütün genler	p değeri	q değeri
classical complement pathway	BioCarta	14	P02745;P02746;P02747;P00736;P09871;P06681;P01024;P01031;P13671;P10643;P07357;P07358;P07360;P02748	14	0.0426	1
Vitamin B12 Metabolism	Wikipathways	9	P00734;P02649;P01011;P02647;P35542;P02768;P69905;P00747;P68871	51	0.0207	1
Disease	Reactome	13	P02743;P06733;P51884;P02766;P02647;P02652;P06727;P02655;P02656;Q9Y561;P02649;P02753;Q8NDV7	962	0.0192	1
Prion diseases - Homo sapiens (human)	KEGG	10	P02745;P02746;P02747;P01031;P13671;P10643;P07357;P07358;P07360;P02748	36	0.0176	1
Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	Reactome	13	P07996;P02775;P01023;P02671;P05155;P08697;P04196;P02647;P01009;P01042;P02768;P07225;P00747	87	0.0175	1
Platelet degranulation	Reactome	13	P08697;P01023;P02671;P05155;P01009;P04196;P02647;P07996;P01042;P02768;P02775;P07225;P00747	82	0.0175	1
Statin Pathway	Wikipathways	7	P02647;P02652;P06727;P02654;P02655;P02656;P02649	31	0.0156	1
Lipid digestion_ mobilization_ and transport	Reactome	8	P01023;P02647;P02652;P06727;P02768;P02655;P02656;P02649	50	0.00781	1
Lipoprotein metabolism	Reactome	8	P01023;P02647;P02652;P06727;P02768;P02655;P02656;P02649	30	0.00781	1
Platelet activation_ signaling and aggregation	Reactome	15	P08697;P01023;P02671;P05155;P07996;P04196;P02647;P01009;P00734;P02768;P02775;P01042;P07225;P00747;P40197	208	0.00587	1

Parkinson hastalığının moleküler mekanizmasında çok farklı yolaklar sürece dahil olduğu için çizelge 4.5' te özet olarak verilmiştir. Yolak analizleri ve ekspresyon sonuçları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı olan lipoprotein

metabolizması seçildi. Literatürde daha önce PH ile ilişkili olduğu bilinen bulunmuş görevli 30 proteinden ApoE, serum albumin, Apo A2, Apo A4, Apo C2, Apo C3, alfa-2 makroglobulin, Apo A1 proteinleri, yolak analizi sonucu PH' da bulundu. İstatiksel olarak, bu çalışma kapsamında anlamlı proteinler ise ApoE, Apo C2, Apo C3 ve Apo A1' dir. Apo C3 proteini için literatürde PH ekspresyonunda meydana gelen herhangi bir değişiklik bulgusuna rastlanmazken, bu çalışma kapsamında ekspresyonunda değişiklik olduğu bulundu.

5. TARTIŞMA

İleri teknoloji proteomik cihazlarının, proteinleri doğru tanımlayabilmesi için protein ekstraksiyon aşaması önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında, polipropilen selüloz asetatlı spin filtre yardımıyla serum örneklerinden, düşük santrifüj hızında, partiküllerin uzaklaştırılması sağlandı. Dinamik aralığı dengelemek, serum proteomunda olası biyomarkerları bulabilmek ve serumda çok fazla miktarda bulunan proteinlerden albümin, IgG, antitripsin, IgA' yı uzaklaştırmak için RP-HPLC kullanıldı. Böylelikle, kompleksitesi azalan ve de fraksiyonlara ayrılan serum proteomik çalışmalar için uygun hale getirildi. MS analizinde proteinlerin triptik peptid haline getirilmesi için FASP metodu uygulandı. FASP metodu, 30 MVCO filtre yardımıyla, düşük moleküler ağırlıktaki moleküllerin üre içeren tampon aracılığıyla uzaklaştırılması, tiollerin karboamidometilasyonu, proteinlerin triptik parçalara ayrılması ve peptidlerin elusyon aşamalarını içermektedir (Wisniewski ve ark., 2009). Analiz sonrasında peptidlerin tanımlanabilmesi, tripsin enziminin doğru çalışabilmesine, dolayısıyla proteinlerin olabildiğince saf ekstrakte edilmelerine bağlıdır. LC-MS/MS (SYNAPT-HDMS) çalışmalarında, kolona örnek başına 500 ng triptik peptid karışımı enjekte edilmesi yeterli olmaktadır. Çalışma kapsamında uygulanan proteomik tekniği, “*shotgun proteomics*” ya da “*bottom-up proteomics*” olarak adlandırılan ve hücrelerden proteinlerin ekstraksiyonu, ardından tripsin enzimiyle parçalanıp elde edilen triptik peptitlerin ters faz kromatografisinde ayrıştırılmaları ve ayrıştırılan peptitlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için MS ve MS/MS deneylerinin gerçekleştirilmesini içermektedir. Bu aşamada uygulanabilecek iki yaklaşım vardır. Birincisi, “*Data Dependent Acquisition*” olarak adlandırılan ve peptidin yükü ile büyüklüğüne göre uygulanan çarpıştırma enerjisi ile sekans bilgisi elde edilmesidir. İkincisi ve bizim bu çalışmada kullandığımız yöntem, ‘*Data Independent Acquisition*’ çeşidi olan ve ‘ MS^E ’ olarak adlandırılır. Bu yöntemde, bütün peptitlerin önce düşük çarpıştırma enerjisinde, m/z (kütle/yük) değerleri ölçülür ve ardından enerji zamanla artırılarak, peptidin b ve y iyonu fragmanlarına parçalanıp sekans bilgisi elde edilmiştir. MS^E yöntemi ile sonuçta, her bir peptid için daha fazla b ve y iyonu elde edilmektedir ve bu iyonların fazlalığı sekans bilgisinin daha doğru olması anlamına gelmektedir (Baykal, 2011). MS^E yöntemi, kantitatif proteomik çalışmalarda çok sayıdaki protein kantifikasyonu için uygundur ve “*data dependent acquisition*” ile karşılaştırıldığında peptid karşısındaki tüm precursor’ lerin fragment iyonlarını gerektirdiği için, tekrar edilebilirliği ve kantifikasyon limiti daha iyidir.

LC-MS/MS yönteminde, protein ekstraksiyonu sonrasında elde edilen triptik peptitlerin tekrar edilebilir şekilde ayrıştırılması için nano sıvı kromatografisi kullanılarak, 90 dakikalık %3-35 ACN gradienti oluşturuldu. Her bir kromatografik pikin tanımlanması için 0.2 dk pik kalınlığı belirlenmiştir. MS deneylerinde, minimum 9000 TOF rezolüsyonu seçilmiştir. Sıcaklık ve nem, kütle spektrometresini etkileyen ana etmen olduklarından, oda ısısı 19°C olarak muhafaza edildi ve odadaki nem oranı mümkün olduğu kadar minimum seviyede tutuldu. Kütle spektrometresinde kromatogram analizi için sistemin kontrolü her 45 sn'de bir dahili kütle kalibrantı olarak 'Glu fibrino peptide b' infüze edilerek yapıldı. 'Glu fibrino peptide b' çift yüklü ve m/z değeri 785,8426 infüze edilerek yapıldı.

Proteinlerin kantifikasyonunun belirlenmesi için *Progenesis Q1 for Proteomics* yazılımı kullanıldı. Protein tanımlamaları için, Uniprot.org sitesinden "*Homo Sapiens Reviewed*" protein veribankası kullanıldı. Kullandığımız veri bankası 20.193 protein için sekans bilgisini içermektedir. LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen ham data, yazılıma yüklendi ve data boyutları azaltılarak pik modellemesi yapıldı. Deney sırasında meydana gelen tekniksel varyasyonları azaltmak ve validasyonu sağlamak için, alıkonma zamanları hizalanarak dataların toplanması sağlandı. Bu aşama peptidlerin belirlenmesine olanak verdi ve kantifikasyonu yapıldı. Çalışma kapsamında maximum kat değişikliği >1.4 ve $p < 0.05$ değerleri için protein ekspresyonu artan olan 51 protein ve protein ekspresyonu azalan olan 46 protein istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kantifikasyonu sağlanan proteinler, PH'nda ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda biyomarker olarak kullanılabilirliği ile değerlendirildi.

Parkinson hastalarında ekspresyonu artan proteinlerden, Clusterin Isoform 2 proteini yanlış katlanmış protein bağlanması, ubiquitin protein ligaz bağlanmasında görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.6 olarak bulunmuştur. Alzheimer hastalığının inflamutaur sürecinde etkili olan proteinin potansiyel biyomarker olabileceği söylenmektedir (Won ve ark, 2014). Parkinson hastalığı patogenezinde clusterin proteinin önemli olabileceğini hem serum hem de beyin omurilik sıvısında belirlenebildiğini ancak çelişen dataların olduğu literatürde bulunmaktadır (Van Dijk ve ark., 2013). Kinesin-like proteini, ATPaz aktivitesi ve bağlanmasında ve mikrotübül motor aktivitesinde görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 2.3 olarak bulunmuştur. Bu proteinin, 719Arg polimorfizmini taşıyanlar Alzheimer ve kolesterol arasındaki ilişkiyi tanımlamada gelecek çalışmalar için önem taşımaktadır (Sabbagh ve ark,2013). FERM domain-içeren protein 4A, insan epitel hücrelerinde kutupların oluşmasında görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 11.7 olarak bulunmuştur. PH için literatürde bahsedilmemiş olsa da Alzheimer hastalığı için yeni bir genetik risk

faktörü olduğu bulunmuştur (Lambert ve ark, 2012). Apolipoprotein C-I yağ asidi, fosfotidilkolin, fosfolipaz inhibitör, lipaz inhibitör bağlanması, fosfotidikolin-sterol O-açıltransferaz aktivator aktivitesinde görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 2.0 olarak bulunmuştur. Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Petit ve ark, 2001). Apolipoprotein C-II lipaz inhibitör aktivitesi, lipoprotein lipaz aktivitesi, fosfolipaz ve lipit bağlanması, fosfolipaz aktivator ve protein homodimerizasyon aktivitesi görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 4.4 olarak bulunmuştur. Parkinson hastası ve spinoserebellar dejenerasyona sahip bayanlarda Apo CII seviyesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Ikeda ve ark., 1993). Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1, ATPaz aktivitesi ve şaperon bağlanmasında görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.6 olarak bulunmuştur. PH model sıçanlarda, elektroakupunktur ile fosforillenmiş p38-MAPK inhibe olduğu, bunun ardından da PH model sıçanda dopaminerjik nöronların kaybı azaldığı gözlenmiştir (Wang ve ark, 2013). Alzheimer hastalarında fosforillenmiş p38 proteinin arttığı bulunmuştur (Hensley ve ark, 1999). Prothrombin kalsiyum iyonu bağlanması, reseptör bağlanması, büyüme faktörü aktivitesi, serin-tip endopeptidaz aktivitesi, trombospondin reseptör aktivitesi görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.5 olarak bulunmuştur. Prothrombin ve proteolitik yıkımı sonrasında oluşan thrombin nörofibriler tanglelarda birikmesi, thrombinin tau proteolizisinde dahil olabileceğini ve nörodejeneratif hastalıklarda birikmesine yol açabileceği söylenmektedir (Arai ve ark, 2006). Apolipoprotein A-I, APOA1 reseptör bağlanması, beta amiloid, kolesterol, enzim, fosfolipid bağlanması ve lipaz inhibitör aktivitesi, transportta görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 2.7 olarak bulunmuştur. Yolak analizi ve progenesis sonuçları karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda hasta grupta lipit metabolizmasında görevli olduğu gözlenmiş ancak literatürle karşılaştırıldığında PH, AH dahil çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ve Down sendromlu gut hastalığına sahip kişilerde ApoA1 proteinin seviyesinin hem serumda hem de beyin omurilik sıvısında azaldığı bulunmuştur. Dolayısıyla gelecekte, ApoA1 proteinin nörodejeneratif hastalıklar için hem tıbbi hem de teşhis belirteci olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir (Keeney ve ark, 2013). Ubikitin karboksil-terminal hidrolaz 31, ubikitin-spesifik proteaz aktivitesinde görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 2.7 olarak bulunmuştur. Otozomal resesif olarak kalıtılan ve PH ile ilişkili PARK6 bölgesinde bu protein saptanmıştır (Lochart ve ark, 2004). Apolipoprotein E, antioksidan aktivite, beta amiloid bağlanması, lipid, lipoprotein ve fosfolipid bağlanması, tau protein bağlanması, protein homodimerizasyon aktivitesinde ve lipoprotein metabolizmasında görevlidir. PH' da max kat değişikliği 1.6 olarak

bulunmuştur. PH patogenezinde, lipit metabolizmasındaki değişimler üzerinde etkili olduğu bulunmuş ve alfa-sinüklein depolanmasında görev aldığı düşünülmektedir (Wilhelmus ve ark, 2011). APOE proteinin $\epsilon 4$ polimorfik allelini taşıyan bireylerde, AH riskini artırırken; $\epsilon 2$ allelini taşıyan bireylerde, AH riskini azalttığı düşünülmektedir (Liu ve ark, 2013). Serum amyloid P-component kalsiyum iyon bağlanması, virion bağlanması, katlanmamış proteinlerin bağlanmasında, karbonhidrat ve komplement komponent C1q bağlanmasında görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.5 olarak bulunmuştur. Beyin omurilik sıvısı içerisinde her zaman bulunan amiloid beta ve nörofibriler tanglelerle ilişki içinde olmasının sonucunda amiloid fibrillere bağlanmasını sağlamakta ve helikal filamentleri tamir etmektedir. SAP proteinin kendisi, direk olarak nörotoksik etki gösterebileceği için AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklardan bu proteinin uzaklaştırılması gerektiğini söylenmektedir (Kolstoe ve ark, 2009).

Gap junction gamma-2 protein, gap junction kanal aktivitesinde görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 5.9 olarak bulunmuştur. Astrosit ve oligodendrositler arasındaki gap junctionların bozulması, merkezi sinir sisteminde dismiyelizasyon olarak karakterize edilen Cx47 mutanlığı içeren Pelizaus - Merzbacher -benzeri hastalık ile ilişkilendirilmektedir (Ortmann-Murphy ve ark, 2007). Adiponektin proteini, sitokin aktivitesi, reseptör bağlanması, hormon aktivitesi, protein homodimerizasyon aktivitesi, sialik asit bağlanmasında görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.5 olarak bulunmuştur. Adinopektin seviyesi, PH ve kontrolü ile karşılaştırıldığında benzer bulunmuş (Cassani ve ark, 2011) ancak bizim çalışmamızda PH 'da, ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Serum paraoksanaz /arilesteraz 1 proteini, fosfolipid bağlanması, kalsiyum iyonu bağlanması, protein homodimerizasyon aktivitesi, arildialkilfosfotaz ve arilesteraz aktivitesinde görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.4 olarak bulunmuştur. PON1 gen polimorfizmleri, PH için risk faktörü oluştursa da elde edilen sonuçlarda kesinlik sağlanamamıştır (Zintzaras ve ark, 2006). PH' na ait serum örneklerinde 51 adet ekspresyonu artan protein bulunmuştur, literatür ile karşılaştırıldığında Isoform 2 of Clusterin, Kinesin-like protein, FERM domain-containing protein 4A, Apolipoprotein C-I proteinin AH ile bağlantısı olduğu söylenmektedir. Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1, Prothrombin, Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein E, Serum amyloid P-komponent ve Gap junction gama-2 protein, Apolipoprotein C-II proteinlerinin, Parkinson, Alzheimer hastalıkları ve diğer nörodejeneratif hastalıklarla bağlantısı olduğu söylenmektedir. Ubikitin karboksil-terminal hidrolaz 31 proteinin ise otozomal resesif PH

ile ilgisi olduğu söylenmektedir. Apo C3 proteini, kolesterol bağlanması, enzim düzenleme aktivitesi, lipaz inhibitör aktivitesi, fosfolipit bağlanması, yüksek yoğunluktaki lipoprotein partiküllerine reseptör bağlanmasında ve yolak analizi sonucunda lipid metabolizmasında görevli olduğu bulunmuştur. PH' da max kat değişikliği 1.8 olarak bulunmuştur ancak literatürde böyle bir çalışmaya rastlanmadı.

Parkinson hastalarında ekspresyonu azalan proteinler, Komplement C3 proteini, komplement alternatif yolağı, komplement yolağı, yağ asidi metabolizması, bağışıklık, inflamatuvar cevap, lipid metabolizmasında görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 3.1 olarak bulundu. Bizim çalışmamızda PH' na ait serum örneğinde ekspresyonu azalan Komplement C3 proteininin, AH' na ait beyin omurilik sıvısı örneklerinde azaldığı gözlenmiştir. Alzheimer hastalığı için tanı, teşhis ve terapötik hedef olarak kullanılabileceği söylenmiş (Toledo ve ark., 2014). Protein AMBP, serin kökenli endopeptidazların inhibitör aktivitesi, kalsiyum oksalat bağlanması (Atmani ve ark., 1995), IgA ve küçük molekül ve hemin bağlanması ve tripsin inhibisyonunda görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 2.5 olarak bulunmuştur. Huntington hastalarına ait idrarda, hemoglobinin ve alpha1-microglobulin seviyelerinde artış gözlenmiş; bu sonuç 2 proteinin hastalığın biyomarkeri için kullanılabileceğini desteklemiştir (Olsson ve ark, 2012). Afamin proteini, vitamin E bağlanmasında görevlidir ve oksidatif strese karşı nöroprotektif etkiye sahiptir. PH' da max kat değişikliği 1.4 olarak bulunmuştur. Huntington hastalığının ilerleyen aşamasında üretimi azalmaktadır (Heiser et al 2002). Vitamin D-bağlayan protein, aktin, vitamin D, kalkidiol bağlanması ve vitamin transporter aktivitesinde görevlidir ve PH' da max kat değişikliği 1.5 olarak bulunmuştur. Alzheimer hastalarında da bu proteinin azaldığı gözlenmiş (Muenchhoff ve ark., 2014) ve beyinde biriken amiloid betaları temizlediği düşünüldüğü için, serumdaki fazla bulunan bu proteinin gelecekte meydana gelebilecek bunama vakalarını bulmada kullanılabileceği öngörülmektedir (Bishnoi ve ark., 2014). PH' na ait serum örneklerinde, 46 adet ekspresyonu azalan protein bulundu, literatür ile karşılaştırıldığında yukarıda anlatılan 4 proteinin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi olduğu saptandı.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Parkinson Hastalığı'nı önleyebilmek, yaşam kalitesini artırabilmek için hastalığa spesifik biyomarkerın öneminden yapılan çalışmalarla bahsedilmiştir. Bu çalışmada, biyomarker bulunma olasılığı yüksek olan serum biyolojik sıvısı seçildi ve serum proteomunun % 85' ini oluşturan albümin, IgG, IgA gibi proteinlerin uzaklaştırılması sağlanarak az miktarda bulunan proteinlerin ekstrakte edilmesi sağlandı. Kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması için FASP metodu sonucu elde edilen triptik peptid karışım örnekleri, LC-MS/MS cihazına verildi. Elde edilen ham datanın işlenip, proteinlerin ekspresyon analizlerinin ve kantifikasyonlarının yapılması için *Progenesis Q1 for Proteomics* yazılımı kullanıldı. Parkinson hastalarında protein ekspresyonu artan 51 protein ve protein ekspresyonu azalan 46 protein tanımlandı. Literatür ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda ekspresyonu değişen sadece 11 proteinin PH ile ilgili ilişkisi açıklanmış. Bu sonuç bize PH' na ait literatürde tanımlanmayan proteinlerin olası biyomarker olarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Ancak, insana ait serum içeriği değişken olduğu için, örnek sayısının artırılması elde edilen verileri güçlendirecektir. Bizim kullandığımız sistem, 1D LC-MS/MS yöntemi idi. Bu yöntem, biraz daha ileri götürülerek şu an mevcut olan 2D LC-MS/MS yöntemiyle, iki boyutta peptit ayrıştırılması yapıp, tanımlanan protein sayısının artması sağlanabilir. Yine bir başka yöntem olan, offgel sıvı izoelektrik peptit fraksiyonlaması ile tanımlanabilen proteom genişletilebilir ve ardından ITRAQ grup analizi yapılabilir. LC-MS/MS, cihazları her ne kadar ileri teknoloji ürünleri olsa da ortamdaki en ufak bir değişiklik, tanımlanan protein sayısını etkilemektedir. Dolayısıyla elde edilen sonuçların validasyonu ve kantifikasyonu, femtogram seviyesinde hassasiyete sahip Xevo TQ-S (Triple Quadrupole Mass Spectrometer) ile hedefli proteomiks çalışılarak sonuçların güvenilirliği artırılabilir.

KAYNAKLAR

Abbas N., Lucking C.B., Ricard S., Durr A., Bonifati V., De Michele G., Bouley S., Vaughan J.R., Gasser T., Marconi .R, Broussolle E., Brefel-Courbon C., Harhangi S., Oostra B.A., Fabrizio E., Bohme G.A., Pradier L., Wood N.W., Filla A., Meco G., Deneffe P., Agid Y., Brice A.. 1999.The French Parkinson's Disease Genetics Study Group and The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Human Molecular Genetics*. 8: 567-574.

A.D.A.M.Inc. National Institutes of Health
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19515.htm> .

Agilent Tech. (2007) [www document]
http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/AlbuminRemoval/AGILENT_14RemovalSystem.pdf. Ulaşım (2 Ocak 2015).

Alves G, Müller B., Herlofson K., HogenEsch I., Telstad W., Aarsland D., Tysnes O.B., Larsen J.P. ; Norwegian ParkWest study group. (2009). Incidence of Parkinson's disease in Norway: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80: 851-857.

Arai T, Miklossy J, Klegeris A, Guo J.P., McGeer P.L.. (2006). Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65:19–25.

Atmani F., Khan S.R..(1995). Characterization of uronic-acid-rich inhibitor of calcium oxalate crystallization isolated from rat urine. *Urol Res.* 23(2):95-101.

Baykal B. (2011). Nörodejeneratif Mekanizmaların Mitokondriyal Disfonksiyon Hücre Modellerinde Proteomik Yöntemlerle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı. Kocaeli Üniversitesi (Yüksek lisans tezi).

Ben-Shlomo Y. and Marmot M.G.. (1995). Survival and cause of death in a cohort of patients with parkinsonism; possible clues to aetiology? *J neurol neurosurg Psychiatry*. 58: 293-299.

Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S.E., Hutson A.M., Estes M.K.. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol*. 77: 11603–15.

Beyer K., Domingo-Sábat M. and Ariza A.. (2009). Molecular Pathology of Lewy Body Diseases. *Int J Mol Sci*. 10: 724-745.

Bishnoi R.J., Palmer R.F., Royall D.R.. (2014). Vitamin D Binding Protein as a Serum Biomarker of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. Jul 30.

Bower J.H., Maraganore D.M., McDonnell S.K., Rocca W.A.. (1999). Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology*. 52(6):1214-1220.

Brüggemann N. and Klein C.. (2001). Parkin Type of Early-Onset Parkinson Disease. *GeneReviews*.

Cantuti-Castelvetri I., Keller-McGandy C., Bouzou B., Asteris G., Clark T.W., Frosch M.P., Standaert D.G.. (2007). Effects of gender on nigral gene expression and parkinson disease. *Neurobiology of Disease*. 26: 606-614.

Cassani E., Canello R., Cavanna F., Maestrini S., Di Blasio A.M., Liuzzi A., Pezzoli G., Barichella M.. (2011). Serum adiponectin levels in advanced-stage Parkinson's disease patients. *Parkinsons Dis*. 2011:624764.Challenges. *Translational Proteomics*. e1–e17.

- Chesselet M-F. (2003). Dopamine and Parkinson's disease: is the killer in the house? *Molecular Psychiatry*. 8: 369–370.
- Cieslak M., Komoszynski M., Wojtczak A.. (2008). Adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic Signalling*. 4: 305–312.
- Damier P., Hirsch E.C., Agid Y., Graybiel A.M.. (1999). The substantia nigra of the human brain II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*. 122: 1437-1448.
- De Lau L.M., Schipper C. M., Hofman A., Koudstaal P.J., Breteler M.M.. (2005). Prognosis of Parkinson Disease: Risk of Dementia and Mortality: The Rotterdam Study. *Arch Neuro* 62: 1265-1269.
- Dekker M. C. J., Bonifati V. and van Duijn C. M.. (2003) Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw. *Brain*. 126: 1722-1733.
- Diez Gross R, Atwood CW Jr, Ross SB, Eichhorn KA, Olszewski JW, Doyle PJ. (2008). The Coordination of Breathing and Swallowing in Parkinson's Disease. *Dysphagia*. 23: 136–145.
- Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M.. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 68:384–6.
- Dorsey, E.R., George, B.P., Leff, B., and Willis, A.W. (2013). The coming crisis: obtaining care for the growing burden of neurodegenerative conditions. *Neurology* 80. 1989–1996.
- Dragon-Durey M.A., Quartier P., Fremeaux-Bacchi V., Blouin J., de Barace C.. (2013). Molecular basis of a selective C1s deficiency associated with early onset multiple autoimmune diseases. *J Immunol*. 166(12):7612–6.
- Dubois B., and Pillon B.. (1997). Cognitive deficits in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*. 244: 2–8.
- Elliott N.A., Volkert M.R.. (2004). Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol*. 24: 3180–3187.
- Eriksen J. L., Wszolek Z. and Petrucelli L..(2005). Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease. *Arch Neurol*. 62: 353-357.
- Fall P A, Saleh A., Fredrickson M., Olsson J.E., Granérus A.K.. (2003). Survival time, mortality, and cause of death in elderly patients with Parkinson's disease: a 9-year follow-up. *Mov Disord*. 18: 1312-1316.
- Gardner-Thorpe C. (2010). James Parkinson (1755-1824). *J Neurol* 257: 492-493.
- Gibb W.R., Lees A.J.. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 51: 745–52. 2841426.
- Heiser M., Hutter-Paier B., Jerkovic L., Pfragner R., Windisch M., Becker-Andre M., Dieplinger, H.. (2002). Vitamin E binding protein afamin protects neuronal cells in vitro. *J. Neural Transm. Suppl*. 337-345.
- Hely M. A., Morris J., Traficante R., Reid W., O'Sullivan D., Williamson P.. (1999). The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: progression and mortality at 10 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 67: 300-307.
- Hendrickx A., Beullens M., Ceulemans H., Den Abt T., Van Eynde A., Nicolaescu E., Lesage B., Bollen M.. (2009). Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol*. 16(4):365–371.
- Hensley K., Floyd R.A., Zheng N.Y., Nael R., Robinson K.A., Nguyen X., Pye Q.N., Stewart C.A., Geddes J., Markesbery W.R., Patel E., Johnson G.V., Bing G.. (1999). p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*. 72 (5):2053–2058.

- Hofman A, Collette HJ, Bartelds AI. (1989). Incidence and risk factors of Parkinson's disease in the Netherlands. *Neuroepidemiology*. 8:296–9.
- Holt R.J., Sklar A.R., Darkow T., Goldberg G.A., Jonhson J.C., Harley C.R..(2010). Prevalence of Parkinson's disease-induced psychosis in a large U.S. managed care population. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 22:105–110.
- Holzmann J., Frank P., Löffler E., Bennet K.L., Gerner C., Rossmannith W.. (2008). RNase P without RNA: Identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*. 135, 462–474.
- Hortin G.L., Sviridov D.. (2010). The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. *J Proteomics* . 73:629–36.
- Ikeda T., Sugiuchi H., Senba U., Shibuya Y., Uji Y., Okabe H., Araki S..(1993). Preliminary findings on the variation of serum apolipoprotein levels in neural degenerative disorders. *J Clin Lab Anal*. 7(1):1-4.
- Isaacson S. H., and Hauser R.A.. (2009). Improving symptom control in early Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord*. 2: 393-400.
- Ishihara L. S., Cheesbrough A., Brayne C., Schrag A.. (2007). Estimated life expectancy of Parkinson's patients compared with the UK population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 1304-1309.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N.. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392 (6676): 605–608.
- Keeney J.T., Swomley A.M., Forster S., Harris J.L., Sultana R., Butterfield D.A.. (2013) Apolipoprotein A-I: insights from redox proteomics for its role in neurodegeneration. *Proteomics Clinical applications*. 7: 109–122.
- Klein C., Schlossmacher M.G.. (2006). The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol*. 2:136–146.
- Kolstoea E.S., Ridhab B.H., Bellottia V., Wangc N., Robinsonc V.C., Crutchb J.S., Keird G., Kukkastenvemasb R., Gallimorea R. J., Hutchinsona L. W., Hawkinsa P. N., Wooda P. S., Rossorb M. N., and Pepysa B. M.. (2009). Molecular dissection of Alzheimer's disease neuropathology by depletion of serum amyloid P component. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 5; 106(18): 7619- 7623.
- Korczyn A. D., and Gurevich T..(2010). Parkinson's disease: before the motor symptoms and beyond. *Journal of the Neurological sciences*. 289: 2-6.
- Kowal, S.L., Dall, T.M., Chakrabarti, R., Storm, M.V., and Jain, A. (2013). The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. *Mov. Disord*. 28, 311–318.
- Kövari E., Horvath J., Bouras C.. (2009). Neuropathology of Lewy body disorders. *Brain Research Bulletin*. 80: 203-210.
- Lambert J.C., Grenier-Boley B., Harold D., Zelenika D., Chouraki V., Kamatani Y., Sleegers K., Ikram M.A., Hiltunen M., Reitz C., Mateo I., Feulner T., Bullido M., Galimberti D., Concari L., Alvarez V., Sims R., Gerrish A., Chapman J., Deniz-Naranjo C., Solfrizzi V., Sorbi S., Arosio B., Spalletta G., Siciliano G., Epelbaum J., Hannequin D., Dartigues J.F., Tzourio C., Berr C., Schrijvers E.M., Rogers R., Tosto G., Pasquier F., Bettens K., Van Cauwenberghc C., Fratiglioni L., Graff C., Delepine M., Ferri R., Reynolds C.A., Lannfelt L., Ingelsson M., Prince J.A., Chillotti C., Pilotto A., Seripa D., Boland A., Mancuso M., Bossù P., Annoni G., Nacmias B., Bosco P., Panza F., Sanchez-Garcia F., Del Zompo M., Coto E., Owen M., O'Donovan M., Valdivieso F., Caffarra P., Scarpini E., Combarros O., Buée L., Campion D., Soininen H., Breteler M., Riemenschneider M., Van Broeckhoven C., Alperovitch A., Lathrop M., Trégouët D.A., Williams J., Amouyel P. (2012). Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*.

- Licker V. and Burkhard P.R.. (2014). Proteomics as a new paradigm to tackle Parkinson's disease research. Elsevier. *Translational Proteomics*. 4–5 1–17.
- Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G.. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 9:106-18.
- Lo R.Y., Tanner C.M., Albers K.B., Leimpeter A.D., Fross R.D., Bernstein A.L., McGuire V., Quesenberry C.P., Nelson L.M., Van Den Eeden S.K.. (2009). Clinical Features in Early Parkinson Disease and Survival. *Arch Neurol*. 66: 1353-1358.
- Lockhart P.J., Hulihan M., Lincoln S., Hussey J., Skipper L., Bisceglia G., Wilkes K., Farrer M.J.. (2004) Identification of the human ubiquitin specific protease 31 (USP31) gene: structure, sequence and expression analysis. *DNA Seq*. 15: 9–14.
- Matsumine H., Yamamura Y., Hattori N., Kobayashi T., Kitada T., Yoritaka A., Mizuno Y..1998. "A microdeletion of D6S305 in a family of autosomal recessive juvenile parkinsonism (PARK2)". *Genomics* 49 (1): 143–146.
- Mayeux R., Marder K., Cote L.J., Denaro J., Hemenegildo N., Mejia H., Tang M.X., Lantigua R., Wilder D., Gurland B., et al.. (1995). The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988–1993. *Am. J. Epidemiol*. 142:820–7.
- Mila S., Albo A.G., Corpillo D., Giraud S., Zibetti M., Bucci E.M., Lopiano L., Fasano M.. (2009). Lymphocyte proteomics of Parkinson's disease patients reveals cytoskeletal protein dysregulation and oxidative stress. *Biomark Med*. 3(2):117–128.
- Muenchhoff J., Poljak A., Song F., Raftery M., Brodaty H., Duncan M., McEvoy M., Attia J., Schofield P.W., Sachdev P.S.. (2014). Plasma Protein Profiling of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Across Two Independent Cohorts. *J Alzheimers Dis*. Aug 26.
- Nussbaum R.L. and Ellis C.E.. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 348 pp. 1356–1364.
- O’Gorman M., Ivanov A. R., Lavery P., Bennett M.. Progenesis LC-MS v2.0 – Validating a unique approach for label-free LC-MS data analysis. Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, UK. Department of Genetics and Complex Diseases Proteomics, HSPH Proteomics Resource, Harvard School of Public Health, Boston, USA.
- Olesen J., Gustavsson A., Svensson M., Wittchen H.U., Jönsson B.. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*. 19:155–62.
- Olsson M.G., Davidsson S., Muhammad Z.D., Lahiri N., Tabrizi S.J., Akerstrom B., Bjorkqvist M.. (2012). Increased levels of hemoglobin and alpha1-microglobulin in Huntington's disease. *Front Biosci*. Jan 1;4:950-7.
- Orthmann-Murphy J.L., Enriquez A.D., Abrams C.K., Scherer S.S.. (2007). Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Cell Neurosci*. 34: 629-641.
- oxidation protection genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 14530–14535.
- Paesold-Burda P., Baumgartner M.R., Santer R., Bosshard N.U., Steinmann B.. (2007). Elevated serum biotinidase activity in hepatic glycogen storage disorders--a convenient biomarker. *J Inherit Metab Dis*. Nov;30(6):896-902.
- Pennington S, Snell K, Lee M, Walker R. (2010). The cause of death in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 16: 434-437.
- Pereira E A ,C and T Z Aziz. (2006). Surgical insights into Parkinson's disease. *J R Soc Med*. 99: 238–244.

- Petit-Turcotte C., Stohl S.M., Beffert U., Cohn J.S., Aumont N., Tremblay M., Dea D., Yang L., Poirier J., Shachter N.S.. (2001). Apolipoprotein C-I expression in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 8(6):953–963.
- Pilsl A, Winklhofer KF. (2011). Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 123, 173–188.
- Poewe W. (2008). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European journal of neurology* 15. (suppl. 1): 14-20.
- Rite I, Arguelles S, Venero JL, Garcia-Rodriguez S, Ayala A, Cano J, Machado A.. (2007). Proteomic identification of biomarkers in the cerebrospinal fluid in a rat model of nigrostriatal dopaminergic degeneration. *J Neurosci Res.* 85(16):3607–3618.
- Ruiperez V, F Darios, and B Davletov. (2010). Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Progress in Lipid Research.* 49: 420–428.
- Sabbagh M., Malek-Ahmadi M., Levenson I. , and Sparks D. L. (2013). KIF6 719Arg allele is associated with statin effects on cholesterol levels in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimers Disease.* Vol. 33, pp. 111–116.
- Schrag A., Ben-Shlomo Y., Brown R., Marsden C.D., Quinn N.. (1998). Young-onset Parkinson's disease revisited-clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord.* 13(6):885-894.
- Shi, M., Caudle, W.M., Zhang, J. (2009). Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: A proteomic approach. *Neurobiol. Dis.* 35, 157–164.
- Simunovic F., Yi M., Wang Y., Macey L., Brown L.T., Krichevsky A.M., Andersen S.L., Stephens R.M., Benes F.M., Sonntag K.C.. (2009). Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain.* 132: 1795-1809.
- Simunovic F., Yi M., Wang Y., Macey L., Brown L.T., Krichevsky A.M., Andersen S.L., Stephens R.M., Benes F.M., Sonntag K.C.. (2009). Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain.* 132: 1795-1809.
- Stefan N., Weikert C., Ix J.H., Fritsche A., Haring H.U.. (2010). Association of lower plasma fetuin-a levels with peripheral arterial disease in type 2 diabetes: response to Eraso et al. *Diabetes Care.* 33:e55; author reply e56.
- Sugiana C., Pagliarini D., McKenzie M., Kirby D., Salemi R., Abu-Amero K., Dahl H., Hutchison W., Vascotto K., Smith S., Newbold R.F., Christodoulou J., Calvo S., Mootha V.K., Ryan M.T., Thorburn D.R.. (2008). Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet.* 83(4):468–478.
- Sun Z.L., Xie Q.Y., Guo G.L., Ma K., Huang Y.Y.. (2014). Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 691540.
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., and Coates, J.C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* 20: 470–481.
- Thadikaran, L., Siegenthaler, M. A., Crettaz, D., Queloz, P. A., Schinder P., Tissot J.D.. (2005). Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics.* 5, 3019–3034.
- Thermes V., Candal E., Alunni A., Serin G., Bourrat F., Joly J.S.. (2006) Medaka simplet (FAM53B) belongs to a family of novel vertebrate genes controlling cell proliferation. *Development.* 133:1881– 90.
- Thomas B. and Beal M.F.. (2007). Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 16:183–94.

- Toledo J.B., Korff A., Shaw L.M., Trojanowski J.Q., Zhang J.. (2014). Low levels of cerebrospinal fluid complement 3 and factor H predict faster cognitive decline in mild cognitive impairment. *Alzheimer's research & therapy*. 6 (3), 36.
- van Dijk, K. D. , Jongbloed,W., Heijst, J.A., Teunissen, C.E., Groenewegen, H.J., Berendse, H.W., van de Berg W.D., Veerhuis R.. (2013). Cerebrospinalfluid and plasma clusterin levelsin Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord*. 19, 1079–1083.
- van der Made A. (2011). alfa- synuclein aggregation in Parkinson's Disease. Master's programme Biology of Disease Graduate School of Life Sciences Utrecht University.
- Vergheze P.B., Castellano J.M., Holtzman D.M.. (2011). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 10: 241–252.
- Volkert M.R., Elliott N.A., Housman D.E.. (2000) Functional genomics reveals a family of eukaryotic Vorhaus L.J., Kark R.M.. (1953). Serum colinesterase in health and disease. *Am J Med*. Jun;14(6):707-19.
- Wang J., Yin L., Chen Z.. (2013). Neuroprotective role of fibronectin in neuronal extrasynaptic transmission. *Neuronal Regeneration Research*. 8(4), 376-372.
- Wang S.J., Fang J.Q., Ma J., Wang Y.C., Zeng X.L., Zhou D., Sun G.J.. (2013). Influence of electroacupuncture on p38-mitogen activated protein kinase in substantia nigra cells of rats with Parkinson disease model. *Zhongguo Zhen Jiu*. Apr; 33(4):329-33.
- Wilhelmus M.M.M., Bol, J.G.J.M., Van Haastert, E. S., Rozemuller, A.J.M., Bu, G., Drukarch, B., & Hoozemans, J. J. M. (2011). Apolipoprotein E1 and LRP1 Increase Early in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Am J Pathol*. Nov 179 (5): 2152-2156 .
- Williams A, Gill S., Varma T., Jenkinson C., Quinn N., Mitchell R., Scott R., Ives N., Rick C., Daniels J., Patel S., Wheatley K. And behalf of the PD SURG Collaborative Group. (2010). Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *The Lancet Neurology*. 9: 581-591.
- Wimo A. and Prince M. (2010). *World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia*. (London: Alzheimer's Disease International).
- Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M..(2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* .6.
- Won J.C., Park C-Y., Oh S.W., Lee E.S., Youn B-S, Kim M-S.. (2014). Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *Plos One*. 9(7), e103351.
- Xie H., Chang M., Hu X., Wang D., Tian M., Li G., Jiang H., Wang Y., Dong Z., Zhang Y., Hu L.. (2011). Proteomics analysis of MPP+-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neurol Sci*. 32(2):221–228.
- Zhang Y, Gao J, Chung KKK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM..2000. Parkin functions as an e2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 13354-13359.
- Zhu X., Babar A., Siedlak S.L., Yang Q., Ito G., Iwatsubo T., Smith M.A., Perry G., Chen S.G.. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol Neurodegener*. 1: 17.
- Zintzaras E. , Hadjigeorgiou G. M.. (2006). Associateion of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet*.. 49: 474–481.

EKLER

Ek 1. : Temsili yolak analizi

Yolak ismi	Yolak kaynağı	Çaķışan genlerin sayısı	Çaķışan genlerin UniProt isimleri	Yolakta bulunan bütün genler	p değeri	q değeri
g-protein signaling through tubby proteins	BioCarta	1	P00734	12 (12)	0.049	1
Peptide ligand-binding receptors	Reactome	3	P02775;P00734;P01024	194 (194)	0.0468	1
Selenium Micronutrient Network	Wikipathways	2	P00734;P02647	82 (83)	0.0458	1
nicotine degradation III	HumanCyc	1	P19224	10 (10)	0.041	1
Vitamin D Metabolism	Wikipathways	1	P02774	10 (10)	0.041	1
GP1b-IX-V activation signalling	Reactome	1	P40197	10 (10)	0.041	1
alternative complement pathway	BioCarta	1	P01024	10 (10)	0.041	1
Clopidogrel Action Pathway	SMPDB	1	P27169	9 (9)	0.0369	1
retinoate biosynthesis I	HumanCyc	1	P02753	9 (9)	0.0369	1
Glucocorticoid Pathway (Peripheral Tissue)_ Pharmacodynamics	PharmGKB	1	P08185	9 (9)	0.0369	1
Clopidogrel Metabolism Pathway	SMPDB	1	P27169	9 (9)	0.0369	1
Neurotransmitter Clearance In The Synaptic Cleft	Reactome	1	P06276	8 (8)	0.0329	1
visceral fat deposits and the metabolic syndrome	BioCarta	1	Q15848	8 (8)	0.0329	1
Folate Metabolism	Wikipathways	2	P00734;P02647	65 (66)	0.03	1
Phase I biotransformations_non P450	Wikipathways	1	P27169	7 (7)	0.0289	1
Heme degradation	Reactome	1	P19224	7 (7)	0.0289	1
Innate Immune System	Reactome	6	P09871;P06681;P01024;P04003;P18428;P07225	549 (572)	0.0253	1
Scavenging by Class B Receptors	Reactome	1	P02647	6 (6)	0.0248	1

Vitamin D (calciferol) metabolism	Reactome	1	P02774	6 (6)	0.0248	1
retinoate biosynthesis II	HumanCyc	1	P02753	5 (5)	0.0207	0.983
Systemic lupus erythematosus - Homo sapiens (human)	KEGG	3	P09871;P06681;P01024	135 (136)	0.0185	0.892
Platelet Aggregation Inhibitor Pathway_ Pharmacodynamics	PharmGKB	2	P00734;P40197	49 (49)	0.0177	0.862
Heroin Metabolism Pathway	SMPDB	1	P06276	4 (4)	0.0166	0.82
Alternative complement activation	Reactome	1	P01024	4 (4)	0.0166	0.82
transcriptional activation of dbpb from mrna	BioCarta	1	P00734	4 (4)	0.0166	0.82
Vitamin K Metabolism	SMPDB	1	P00734	4 (4)	0.0166	0.82
FOXA2 and FOXA3 transcription factor networks	PID	2	P00734;P02647	45 (45)	0.015	0.786
Platelet Aggregation (Plug Formation)	Reactome	2	P00734;P40197	37 (37)	0.0103	0.547
Transfer of LPS from LBP carrier to CD14	Reactome	1	P18428	2 (2)	0.00833	0.448
PTM: gamma carboxylation_hypusine formation and arylsulfatase activation	Reactome	2	P00734;P07225	27 (27)	0.00559	0.305
Response to elevated platelet cytosolic Ca2+	Reactome	3	P02775;P07225;P02647	86 (87)	0.00544	0.302
Platelet degranulation	Reactome	3	P02775;P07225;P02647	81 (82)	0.0046	0.259
Metabolism of lipids and lipoproteins	Reactome	7	Q96G23;P06276;P02647;P02774;P02655;P02656;P02649	489 (490)	0.00378	0.216
PPAR signaling pathway - Homo sapiens (human)	KEGG	3	P02656;Q15848;P02647	69 (69)	0.00293	0.17
Hemostasis	Reactome	7	P02775;P00734;P03952;P02647;P00748;P07225;P40197	464 (465)	0.00282	0.167
Scavenging by Class A Receptors	Reactome	2	P02649;P02647	19 (19)	0.00278	0.167

Platelet activation_ signaling and aggregation	Reactome	5	P02775;P00734;P07225;P40197;P02647	207 (208)	0.00161	0.0983
Common Pathway	Reactome	2	P00734;P07225	14 (14)	0.0015	0.093
fibrinolysis pathway	BioCarta	2	Q96IY4;P00734	14 (14)	0.0015	0.093
Warfarin Pathway_ Pharmacodynamics	PharmGKB	2	P00734;P07225	14 (14)	0.0015	0.093
Irinotecan Pathway_ Pharmacodynamics	PharmGKB	2	P19224;P06276	14 (14)	0.0015	0.093
extrinsic prothrombin activation pathway	BioCarta	2	P00734;P07225	13 (13)	0.00129	0.0857
Vitamin B12 Metabolism	WikiPathways	3	P00734;P02649;P02647	50 (51)	0.00116	0.0784
lectin induced complement pathway	BioCarta	2	P06681;P01024	12 (12)	0.00109	0.0755
Gamma-carboxylation_ transport_ and amino-terminal cleavage of proteins	Reactome	2	P00734;P07225	10 (10)	0.000749	0.0527
Gamma-carboxylation of protein precursors	Reactome	2	P00734;P07225	9 (9)	0.000601	0.0431
Removal of aminoterminal propeptides from gamma-carboxylated proteins	Reactome	2	P00734;P07225	9 (9)	0.000601	0.0431
Initial triggering of complement	Reactome	3	P09871;P06681;P01024	39 (62)	0.000557	0.0416
Transport of gamma-carboxylated protein precursors from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus	Reactome	2	P00734;P07225	8 (8)	0.000469	0.0357
Pertussis - Homo sapiens (human)	KEGG	4	P04003;P09871;P06681;P01024	75 (75)	0.000258	0.02
Activation of C3 and C5	Reactome	2	P06681;P01024	6 (6)	0.000252	0.02
Blood Clotting Cascade	WikiPathways	3	P00748;P03952;P00734	22 (22)	9.86E-05	0.00802
Ardeparin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	21 (21)	8.54E-05	0.0071
Heparin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	21 (21)	8.54E-05	0.0071

Fondaparinux Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	21 (21)	8.54E-05	0.0071
Enoxaparin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	21 (21)	8.54E-05	0.0071
Staphylococcus aureus infection - Homo sapiens (human)	KEGG	4	P13645;P09871;P06681;P01024	56 (57)	8.24E-05	0.0071
Coagulation	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Bivalirudin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Argatroban Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Phenprocoumon Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Dicumarol Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Ximelagatran Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Lepirudin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Anistreplase Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Aprotinin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Warfarin Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Aminocaproic Acid Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Tranexamic Acid Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Urokinase Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Retepase Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Streptokinase Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Tenecteplase Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Alteplase Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Acenocoumarol Action Pathway	SMPDB	3	P00748;P03952;P00734	20 (20)	7.34E-05	0.00689
Lipid digestion_mobilization_and transport	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	50 (50)	5.26E-05	0.00689

Diseases associated with visual transduction	Reactome	5	P02655;P02656;P02649;P02753;P02647	96 (96)	4.59E-05	0.00689
Visual phototransduction	Reactome	5	P02655;P02656;P02649;P02753;P02647	96 (96)	4.59E-05	0.00689
Complement Activation_ Classical Pathway	Wiki pathways	3	P09871;P06681;P01024	17 (17)	4.42E-05	0.00689
classical complement pathway	BioCarta	3	P09871;P06681;P01024	14 (14)	2.39E-05	0.00513
Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	Reactome	4	P00738;P02760;P02649;P02647	41 (41)	2.38E-05	0.00513
Scavenging of heme from plasma	Reactome	3	P00738;P02760;P02647	12 (12)	1.45E-05	0.00354
Lipoprotein metabolism	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	30 (30)	6.65E-06	0.00174
Complement cascade	Reactome	5	P04003;P07225;P09871;P06681;P01024	57 (80)	3.55E-06	0.001
Regulation of Complement cascade	Reactome	4	P04003;P07225;P06681;P01024	23 (23)	2.20E-06	0.00067
intrinsic prothrombin activation pathway	BioCarta	4	P00748;P03952;P00734;P07225	23 (23)	2.20E-06	0.00067
Retinoid metabolism and transport	Reactome	5	P02655;P02656;P02649;P02753;P02647	42 (42)	7.55E-07	0.00028
Intrinsic Pathway	Reactome	4	P00748;P03952;P00734;P40197	17 (17)	6.01E-07	0.00024
Chylomicron-mediated lipid transport	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	17 (17)	6.01E-07	0.00024
HDL-mediated lipid transport	Reactome	4	P02655;P02656;P02649;P02647	15 (15)	3.47E-07	0.00018
Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade)	Reactome	5	P00748;P03952;P00734;P40197;P07225	32 (32)	1.84E-07	0.00011
Statin Pathway	Wiki pathways	5	P02655;P02656;P02649;P02654;P02647	29 (31)	1.10E-07	8.03E-05
Statin Pathway_ Pharmacodynamics	PharmGKB	5	P02655;P02656;P02649;P02654;P02647	25 (25)	4.97E-08	4.54E-05
Complement	Wiki pathways	8	P02743;P03952;P09871;P01024;P02647;P04003;Q15848;P07225	95 (95)	4.30E-09	5.25E-06
Complement and Coagulation Cascades	Wiki pathways	8	P00734;Q961Y4;P03952;P09871;P06681;P01024;P00748;P07225	54 (54)	4.17E-11	7.63E-08
Complement and coagulation cascades - Homo sapiens (human)	KEGG	9	P00734;P00748;P03952;P09871;P06681;P01024;Q961Y4;P04003;P07225	69 (69)	7.42E-12	2.71E-08

Ek 2. : Wilconx zenginleştirme analizi

Yolak ismi	Yolak kaynağı	Çakışan genlerin sayısı	Çakışan genlerin UniProt isimleri	Yolakta bulunan bütün genler	p değeri	q değeri
classical complement pathway	BioCarta	14	P02745;P02746;P02747;P00736;P09871;P06681;P01024;P01031;P13671;P10643;P07357;P07358;P07360;P02748	14	0.0426	1
Diseases associated with visual transduction	Reactome	9	P02766;P02647;P02652;P06727;P02655;P02656;Q9Y561;P02649;P02753	96	0.0391	1
Visual phototransduction	Reactome	9	P02766;P02647;P02652;P06727;P02655;P02656;Q9Y561;P02649;P02753	96	0.0391	1
Retinoid metabolism and transport	Reactome	9	P02766;Q9Y561;P02652;P06727;P02655;P02656;P02647;P02649;P02753	42	0.0391	1
Statin Pathway_ Pharmacodynamics	PharmGKB	6	P02647;P06727;P02654;P02655;P02656;P02649	25	0.0313	1
Chylomicron-mediated lipid transport	Reactome	6	P02647;P02652;P06727;P02655;P02656;P02649	17	0.0313	1
HDL-mediated lipid transport	Reactome	6	P01023;P02647;P02768;P02655;P02656;P02649	15	0.0313	1
Hemostasis	Reactome	20	P07996;P08697;P01023;P00734;P05155;O14983;P04196;P03952;P07225;P01008;P00742;P01009;P02671;P02768;P02775;P01042;P02647;P00747;P40197;P00748	465	0.0262	1
Signal Transduction	Reactome	21	P02775;P01023;P00734;Q99704;P06727;P00747;P01019;P02766;P01024;P02647;P02652;P07996;P02671;P01042;P01031;P02655;P02656;Q9Y561;P02649;P02753;Q8NDV7	1904	0.0218	1
Selenium Micronutrient Network	Wikipathways	9	P00734;P01011;P02647;P35542;P02768;P69905;P00747;P22352;P68871	83	0.0207	1
Folate Metabolism	Wikipathways	9	P00734;P01011;P02647;P35542;P02768;P69905;P00747;P22352;P68871	66	0.0207	1
Vitamin B12 Metabolism	Wikipathways	9	P00734;P02649;P01011;P02647;P35542;P02768;P69905;P00747;P68871	51	0.0207	1
Disease	Reactome	13	P02743;P06733;P51884;P02766;P02647;P02652;P06727;P02655;P02656;Q9Y561;P02649;P02753;Q8NDV7	962	0.0192	1
Prion diseases - Homo sapiens (human)	KEGG	10	P02745;P02746;P02747;P01031;P13671;P10643;P07357;P07358;P07360;P02748	36	0.0176	1
Response to elevated platelet cytosolic Ca2+	Reactome	13	P07996;P02775;P01023;P02671;P05155;P08697;P04196;P02647;P01009;P01042;P02768;P07225;P00747	87	0.0175	1
Platelet degranulation	Reactome	13	P08697;P01023;P02671;P05155;P01009;P04196;P02647;P07996;P01042;P02768;P02775;P07225;P00747	82	0.0175	1
Statin Pathway	Wikipathways	7	P02647;P02652;P06727;P02654;P02655;P02656;P02649	31	0.0156	1
Lipid digestion_ mobilization_ and	Reactome	8	P01023;P02647;P02652;P06727;P02768;P02655;P02656;P02649	50	0.0078	1
Lipoprotein metabolism	Reactome	8	P01023;P02647;P02652;P06727;P02768;P02655;P02656;P02649	30	0.0078	1
Platelet activation_ signaling and aggregation	Reactome	15	P08697;P01023;P02671;P05155;P07996;P04196;P02647;P01009;P00734;P02768;P02775;P01042;P07225;P00747;P40197	208	0.0059	1

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Şeyma TÜRKSEVEN
- Doğum yeri ve tarihi: Düzce, 17.07.1989
- Uyuşu: T.C.
- Medeni Durumu: Bekar
- İletişim Adresi ve Telefonu: Seyitömer Mah., Hüseyin Kazım Sok., No:78/ 8 Fatih / İSTANBUL. Gsm: 0537 5089335

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

- Mustafa Kemal İlköğretim Okulu (2000-2003)
- Düzce Anadolu Öğretmen Lisesi (2003-2007)
- İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2008-2012)
- Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Bölümü (Yüksek Lisans) (2013-2015)
- Yabancı Dili: İngilizce

3. Bilimsel Etkinlikler

- Poster sunumu, Gurel B., **Turkseven S.**, Cansev M., Baykal A.T. 2014. Investigating the role of brain extracellular matrix in Alzheimer's Disease. The 8th Mass Spectrometry in Biotechnology & Medicine Summer School Dubrovnik July 5-11.
- Bildiri, Kocatürk M., Baykal A.T., **Turkseven S.**, Acioglu C., Yılmaz Z..(2013). Dilate Kardiyomapatili köpeklerde yeni bir diyagnostik yaklaşım : serum proteomik inceleme. 10. Ulusal veteriner iç hastalıkları kongresi 27- 30 Haziran. Perissia Hotel and Convention Center.