

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARDA BEYİN PROTEİN  
DAĞILIMINDAKİ YAŞA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLER**

Gönül BAMBAL

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Doktora Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

I. Danışman : Prof. Dr. Nurbay ATEŞ  
II. Danışman : Yrd. Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK (Proje No: 108S196)

KOCAELİ  
2010

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

**Tez Adı:** Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarda Beyin Protein Dağılımındaki Yaşa Bağlı Değişiklikler

**Tez yazarı:** Gönül BAMBAL

**Tez savunma tarihi:**

**Tez I. Danışmanı:** Prof. Dr. Nurbay ATEŞ

**Tez II. Danışmanı:** Yrd. Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

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

### ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarda Beyin Protein

#### Dağılımındaki Yaşa Bağlı Değişiklikler

Epileptik hastalarda ve deneysel epilepsi modellerinde yapılan araştırmalar, nöbet aktivitesi ile ilgili nörotransmitter sistemler, iyon kanalları ve genler, beyin bölgeleri/yolaklar hakkında önemli bilgiler ortaya koymaktadır. Bu geniş bilgi birikimine karşın, epilepsi ile sonuçlanan nöronal ağdaki moleküler değişiklikler ile ilgili mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, WAG/Rij sıçanlarda absans nöbetlerin yaşa bağlı gelişim özellikleri proteomiks yöntemi kullanılarak moleküler düzeyde değerlendirildi.

Farklılık gösteren proteom ekspresyonları (1/6 aylık) WAG/Rij ve kontrol Wistar sıçanlarının korteks, hipokampus ve talamusları arasında iki boyutlu jel elektroforezi ile çalışıldı. Seçilen spotlardan MALDI spektrometresinde tanımlanan yaşa bağlı olarak farklı eksprese olan olası proteinler korteksde 6 ve talamusda 3 iken, türe bağlı olarak farklı eksprese olan proteinlerin sayısı korteksde 8, talamusda 7'dir. Bu proteinler myosin light chain4, neuron-specific vesicular protein calcyon, stathmin-4, phosphoserine phosphatase, CLTAprotein, GTP-binding protein rheb, transmembrane emp24 domain-containing protein, tetratricopeptide repeat protein 36, protein FAM46B, annexinA5, 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, 2'-5' oligoadenylate synthetase-like1 protein, transcriptional activator protein pur beta, nuclear distribution protein nude homolog1, survival of motor neuron protein-interacting protein1, endophilin-A1, glycosyltransferase 6 domain-containing protein1, GTP-binding protein 8, probable trna(his) quanylyltransferase, rib43a-like with coiled coils protein2, cathepsin q2, actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein, uncharacterized protein c8orf42 homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 N'dir. Hipokampusda yaş veya türle ilişkili değişiklikler tanımlanamamıştır.

Bu proteinlerin tanımlanması; absans epilepsinin patogenezi ile ilişkili moleküler değişikliklerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir ve epilepsi tedavisine yönelik farmakoproteomik verileri arttırabilir.

Anahtar Kelimeler: Proteomiks, Absans epilepsi, WAG/Rij sıçan.

## ABSTRACT

### Age-Related Changes Of Brain Protein Distribution In Genetic Absence Epilepsy Rats

Research conducted with epileptic patients and the experimental models of epilepsy revealed crucial information about the brain regions/pathways, ion channels, neurotransmitter systems and genes involved in seizure activity. Despite this vast accumulation of information, mechanisms related to molecular changes in the neural network resulting in epilepsy has not been fully understood yet.

In this study, we investigated the developmental age-related characteristics of absence seizures at the molecular level using proteomics techniques.

Differential proteome expression between cortex, hippocampus, thalamus of (1/6 months of age) Wag/Rij rats and control Wistar rats were examined by two-dimensional gel electrophoresis. Whereas number of age-related differentially expressed potential proteins identified in cortex and thalamus selected from spots by MALDI spectrometry was 6 and 3, respectively, strain-related was 8 and 7. Those proteins included myosin light chain4, neuron-specific vesicular protein calcyon, stathmin-4, phosphoserine phosphatase, CLTAprotein, GTP-binding protein rheb, transmembrane emp24 domain-containing protein, tetratricopeptide repeat protein36, protein FAM46B, annexinA5, 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, 2'-5' oligoadenylate synthetase-like1 protein, transcriptional activator protein pur beta, nuclear distribution protein nude homolog1, survival of motor neuron protein-interacting protein1, endophilin-A1, glycosyltransferase 6domain-containing protein1, GTP-binding protein8, probable trna(his) quanylyltransferase, rib43a-like with coiled coils protein2, cathepsinq2, actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein, uncharacterized protein c8orf42 homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2N. Age or strain related changes could not be identified in hippocampus.

Identification of these proteins may contribute to better understanding of the molecular changes related to pathogenesis of absence epilepsy and may improve new pharmacoproteomic datas on the treatment of epilepsy.

Key words: Proteomic, Absence epilepsy, WAG/Rij rat.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez alıőmamın yürütölmesi hususunda gerekli iş birliklerini sağlayıp, çalıőmamın her aşamasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan ve yönlendiren, desteğini gördüğüm, danışman hocam Prof.Dr. Nurbay ATEŞ'e

Bitmeyen enerjisini ve bilgisinin derinliğini her zaman yanımda hissettiğim, bütün laboratuvar imkanlarını sunan ve doktora eğitimime çok büyük katkıları olan, değerli hocam Yard. Doç.Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP'e

Asistanlık eğitimimin ilk yıllarından itibaren tüm bildiği laboratuvar prensiplerini ve tekniklerini benimle paylaşan, proteomik teknolojisine olan ilgimi destekleyen ve önemli katkıları olan değerli hocam, Yard. Doç. Dr. Ayőe KARSON'a

Her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım,

Cevahir ALTINKAYNAK ve ağrı GÜMÜŐTEKİN'e

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom Bilim laboratuvarında bulunduğum süre içinde birlikte çalıőmaktan çok keyif aldığım;

güler yüzlü, dinamik, yardımcı ve paylaşımcı olan diğer değerli arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince gösterdikleri sonsuz destek, anlayıő ve hoőgörü için sevgili aileme ve eőime

Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epilepsi	3
2.2. Epilepsi Sınıflandırması	3
2.3. Epilepsinin Fizyopatolojisi	6
2.4. Absans Epilepsi	9
2.4.1. Absans Epilepsinin Hayvan Modelleri	12
2.4.2. WAG/Rij Modeli	14
2.5. Proteomiks Teknolojisi	15
2.6. Epilepside Proteomik Yaklaşımlar	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1 Deney Planı	29
3.2. Cerrahi İşlemler	29
3.3. EEG Kayıtlarının Alınması	29
3.4. Proteomiks Çalışması	30
3.4.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.4.2. Deneyde Kullanılan Araç ve Cihazlar	31
3.4. 3. Deneyde Kullanılan Yöntemler	32
3.4.3.1. Örneklerin elde edilmesi	32
3.4.3.2. Bradford protein miktar tayini	32

3.4.3.3. SmartSpec 3000 spektrofotometresi ile Bradford protein tayini	miktar 33
3.4.3.4. ELİSA spektramax-M2 (kuyucuklu plaka) ile Bradford protein tayini	miktar 33
3.4.3.5. Rehidratasyon	33
3.4.3.6. İzoelektrik odaklama (IEF) (1. Boyut)	34
3.4.3.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)(2.Boyut)	35
3.4.3.8. Boyama ve Görüntüleme	36
3.4.3.9. Jellerin Değerlendirilmesi	37
3.4.3.10. Spot Kesimi	38
3.4.3.11. Tripsin Enzimi ile Muamele	38
3.4.3.12. Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) ile protein analizi	39
3.4.3.12.1. MALDI plakasının temizlenmesi	40
3.4.3.12.2. MALDI plaka kuyucuklarının temizlenmesi	40
3.4.3.12.3. CHCA( MALDI MATRİKSİ) Rekrystalizasyonu	40
3.4.3.13. Proteinlerin Tanımlanması	43
3.4.3.14. İstatistik	44
4. BULGULAR	45
4.1. Grup içinde yapılan proteomik değerlendirmeler	45
4.1.1. 1 aylık Wag/Rij sıçanların proteomik analizleri	45
4.1.1.A. Korteksteki proteomik analizler	45
4.1.1.B. Hipokampusdaki proteomik analizler	47
4.1.1.C. Talamusdaki proteomik analizler	50
4.1.2. 6 aylık Wag/Rij sıçanların proteomik analizleri	52
4.1.2.A. Korteksdeki proteomik analizler	52
4.1.2.B. Hipokampusdaki proteomik analizler	55
4.1.2.C. Talamusdaki proteomik analizler	57
4.1.3. 1 aylık Wistar sıçanların proteomik analizleri	60
4.1.3.A. Korteksdeki proteomik analizler	60
4.1.3.B. Hipokampusdaki proteomik analizler	62
4.1.3.C. Talamusdaki proteomik analizler	65
4.1.4. 6 aylık Wistar sıçanların proteomik analizleri	68
4.1.4.A. Korteksdeki proteomik analizler	68
4.1.4.B. Hipokampusdaki proteomik analizler	70
4.1.4.C. Talamusdaki proteomik analizler	72

4.2. Gruplar arasında yapılan proteomik değerlendirmeleri	76
4.2.1. Türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar	76
4.2.1.1. 1 aylık yaştaki türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar	76
4.2.1.1.A. 1 aylık wistar sıçanın korteksi ile 1 aylık Wag/Rij sıçanın korteksinin proteomik analizi	76
4.2.1.1.B. 1 aylık wistar sıçanın hipokampusu ile 1 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusunun proteomik analizi	78
4.2.1.1.C. 1 aylık wistar sıçanın talamusu ile 1 aylık Wag/Rij sıçanın talamusunun proteomik analizi	80
4.2.1.2. 6 aylık yaştaki türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar	82
4.2.1.2.A. 6 aylık wistar sıçanın korteksi ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın korteksinin proteomik analizi	82
4.2.1.2.B. 6 aylık wistar sıçanın hipokampusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusunun proteomik analizi	84
4.2.1.2.C. 6 aylık wistar sıçanın talamusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın talamusunun proteomik analizi	86
4.2.2. Yaşa bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar	88
4.2.2.1. Wistar sıçanlarda yaşa bağlı değişimin değerlendirilmesi	88
4.2.2.1.A. 1 aylık wistar sıçanın korteksi ile 6 aylık wistar sıçanın korteksinin proteomik analizi	88
4.2.2.1.B. 1 aylık wistar sıçanın hipokampusu ile 6 aylık wistar sıçanın hipokampusunun proteomik analizi	90
4.2.2.1.C. 1 aylık wistar sıçanın talamusu ile 6 aylık wistar sıçanın talamusunun proteomik analizi	92
4.2.2.2. Wag/Rij sıçanlarda yaşa bağlı değişimin değerlendirilmesi	94
4.2.2.2.1.A. 1 aylık Wag/Rij sıçanın korteksi ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın korteksinin proteomik analizi	94
4.2.2.2.1.B. 1 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusunun proteomik analizi	96
4.2.2.2.1.C. 1 aylık Wag/Rij sıçanın talamusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın talamusunun proteomik analizi	98
4.3. Proteinlerin tanımlanması	100
4.3.1. Türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar	105
4.3.1.1. Korteks dokusunun değerlendirilmesi	105
4.3.1.2. Talamus dokusunun değerlendirilmesi	110
4.3.2. Yaşa bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar	115
4.3.2.1. Korteks dokusunun değerlendirilmesi	115
4.3.2.2. Talamus dokusunun değerlendirilmesi	119
5. TARTIŞMA	123
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	144
KAYNAKLAR DİZİNİ	146
ÖZGEÇMİŞ	160



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2D : İki boyutlu

2-DE : İki boyutlu jel elektroforezi

2'-5' OAS : 2'-5' oligoadenylate synth

2'-5'As : 2'-5' bağılı oligodenylates

3D : Üç boyutlu

3 $\alpha$ -HSD : 3 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenaz

5 $\alpha$ -DHT : 5 $\alpha$ -dihidrotestosteron

Ach : Asetilkolin

ACN : Asetonitril

ACTH : Adrenokortikotropin hormon

ADNFLE : Otozomal dominant nokturnal frontal lop epilepsi

ALLO : Allopregnanolon

AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol proprionat

Arp 2/3 kompleks : Actin-Related Protein 2/3 Complex

BBF : Bromofenol mavisi

BFNNC : Benign ailesel neonatal konvulsiyonlar

BSA : Bovin serum albumin

Ca+2 : Kalsiyum

CAE : Çocukluk çağı absans epilepsisi

CaMKII : Ca/kalmodulin bağımlı kinaz II

CHAPS : 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonyum]-1-propansülfonat

CHCA :  $\alpha$ - Siyano-4- hidroksisinnamik asid

CL : İntrolaminar çekirdeklerin sentrolateral çekirdeği

D1 : Dopamin 1

D2 : Dopamin 2

DAG : Diaçilgliserol

DDD : Diken Dalga Deşarjları

DEHB : Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu

DTT : Diklorodifeniltrikloroetan

E1 : Ubiquitin aktive edici enzim

E2 : Ubiquitin konjuge edici enzim

E3: Ubiquitin ligaz

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EEG : Elektroansefalogram

EPSP : Eksitator Postsinaptik Potansiyel

ERAD : Endoplazmik retikulumla ilişkilili değredasyon

ESI : Elektrosprey iyonizasyon

FS : Febril Nöbetler

FTMS : Fourier kütle dönüştürücüsü

GABA : Gama Amino Bütirik Asit

GAERS : Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg

GEFS+ : Febril nöbetli jeneralize epilepsi

GHB : Gamma hidroksi bütirat

HCl : Hidroklorik asit

Hip 1 : Hungtingtin interacting protein 1

Hip 1R : Hip 1 ile ilişkilili reseptör

Hsp : Isı şok proteini

IEF : İzoelektrik fokuslama

IGE : İdiyopatik Jeneralize Epilepsiler

ILEA : International League Against Epilepsy (Uluslar arası Epilepsiyle Savaş Derneği)

IP3 : İnozitol trifosfat

IPSP : İnhibitör Post Sinaptik Potansiyel

IT : Düşük eşikli geçici Ca<sup>+2</sup> akımı

i.p. : Intraperitoneal

LGN : Lateral genikülat nükleus

LM : Luck Mass

LTP : Uzun süreli potansiyalizasyon

MALDI : Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonlaşma

MA : Moleküler ağırlığı

mGluR : Metabotropik Glutamat Reseptörü

MS : Kütle spektrometresi

mTLE : Mesial temporal lop epilepsisi

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> : Amonyum bikarbonat

NMD : Nonsense aracılı bozulma

NMDA : N-metil-D-Aspartat

NPF : Nükleasyon oluşturucu faktörler

N-WASP : Wiskott-Aldrich sendrom proteini

pI : İzoelektrik noktası

PLGS : Protein Lynx Global Server

PTM : Post-translasyonel modifikasyon

PTZ : Pentilentetrazol

RTN : Retiküler Talamik Çekirdekler .

S1 po : Primer somatosensor korteksin peri-oral bölgesi

S1FL: primer somatosensor korteksin forelimb bölgesi

S1HL : Primer somatosensor korteksin hind-limb bölgesi

SCG10: Süperior servikal ganglion 10

SDS : Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

SSS : Santral sinir sistemi

STMN:Stathmin

SWD : Spike-wave discharges (diken-dalga deşarjları)

TC : Talamokortikal

TEMED : Tetrametiletildiamin

TFA : Trifloroasetik asit

THIP : {4,5,6,7-tetrahidroisoksazolo[4,5,-c]piridine-3-ol}

TLE : Temporal Lop Epilepsisi

TOF : Doğrusal-uçuş-zamanı

TPR : Tetratrikopeptid tekrar protein

TSK : Tüberoz skleroz kompleksi

UV : Ultraviyole

VDAC1 : Voltaj bağımlı anyon kanalı 1

VDAC2 : Voltaj bağımlı anyon kanalı 2

VGLUT1 : Veziküler glutamat taşıyıcısı 1

VGLUT2 : Veziküler glutamat taşıyıcısı 2

WAG/Rij : Wistar Albino Glaxo/Rijswijk

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Absans nöbetlerin patofizyolojisinin şeması	10
Şekil 2.2. Tipik DDD'li WAG/Rij ırkı sıçan.	14
Şekil 2.3. Protein ürünlerinin oluşması için genomik bilgi akışı	16
Şekil 2.4. MS analizli proteomik çalışmalarının genel özeti	19
Şekil 2.5. MALDI lazer ışını katı matriksi uyarır ve analitleri iyonize eder. Uyarılan iyonlar MS'ne gider.	20
Şekil 2.6. ESI solüsyondaki peptidleri ve proteinleri iyonize eder ve buharlaştırır.	22
Şekil 2.7. a) Time-of-flight kütle analizörlü MALDI, b) TOF ve TOF reflektrometrik MALDI	22
Şekil 3.1.A. 6 aylık wistar sıçanlardan elde edilen EEG görüntüsü	30
Şekil 3.1.B. 6 aylık Wag/Rij sıçanlarda EEG'deki DDD görüntüsü	30
Şekil 3.2. Tablaya örneğin yayılması	34
Şekil 3.3. Elektrik akımının geçtiği tellerin üzerine elektrot kağıtlarının yerleştirilmesi	(wicks) 35
Şekil 3.4.A. Toplama jeli üzerine agar ilave edilmesi	36
Şekil 3.4.B. Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek, sabitlenmesi	36
Şekil 3.5. MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması	39
Şekil 4.1. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen iki boyutlu (2D) jel elektroforezi görüntüsü.	45
Şekil 4.2. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.	45
Şekil 4.3. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların gösterilmesi	46
Şekil 4.4. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların üç boyutlu (3D) görüntüsü	47

Şekil 4.5. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	47
Şekil 4.6. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	48
Şekil 4.7. 1 aylık Wag/Rij sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.	49
Şekil 4.8. aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.	49
Şekil 4.9. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	50
Şekil 4.10. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.	50
Şekil 4.11. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	51
Şekil 4.12. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.	52
Şekil 4.13. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	52
Şekil 4.14. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	53
Şekil 4.15. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.	54
Şekil 4.16. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.	54
Şekil 4.17. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen iki 2D jel elektroforezi görüntüsü	55
Şekil 4.18. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	55
Şekil 4.19. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	56

Şekil 4.20. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	57
Şekil 4.21. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen iki 2D jel elektroforezi görüntüsü	57
Şekil 4.22. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	58
Şekil 4.23. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	59
Şekil 4.24. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	59
Şekil 4.25. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	60
Şekil 4.26. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	60
Şekil 4.27. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	61
Şekil 4.28. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	62
Şekil 4.29. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	62
Şekil 4.30. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	63
Şekil 4.31. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	64
Şekil 4.32. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	64
Şekil 4.33. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	65
Şekil 4.34. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	66

Şekil 4.35. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	66
Şekil 4.36. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	67
Şekil 4.37. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	68
Şekil 4.38. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	68
Şekil 4.39. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	69
Şekil 4.40. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	70
Şekil 4.41. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	70
Şekil 4.42. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	71
Şekil 4.43. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	72
Şekil 4.44. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	72
Şekil 4.45. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü	73
Şekil 4.46. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	73
Şekil 4.47. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi	74
Şekil 4.48. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	75
Şekil 4.49. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	76



Şekil 4.50. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	76
Şekil 4.51. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	77
Şekil 4.52. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	78
Şekil 4.53. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	78
Şekil 4.54. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	79
Şekil 4.55. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	80
Şekil 4.56. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	80
Şekil 4.57. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	81
Şekil 4.58. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	82
Şekil 4.59. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	82
Şekil 4.60. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	83
Şekil 4.61. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	84
Şekil 4.62. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	84

Şekil 4.63. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	85
Şekil 4.64. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	86
Şekil 4.65. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	86
Şekil 4.66. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	87
Şekil 4.67. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	88
Şekil 4.68. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	88
Şekil 4.69. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	89
Şekil 4.70. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	90
Şekil 4.71. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	90
Şekil 4.72. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	91
Şekil 4.73. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	92
Şekil 4.74. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	92
Şekil 4.75. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	93

Şekil 4.76. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	94
Şekil 4.77. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	94
Şekil 4.78. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	95
Şekil 4.79. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	96
Şekil 4.80. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	96
Şekil 4.81. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü	97
Şekil 4.82. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması	98
Şekil 4.83. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği	98
Şekil 4.84. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü	99
Şekil 4.85. MALDI kütle spektrometresinin kalibrasyonu	100
Şekil 4.86. Kortekste türe bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1;P17209,P63043,Q5PPP1,Q62639, 2;P58821,Q66H45, 3;Q5M819)	107
Şekil 4.87. Myosin Light Chain 4'ün spektra görüntüsü (spot numarası:1)	108
Şekil 4.88. Stathmin-4'ün spektra görüntüsü (spot numarası:1)	108
Şekil 4.89. Neuron-Specific Vesicular Protein Calcyon ve Tetratricopeptide Repeat Protein 36'nın spektra görüntüsü (spot numarası:2)	108
Şekil 4.90. Phosphoserine Phosphatase'in spektra görüntüsü (spot numarası:3)	109

Şekil 4.91. CLTA protein ve GTP-Binding Protein Rheb'in spektra görüntüsü (spot numarası:1)	109
Şekil 4.92. Transmembrane Emp24 Domain-Containing Proteinin spektra görüntüsü (spot numarası:3)	109
Şekil 4.93. Talamusda türe bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1;BOBNK8,Q5MYW3, 2;P144668,Q68A21,Q9ES39,Q9QZP1, 3;P23457)	113
Şekil 4.94. Protein FAM46B ve 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 proteinin spektra görüntüsü (spot numarası:1)	114
Şekil 4.95. Annexin A5, Transcriptional Activator Protein Pur Beta, Nuclear Distribution Protein Nude Homolog 1 ve Survival of motor neuron protein-interacting protein 1'in spektra görüntüsü (spot numarası:2)	114
Şekil 4.96. 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase'in spektra görüntüsü (spot numarası: 3)	114
Şekil 4.97. Korteksde yaşa bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1;O35179,Q3L7M0,Q5BK22,Q5M965,Q6AXN9,Q812B7)	117
Şekil 4.98. Endophilin-A1'in spektra görüntüsü (spot numarası:1)	118
Şekil 4.99. Glycosyltransferase 6 Domain-Containing Protein 1'in spektra görüntüsü (spot numarası:1)	118
Şekil 4.100. GTP-Binding Protein 8, Probable Trna(His) Quanylyltransferase, R1b43a-Like With Coiled Coils Protein 2, Cathepsin Q2'nin spektra görüntüsü (spot numarası:1)	118
Şekil 4.101. Talamusda yaşa bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1; A1L108, Q498E2, Q9EQX9)	121
Şekil 4.102. Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 5-Like Protein, Uncharacterized Protein C8orf42 Homolog, Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 N'nin spektra görüntüsü (spot numarası:1)	122
Şekil 4.103.Memeli hücrelerindeki Rheb insulin/mTOR/S6K sinyal yolu	139

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Epilepsi ve Epileptik Sendromların Sınıflandırılması (ILEA 1989)	5
Çizelge 2.2. Epilepsideki kanal mutasyonları	6
Çizelge 2.3. İdiyopatik epilepsiler ile ilişkili bazı genler	11
Çizelge 2.4. GABAA reseptör altbiriminde oluşan mutasyon/varyanların ve polimorfizimlerin genetik epilepsilerle ilişkisi ve kabul edilmiş olan moleküler bozuklukları	23
Çizelge 2.5. Yaygın olarak kullanılan birkaç absans epilepsi modelleri	13
Çizelge 2.6. Önemli ve yaygın olarak görülen birkaç PTM'ler	17
Çizelge 2.7. UV lazerli MALDI'de başlıca kullanılan matriksler	21
Çizelge 2.8. Farklı tipteki MALDI MS'lerin karşılaştırılması	23
Çizelge 2.9. 2D-Elektroforetik haritaların veri tabanları	24
Çizelge 3.1. Deney grubunun kodlama düzeneği	28
Çizelge 3.2. MALDI kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptid karışımlarının kütleleri.	42
Çizelge 3.3. ZipTipC18 (Millipore) Protokolü	42
Çizelge 4.1. 1 aylık Wag/Rij sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	46
Çizelge 4.2. 1 aylık Wag/Rij sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	48
Çizelge 4.3. 1 aylık Wag/Rij sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	51
Çizelge 4.4. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	53
Çizelge 4.5. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	56
Çizelge 4.6. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	58
Çizelge 4.7. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	61
Çizelge 4.8. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	63

Çizelge 4.9. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	66
Çizelge 4.10. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen spot sayıları	jellerdeki 69
Çizelge 4.11. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	edilen 71
Çizelge 4.12. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	74
Çizelge 4.13. Grup içinde yapılan proteomik analizlerde jeller arasındaki % VK'sının gösterilmesi	75
Çizelge 4.14. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 77
Çizelge 4.15. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 79
Çizelge 4.16. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 81
Çizelge 4.17. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 83
Çizelge 4.18. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 85
Çizelge 4.19. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 87
Çizelge 4.20. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 89
Çizelge 4.21. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 91
Çizelge 4.22. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 93
Çizelge 4.23. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 95
Çizelge 4.24. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 97
Çizelge 4.25. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları	sıçanların 99

Çizelge 4.26. Korteks, hipokampus ve talamusda MALDI kütle tanımlanan proteinler	spektrometresi ile	101
Çizelge 4.27. Korteks, hipokampus ve talamusda MALDI kütle tanımlanan proteinlerde bulunan değişiklikler	spektrometresi ile	103
Çizelge 4.28. Kortekste türe bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi		105
Çizelge 4.29. Korteksde türe bağlı değişim gösteren proteinlerin özellikleri	fonksiyonel	106
Çizelge 4.30. Talamusda türe bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi		110
Çizelge 4.31. Talamusda türe bağlı değişim gösteren proteinlerin özellikleri	fonksiyonel	111
Çizelge 4.32. Korteksde yaşa bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi		115
Çizelge 4.33. Korteksde yaşa bağlı değişim gösteren proteinlerin özellikleri	fonksiyonel	116
Çizelge 4.34. Talamusda yaşa bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi		119
Çizelge 4.35. Talamusda yaşa bağlı değişim gösteren proteinlerin özellikleri	fonksiyonel	120

## 1.GİRİŞ

Epilepsi dünyada %1 prevalansa sahip olduğu öngörülen, yaygın ve ciddi nörolojik bir bozukluktur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2009 verileri dünyada yaklaşık 50 milyon epilepsili hasta olduğunu bildirmektedir. Epilepsi insidansı çocukluk çağında ve yaşlılıkta en yüksek düzeydeyken, erken erişkinlikte daha düşüktür (Zupec-Kania and Spellman, 2009).

Epileptik nöbet beyindeki nöronların anormal, aşırı veya senkron aktivitesinden kaynaklanan, geçici semptomlar olarak tanımlanırken, epilepsi kognitif, psikolojik, nörobiyolojik sonuçları ile sürekli bir epileptik nöbet oluşturmaya yatkınlık ile karakterize bir bozukluktur. Epilepsiler, primer (idiyopatik) ve belirlenebilen bir nedene bağlı olarak sekonder gelişebilir. Absans epilepsi idiyopatik jeneralize epilepsilerin tipik bir örneği olarak yaygın bir şekilde çalışılmıştır. Bu epilepsi tipinin birçok özelliğini yansıtan genetik hayvan modellerinin var olması, hastalığın nedenleri, fizyopatolojisi ile ilgili farklı tekniklerin kullanıldığı çok sayıda çalışmanın yapılmasına fırsat vermiştir.

Proteomiks teknolojisi, eksternal uyarılara veya gelişimsel değişikliklere, internal durumlara cevap olarak organizmanın veya dokunun ve hücrelerin değişen proteinlerini ve farklı protein ekspresyon profillerini görmemize yardımcı olarak, karmaşık biyolojik mekanizmaları aydınlatmaya aracılık eden güçlü bir teknolojidir. Şu ana kadar, deneysel ve klinik proteomiks çalışmalarında, özellikle temporal lobe epilepsisinde (TLE) gerek epileptik beyin bölgelerinde (biopsi ve otopsi örneklerinde) gerekse serebrospinal sıvıda çalışılmış olmasına rağmen, absans epilepsi ile ilgili olarak henüz az sayıda çalışma literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmalarda deneysel absans epilepsi modellerinden olan stg/stg mutant ve  $\gamma$ -butirolaktan ile indüklenen fare modellerinde, proteomiks tekniği kullanılarak talamustaki proteomlar incelenmiştir.

İnsandaki absans epilepsi ile benzerliklerinden dolayı geçerli bir genetik model olarak kullanılan Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) sıçanlarda elektroensefalografide (EEG) kendiliğinden görülen diken dalga deşarjları (DDD) 2-3 aylıkken ortaya çıkmakta iken, 6 aylık sıçanlarda tam olarak görülmektedir. Absans epilepsinin protein profilleri, absans epilepsi modeli olarak seçtiğimiz genetik bir model



olan WAG/Rij sıçanlarda daha önce hiç çalışılmamıştır. Ayrıca çalışmamızda WAG/Rij sıçanların, adı geçen çalışmalarda kullanılan deneysel modellerden farklı olması; bu alandaki veri çeşitliliğine katkısı ve yapılan bu çalışmaların sonucunda ortak ya da farklı bulunabilecek moleküllerin değerlendirilmesi yönüyle de önem arz etmektedir. Absans epilepsi ile ilişkili olabilecek protein ekspresyon profillerinin bilinmesi; tedavi seçeneklerini genişletecek yeni aday moleküllerin bulunmasına, epileptogenezisin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına aracılık edecektir. Ayrıca kullanılan yöntemin global protein ekspresyonunu göstermesi nedeni ile, epileptik durum ya da epilepsiye yatkınlık açısından biyobelirteçlerin (biomarker) saptanma olasılığı da mevcuttur.

Bu çalışmada, absans epilepsi modeli olarak kullanılan (1 aylık, 6 aylık) WAG/Rij ırkı sıçanlarda epileptogenez sürecinin, beynin üç farklı bölgesindeki (korteks, hipokampus ve talamus) protein profili üzerinde meydana getirdiği değişimlerin moleküler düzeyde proteomiks tekniği kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Epilepsi

Uluslararası Epilepsiyle Savaş Derneği (International League Against Epilepsy-ILAE) epileptik bir nöbeti “beyindeki anormal aşırı veya senkron nöronal aktivitesinden kaynaklanan, geçici semptomlar olarak” tanımlamaktadır. Epilepsi ise kognitif, psikolojik, nörobiyolojik ve sosyal durumun sonuçları ile sürekli bir epileptik nöbet oluşturmaya yatkınlık ile karakterize bir bozukluktur (Seino M, 2006). Epilepsi, primer olarak beynin tespit edilebilen bir hasarı veya risk faktörü olmadan ortaya çıkabildiği gibi, altta yatan başka nörolojik, sistemik, metabolik, toksik veya travmatik nedenlere sekonder olarak gelişebilir (Altay ve Bilir, 1999).

Epilepsi dünyada %1 prevalans sahip olduğu öngörülen, yaygın ve ciddi nörolojik bir durumdur. En yüksek insidans çocukluk çağında ve yaşlılıkta bulunurken, daha düşük düzeyleri erken erişkinlikte meydana gelmektedir (Zupec-Kania and Spellman, 2009). Epileptik nöbetlerin fonksiyonel anatomisi nöbet tipiyle yakından ilişkilidir; bazı nöbetler için başlangıç evrelerinde kritik olan ve gerektiğinde cerrahi müdahalede hedef olarak seçilen tek bir nöbet odağının varlığından bahsedilebildiği gibi, birden fazla bölgenin de sorumlu olabildiği nöbet şekilleri bildirilmektedir (Bertram EH, 2009).

### 2.2 Epilepsi Sınıflandırması

İlk olarak 1960'larda uluslararası epilepsi uzmanlarının bir araya gelmeleriyle epileptik nöbetlerin sınıflandırılmasının temelleri atılmıştır. Klinik bilgiler ve elektroensefalografi (EEG) değişikliklerine göre epilepsiler basitçe jeneralize nöbetler (tonik klonik, miyoklonik, absans gibi), parsiyel nöbetler (basit parsiyel, kompleks parsiyel gibi) ve sınıflandırılmayan nöbetler (uykuda oluşan bazı tonik klonik nöbetler gibi) olarak ayrılırlar (Altay ve Bilir, 1999).

ILAE'nin uzun yıllar süren çalışmaları sonucunda, 1989 yılında epilepsi ve epileptik sendromlar; nöbet tipi, etyolojisi, nöbeti uyaran faktörler, başlangıç yaşı, tedavi seçimi gibi faktörleri de kapsayacak şekilde yeniden sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.1). Bu

sınıflamada iki ana grup bulunmaktadır: İlk gruptaki epileptik sendromlar jeneralize epilepsileri, diğer grupta ise lokalizasyonla ilişkili epilepsileri içermektedir. Gerek jeneralize gerekse lokalizasyonla ilişkili epilepsiler kendi içlerinde nedene yönelik olarak idiyopatik (primer), semptomatik veya kriptojenik olarak ayrılırlar. İdiyopatik epilepsilerde herediter yatkınlık dışında altta yatan herhangi bir patolojik bir süreç yoktur. Semptomatik epilepsilerin ise bilinen veya şüphelenilen bir merkezi sinir sistemi bozukluğuna bağlı olarak geliştiği kabul edilir. Semptomatik olduğu düşünüldüğü halde sebebi bulunamayan epilepsilere de “kriptojenik epilepsiler” denir (Commission, 1989).

## **Çizelge 2.1.** Epilepsi ve Epileptik Sendromların Sınıflandırılması (ILEA 1989)

### 1. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler ve Epileptik sendromlar:

#### 1.1. İdiyopatik (yaşla ilişkili başlangıç)

- Sentrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- Oksipital paroksizimli çocukluk çağı epilepsisi
- Primer okuma epilepsisi

#### 1.2. Semptomatik

- Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsiyalis continua'sı
- Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize semptomlar
- Temporal lob epilepsisi
- Frontal lob epilepsisi
- Pariyetal lob epilepsisi
- Oksipital lob epilepsisi

#### 1.3. Kriptojenik

### 2. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

#### 2.1 İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç – yaş sırasına göre sıralanmıştır)

- Selim ailesel yeni doğan konvulsiyonları
- Selim yeni doğan konvulsiyonları
- Süt çocuğunun selim myoklonik epilepsisi
- Çocukluk çağı absans epilepsisi
- Jüvenil myoklonik epilepsi (impulsif petit mal epilepsi)
- Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsi
- Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler
- Belirli aktivasyon yöntemleri ile uyarılan epilepsiler

#### 2.2. Kriptojenik veya semptomatik (yaşa bağlı başlangıç – yaş sırasına göre sıralanmıştır)

- West sendromu
- Lenox – Gastaut sendromu
- Myoklonik astatik nöbetli epilepsi
- Myoklonik absanslı epilepsi

#### 2.3. Semptomatik

##### 2.3.1. Nonspesifik etyoloji

- Erken myoklonik ensefalopati
- Supresyon burst'lü erken infantil Epileptik ensefalopati
- Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler

##### 2.3.2. Spesifik sendromlar

### 3. Fokal ya da jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsiler

#### 3.1. Jeneralize ve fokal konvulsiyonlu epilepsiler

- Yeni doğan konvulsiyonları
- Süt çocuğunun ağır myoklonik epilepsisi
- Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken dalgalı epilepsi
- Edinsel Epileptik afazi (Landau – Kleffner sendromu)
- Diğer belirlenemeyen epilepsiler

#### 3.2. Net jeneralize ya da fokal konvulsiyon özelliği olmayanlar

### 4. Özel durumlar

#### 4.1. Duruma bağlı nöbetler

- Febril konvulsiyonlar
- İzole nöbet ya da izole status epileptikus
- Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

### 2.3. Epilepsinin Fizyopatolojisi

Epilepside çeşitli patofizyolojik mekanizmalar tanımlanmıştır. Bazı epileptik sendromlarda genetik faktörlerin rolü gösterilmiştir. Örneğin, gen mutasyonları anormal iyonik kanal fonksiyonlarına yol açabilmekte ve anormal ağ bağlantılarını fazladan etkileyebilmektedir (Stafstrom CE, 2006). Fakat monogenetik kalıtım şekilleri tanımlananlar (otozomal X'e bağlı, mitokondrial) hariç tutulursa, genetik analizler, fenotipik (aynı mutasyonun farklı klinik sendromlara neden olması) ve genotipik (farklı mutasyonların aynı sendroma neden olması) heterojenitenin işe karışması nedeniyle, epileptik sendromların kalıtım özelliklerini açıklamakta çoğu kez yetersiz kalmaktadır (Stafstrom CE, 2009). Birçok epileptik durum için kompleks veya poligenik kalıtım söz konusudur.

Tek gen epilepsilerinin çoğu, nöronal iyon kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Çizelge 2.2) (Sánchez-Carpintero Abad et al. 2007). İyon kanallarındaki mutasyonlar eksitator ve inhibitör nörotransmisyonun etkinliğinin değişmesine yol açmakta; bunun sonucunda eksitator nörotransmisyonun artmasına ya da inhibitör fonksiyonun kaybına neden olmaktadır (Kang and Macdonald, 2009 ).

**Çizelge 2.2.** Epilepsideki kanal mutasyonları

İyon kanalı	Gen	Fenotip	Kalıtım
Sodyum	SCN1B	GEFS <sup>9</sup>	Tek gen
	SCN1A	GEFS+/SMEI <sup>8</sup>	Tek gen
	SCN2A	BFNIC <sup>13</sup>	Tek gen
Potasyum	KCNQ2	BFNIC <sup>11</sup>	Tek gen
	KCNQ3	BFNIC <sup>12</sup>	Tek gen
	KCND2	mTLE <sup>21</sup>	Bilinmiyor
Klor	CLCN2	IGE <sup>22</sup>	Tek gen
Kalsiyum	CACNA1A	CPS, GTCS <sup>23</sup>	Tek gen
	CACNA1H	CAE, IGE <sup>24</sup>	Kompleks
	CACNB4	IGE	Kompleks
Asetil kolin reseptörü	CHRNA4	ADNFLE <sup>5</sup>	Tek gen
	CHRNA2	ADNFLE <sup>6</sup>	Tek gen
	CHRN2	ADNFLE <sup>7</sup>	Tek gen
GABA reseptörü	GABRG2	CAE/GEFS+FS <sup>10,26</sup>	Tek gen
	GABRA1	ADJME, CAE <sup>27,28</sup>	Tek gen

ADNFLE: Otozomal dominant nokturnal frontal lop epilepsi, BFNC: Benign ailesel neonatal konvulsiyonlar, BFNIC: benign ailesel infantil konvulsiyonlar, GEFS+: Febril nöbetli jeneralize epilepsi, SMEI: Süt çocukluğu dönemi şiddetli miyoklonik epilepsi, CPS: Kompleks parsiyel nöbetler, GTCS: Jeneralize tonik klonik nöbetler, mTLE: Mesial temporal lop epilepsisi, ADJME: Otozomal dominant juvenil miyoklonik epilepsi, CAE: Çocukluk çağı absans epilepsisi

İyon kanallarının dışında GABAerjik sisteme ait genetik bozukluklar tespit edilmiştir.  $\gamma$ -aminobütirik asid (GABA) beyindeki nöronal eksitabilitenin ana inhibitörüdür bu etkisini GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptörleri aracılığıyla, gerçekleştirir. GABA<sub>A</sub> reseptörleri pentamerik yapıdadır ve çeşitli altbirimlerin alttiplerinden ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ - $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  ve  $\rho 1$ - $\rho 3$ ) oluşmaktadır (Kang and Macdonald, 2009). GABA'nın GABA<sub>A</sub> reseptörüne bağlanması, kanalın açılmasına yol açarak klor iyonunun hücre içine girmesine izin verir. Bu da nöronal elektriksel aktivitenin hızlı bir şekilde inhibisyonunu sağlar (Dibbens et al, 2009). GABA'nın GABA<sub>B</sub> reseptörüne bağlanması ise potasyum akımını artırır, kalsiyum iyon girişini azaltır ve diğer nörotransmitterlerin presinaptik salınımını inhibe eder (Wallace R, 2002). GABA<sub>A</sub> iletimindeki azalmanın in vitro ortamda memeli neokorteksinde epileptiform aktiviteye neden olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, epilepsi gelişimi esnasında anormal GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin aşırı eksprese olduğu bulunmuştur. GABA<sub>B</sub> reseptörlerinin epilepsi ve nöbetlerdeki rolü net değildir. GABA<sub>B</sub> reseptörleri primer jeneralize epilepsiler ile ilişkilendirilmiştir ancak fokal epilepsilerdeki rolleri tartışmalıdır. GABA<sub>B</sub> reseptörlerinin blokajı in vivo da odyojenik nöbetlere duyarlı sıçanlarda nöbetlerin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte GABA<sub>B</sub> agonisti baklofenin prokonvulsan özelliği de gösterilmiştir (Teichgräber et al. 2009).

Sekonder epilepsi sendromlarında glutamaterjik sistem önemli bir yer tutmaktadır. Birçok epilepsi çeşidinin aşırı glutamaterjik sinaptik iletim bozukluğundan kaynaklanabileceği önerilmektedir (Alexander and Godwin, 2006). Glutamat, GABA'nın aksine beyindeki en önemli eksitator nörotransmitterdir (Moldrich et al. 2003). Sekiz adet metabotropik glutamat reseptörü (mGluR) bilinmektedir. Bu reseptörler, heterolog ekspresyon sistemlerindeki sinyal ileti mekanizmaları, sekans homologları ve farmakolojileri temel alınarak, üç grupta sınıflandırılmaktadır. Grup I, ikinci haberci sistemi olan diaçilgliserol (DAG) ve inozitol trifosfat (IP<sub>3</sub>)'ı oluşturan fosfolipaz C'yi aktive eden G $\alpha_q$  proteinle kaplı olan mGluR1 ve mGluR5'i içermektedir. Grup II

mGluR'leri iki ve üç alttıplerinden oluşmakta iken, grup III mGluR'leri de dört, altı, yedi ve sekiz alttıplerinden oluşmaktadır. Hem grup II hem de grup III mGluR'leri Gai proteini ile kaplıdır ve in vivo çalışmalarda iyon kanallarını düzenlediği gösterilmiştir (Ritzén et al. 2005).

Glutamatın veya iyonotropik glutamat reseptör agonistlerinin, beyin kesitlerinde ve hayvanlarda konvulsif ve nonkonvulsif nöbetlere neden olduğu bildirilmektedir. Üstelik epilepsili hastalardaki gibi hayvan modellerinde de, aşırı glutamaterjik aktivitenin belirtisi olan nöbet aktivitesi ile ilişkili olarak, glutamat ve aspartatın düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Alexander and Godwin, 2006). Epilepsinin kindled modelinde biyokimyasal ve elektrofizyolojik fonksiyonel ölçümler ile grup I reseptörlerinin upregüle olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kompleks parsiyel nöbetli hastaların hipokampusunda mGluR5'inde upregülasyonun olduğu bildirilmiştir. Aksine, pilokarpınle indüklenmiş status epileptikuslu kronik epileptik sıçanlarda hipokampal grup II mGluR'lerinde down regülasyonun olduğu gözlenmiştir. Kindled sıçanların hipokampal dilimlerinde grup III mGluR'lerinde bir down regülasyonun olduğu da bildirilmiştir (Meldrum and Rogawski, 2007).

Temporal lob yapıları, özellikle hipokampus, amigdala ve piriform korteks, nöbet oluşturan veya epileptogenezisi tetikleyen beyin hasarına en duyarlı olan beyin yapılarıdır (Aroniadou-Anderjaska et al. 2008). Hipokampus medial septal alandan yoğun kolinerjik innervasyon almaktadır. Hipokampal dilimlerde de muskarinik asetilkolin (Ach) reseptörlerinin aktivasyonunun senkronize nöronal boşalım paterni oluşturduğunu gösterilmiştir. Nikotinik Ach reseptör aktivasyonunun, hem eksitator hem de inhibitör modulatorleri etkileyebileceği öne sürülmektedir. Nörokimyasal deliller presinaptik Ach reseptörlerinin aktivasyonunun asetilkolin, GABA ve glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımını arttıracakını göstermektedir (Roshan-Milani et al. 2003).

Entorinal korteks, bazal ön beyinden gelen zengin kolinerjik innervasyona sahiptir. Son zamanlarda klinik ve deneysel veriler entorinal korteksdeki kolinerjik aktivitenin epileptiform boşalımları devam ettirebileceğine ve ilerletebileceğine dikkat çekmektedir. Kolinerjik modülasyondaki değişikliklerin epileptik temporal korteksde nöbetleri başlatabileceği de belirtilmiştir (Zimmerman et al. 2008). Birçok araştırmacı tarafından kolinerjik baskılanmayı takiben, artmış bir nöbet hassasiyeti veya artmış bir hipokampal nöbet aktivitesi bulunmuştur. (Jouveneau et al. 1996, 1997)'de hipokampusta kolinerjik

projeksiyonların ortadan kalkması ile GABAerjik ve inhibitör cevapların normal kalmasına rağmen, glutamat cevabında bir artışla sonuçlandığını göstermiştir (Craig et al. 2008).

## 2.4. Absans Epilepsi

Jeneralize nöbetlerin alt sınıfında yer alan absans nöbetler, belirgin motor görünüm olmadan kısa süreli bilinç kaybıyla seyreden nöbetlerdir. Esas olarak çocuklarda görülür. Tipik absansların başlangıcı ve sonu anidir. Beş saniye ile iki dakika arasında süren bir bilinç kaybı/bozukluğuna, EEG’de normal zemin aktivitesi üzerinde düzenli ve yüksek amplitütlü, bilateral senkron ve simetrik, 3 Hz’lik diken-dalga deşarjları (DDD) eşlik eder (Alexander and Godwin, 2006).

Absans epilepsi, idiyopatik jeneralize epilepsiler (IGE) arasında yaygındır. Absans nöbetlerin primer sebebi olarak, talamokortikal (TC) ritimdeki anormal salınımlar gösterilmektedir (Sitnikova and van Luijteleaar G, 2006). Talamokortikal sistem, absans nöbetler sırasında ortaya çıkan DDD’ ler gibi, yavaş dalga uykusunda da düşük frekanslı ossilatör aktivite göstermektedir. Bu yavaş ossilasyonların nöral substratları talamus ve korteksdır.

Talamusda, efferent projeksiyonlara dayanarak üç grup nöron bulunmaktadır (Broicher et al. 2008):

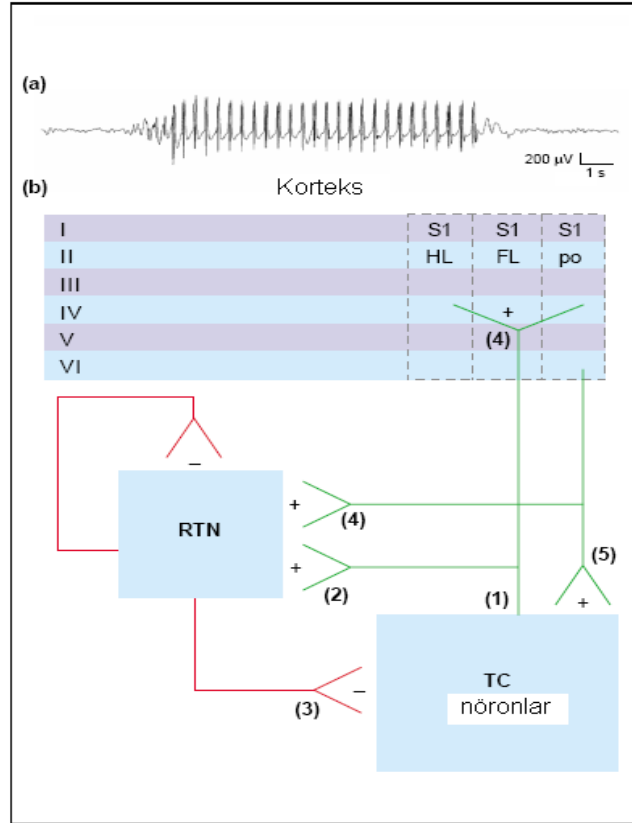
- 1) Sınırlı kortikal alanlara projekte olan spesifik nöronlar; Örn: Lateral genikülat nükleus (LGN)
- 2) frontal kortikal alanlar ve striatum başta olmak üzere daha geniş alanlara projekte olan spesifik olmayan nöronlar. Örn: intralaminar çekirdeklerin sentrolateral çekirdeği (CL))
- 3) TC relay çekirdekleri üzerine inhibitör etki gösteren ve *pace maker* aktiviteye sahip retiküler talamik çekirdekler (RTN).

Talamik nöronlar, ossilatör veya patlayıcı ateşleme modları arasında geçiş yapabilme yeteneğine sahiptir. Döngünün talamus ve korteks arasındaki bilgi akışını etkileyen ossilatör nöronal davranışı özellikle RTN ile yönlendirilmektedir. Talamusda yavaş ossilasyonlar retiküler nöronlar gibi talamokortikal relay nöronlarda patlayıcı ateşlenmelerle birlikte olmaktadır. RTN esasen GABA içeren, hem birbirlerine ile hem de



talamik relay çekirdeklere projeksiyonu olan nöronları içermektedirler (Manning et al. 2003).

Talamik nöronların patlayıcı tarzdaki ateşlenmeleri T tipi  $Ca^{+2}$  kanallarına bağlıdır (Broicher et al. 2008). TC nöronların ossilatör patlayıcı ateşlenmeleri DDD'lere neden olmaktadır ve düşük eşikli  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla TC nöronların içine  $Ca^{+2}$  'un girmesi ile bu ateşlenme oluşmaktadır (Kostopoulos, 2000; Kim et al. 2001; Porter and Nieves, 2004).



**Şekil 2.1.** Absans nöbetlerin patofizyolojisinin şeması.

TC nöronlardaki düşük eşikli geçici  $Ca^{+2}$  akımının ( $I_T$ ) aktivasyonu (1), RTN nöronlarında, spontan yüksek frekanslı aksiyon potansiyeli patlamalarına yol açar (2). Sonrasında GABA, talamik relay nükleuslarda TC nöronlarına salgılanır. Bu, artan bir şekilde T-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarından kaynaklanan inaktivasyonu ortadan kaldıran bir dizi inhibitör postsinaptik potansiyellerin (IPSP) üretimiyle sonuçlanır (3). Ardından gelen  $Ca$  aracılı *rebound* patlayıcı boşalmalar; RTN'de, primer somatosensör korteksin (S1 po) peri-oral, hind-limb (S1HL) ve forelimb (S1FL) bölgelerinde akson kollateralleri aracılığıyla eksitator postsinaptik potansiyellere (EPSP) neden olan eksitator amino asitlerin salınımını kolaylaştırır(4). Ayrıca inen kortikal projeksiyonlar da RTN ve TC nöronlarının aktivasyonuna, katkıda bulunur (5). Döngünün eş zamanlı görüntüsü, talamik nöronlardaki  $I_T$ 'nin aktivasyonunun, S1po başlangıç etkinliğinin bir sonucu olarak meydana geldiğini göstermektedir. Kırmızı çizgi inhibitör GABA içeren nöronları gösterirken, yeşil çizgi eksitator glutamatı içeren nöronları belirtmektedir (Manning et al. 2003).

IGE' ler belirlenen bir beyin lezyonu ya da metabolik bozukluk olmaksızın tekrarlayan nöbetlerle karakteridir. İkiz ve aile çalışmaları IGE' lerede genetik faktörlerin rol oynadığını göstermektedir. Gerçekte absans nöbetlerin gözleendiği epilepsilerin dahil olduğu birçok IGE sendromu basit bir mendelian bozukluk olmaktan öte kompleks bozukluk olarak kabul edilmektedir. Bu sendromlar sıklıkla genetik heterojenite ve tam olmayan penetrans gösterirler. IGE' li kişilerde farklı jeneralize nöbet şekilleri gelişebilir. Bu nöbetler jeneralize tonik klonik nöbetler, çocukluk çağı absans epilepsisi, juvenil absans epilepsisi ve juvenil miyoklonik epilepsisi gibi birkaç IGE sendromunda gözlenir (Fong et al. 1998, Sugimoto et al. 2000). Çizelge 2.3'de monojenik idiyopatik epilepsilerle ilişkili bazı genler gösterilmektedir (Berkovic et al. 2006).

**Çizelge 2.3.** İdiyopatik epilepsiler ile ilişkili bazı genler

<b>Monojenik idiyopatik epilepsi</b>	<b>İlişkili genler</b>
<b>Voltaj kapılı kanolopatiler</b>	
Benign ailesel neonatal nöbetler	K kanal genleri: KCNQ2, KCNQ3
Benign ailesel neonatal-infantil nöbetler	Na kanal genleri: SCN2A
Febril nöbetli jeneralize epilepsi (GEFS+)	Na kanal genleri: SCN1B, SCN1A
Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi	Na kanal geni: SCN1A
İşitme ile ilgili otozomal dominant parsiyel epilepsi	K kanal altbirimi: LGI1
<b>Ligand kapılı kanalopatiler</b>	
Otozomal dominant nokturnal frontal lob epilepsisi	Nikotinik Ach reseptör altbirim genleri: CHRNA4, CHRNB2
GEFS'li İdiyopatik jeneralize epilepsi	GABA reseptör altbirim geni: GABRG2

GABA<sub>A</sub> reseptörünün altbirimleri olan GABRA1, GABRB3, GABRG2 ve GABRD'de çoğu otozomal dominant geçişli mutasyon veya varyasyonlar çeşitli IGE sendromları ile ilişkili bulunmuştur (Çizelge 2.4). Febril nöbetler ve jeneralize epilepsili febril nöbetler sıklıkla sodyum kanalları SCN1A, SCN1B ve GABA<sub>A</sub> reseptöründe GABRG2 mutasyonları ile ilişkili iken; çocukluk çağı absans epilepsisi sıklıkla GABRB3 ve GABRG2 mutasyonları ile ilişkilidir (Kang and Macdonald, 2009).

**Çizelge 2.4.** GABA<sub>A</sub> reseptör altbiriminde oluşan mutasyon/varyanların ve polimorfizimlerin genetik epilepsilerle ilişkisi ve kabul edilmiş olan moleküler bozuklukları

Gen	Mutasyon/Varyant/Polimorfizm	Lokus	Kabul Edilen Mekanizması	Fenotipi
GABRA1	975delC, S326fs328X Mutasyonu	5q34	NMD, ERAD	CAE
GABRB3	-897 T/C polimorfizm	15q11-14	Azalmış Transkripsiyon	CAE
GABRB3	P11S mutasyonu	15q11-14	hiperglikozilasyon?	CAE
GABRB3	S15F mutasyonu	15q11-14	hiperglikozilasyon?	CAE
GABRB3	G32R mutasyonu	15q11-14	hiperglikozilasyon?	CAE
GABRG2	IVS6+2T-G mutasyonu	5q34	ekson atlama	CAE, FS

CAE: Çocukluk çağı absans epilepsisi, FS: febril nöbetler, ERAD: Endoplazmik retikulumla ilişkili degradasyon, NMD: nonsense aracılı bozulma

#### 2.4.1. Absans Epilepsinin Hayvan Modelleri

Absans epilepsinin hayvan modelleri; kimyasal olarak indüklenen hayvan modelleri (penisilin, gamma hidroksi bütirat (GHB), {4,5,6,7-tetrahidroisoksazolo[4,5,-c]piridine-3-ol} (THIP), düşük doz pentilentetrazol (PTZ), bikukulin, vs), tek gen mutasyonları ile oluşturulan fare modelleri (letharjik, stargezer, tottering, leaner, mocha, ducky) ve poligenetik sıçan modelleri (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS), WAG/Rij) olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (Çizelge 2.5) (Ishige et al. 1998, Manning et al. 2003, Khan et al. 2004).

**Çizelge 2.5.** Yaygın olarak kullanılan birkaç absans epilepsi modelleri

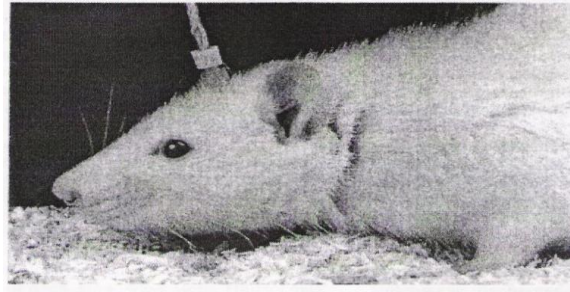
<b>Absans epilepsinin kimyasal olarak indüklenen hayvan modelleri</b>	<b>Türü</b>
Penisilin	Kedi
Düşük doz PTZ	Sıçan
THIP	Sıçan
GHB	Sıçan, kedi, maymun
AY9944	Sıçan
<b>Genetik fare modelleri</b>	<b>Kromozom ve ilişkili gen ürünü (Tek gen mutasyonları)</b>
Letarjik (lh/lh)	2. Kromozom, Ca <sup>+2</sup> kanalı, $\beta_4$ altbirimi
Stargazer (stg/stg)	15. Kromozom, Ca <sup>+2</sup> kanalı, $\gamma_2$ altbirimi
Tottering (tg/tg)	8. Kromozom, Ca <sup>+2</sup> kanalı, $\alpha_{1a}$ altbirimi
Leaner (tg la//tg la)	8. Kromozom, Ca <sup>+2</sup> kanalı, $\alpha_{1a}$ altbirimi
Mocha (mh/mh)	10. Kromozom, adaptor benzeri protein kompleksi AP-3, $\alpha_{1a}$ altbirimin $\delta$ altbirimi
Ducky (du/du)	9. Kromozom Ca <sup>+2</sup> kanalı, $\alpha_2\delta_{2a}$ altbirimi
<b>Genetik (poligenetik) sıçan modelleri</b>	
GAERS	
WAG/Rij	

Bazı kemirgen türlerinin EEG kayıtlarında kendiliğinden oluşan diken dalga deşarjları izlenebilmektedir. GAERS ve WAG/Rij sıçanlar, kendiliğinden DDD aktivitesi gösteren Wistar Albino Sıçanların inbred üretilmesiyle elde edilmişlerdir. Bu hayvanlarda absans nöbetler dışında nörolojik bir bozukluk tespit edilmemiştir. Farelerde DDD'ler

resesif yolla aktarılmıştır ve çeşitli nörolojik bozukluklarla da ilişkili olan farklı mutasyonların aynı EEG fenotipine yol açtığı gözlenmiştir. Örneğin, tottering farelerde  $\alpha_{1A}$  voltaj duyarlı kalsiyum kanal geninde bir mutasyon tesbit edilirken, lethargic farelerde kalsiyum kanalının  $\beta$  altbiriminde bir mutasyon saptanmıştır. Her iki fenotipte hem absans nöbetleri hem de ataksi, laterjik davranış ve motor anormallikleri içermektedir (Danober et al. 1998, Manning et al. 2003).

#### 2.4.2. Wag/Rij Modeli

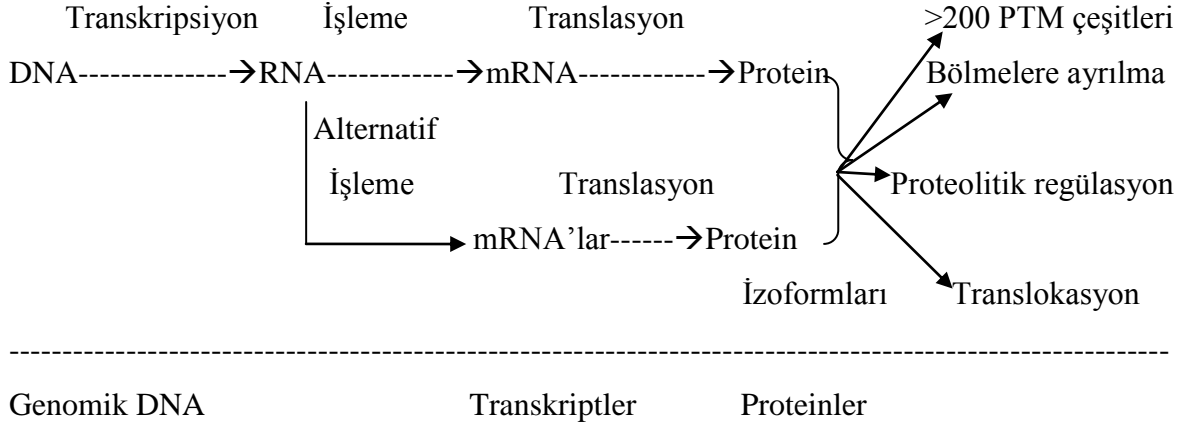
WAG/Rij sıçanlarda absans nöbetler 20 yıl önce tanımlanmıştır. Bu hayvanlar insandaki absans epilepsisi ile benzer farmakolojik ve klinik özellikler taşıması nedeniyle genetik absans epilepsi modeli olarak kullanılmaktadır (Sitnikova and van Luijtelaar, 2006, 2007). Homozigot çapraz yavrulamasıyla WAG/Rij sıçanlarda inbred nesil oluşmuştur. DDD'ler 7-10 Hz frekansa sahiptir. Amplitüdüleri 200-1000  $\mu V$ 'dur (Şekil 2.2) (Renier and Coenen, 2000). Kortikal EEG'de DDD'ler 2-3 aylıkken belirgin olurken daha erken yaşlarda görülmez. DDD sayısı ve süreleri yaşa bağlı olarak artmaktadır. 6 aylık sıçanlarda saatte 16-20 DDD deşarjları ortaya çıkmaktadır. Ek olarak da günde birkaç yüz DDD meydana gelmektedir. DDD'ler bilateral, simetrik ve jeneralizedir (Coenen and Van Luijtelaar, 2003 ). Absans nöbetlerin primer nedeni olarak TC ritimdeki bozukluklar bu hayvanlarda gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Tipik DDD'li WAG/Rij ırkı sıçan.

## 2.5. Proteomiks Teknolojisi

Proteomiks terimi, proteom (bir organizmanın eksprese olmuş protein grubu) çalışmasında artan bir ilgi alanı olarak 1997'de tanımlanmıştır (Rampitsch and Bykova, 2009). Proteomiks bir hücreden, dokudan veya organizmadan eksprese olan proteinlerin tespit edilmesine ve ayrılmasına, ko-translasyonel ve post-translasyonel olarak modifiye olmuş proteinlerin ve alternatif olarak splice olan varyantlarının tanımlanmasına olanak sağlayan yöntemdir (Guerrera and Kleiner, 2005, Brea et al. 2007). Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) çoğu ökaryot proteinlerin aktivitelerini düzenler. Bu modifikasyonların analizi çok zor olan sorunlar göstermektedir ancak bunların belirlenmesi biyolojik fonksiyonun anlaşılabilmesi için gereklidir (Mann and Jensen, 2003). Gen ekspresyon çalışmalarında oligonükleotid chipler (transkriptomiks) çalışılırken, proteomiks çalışmaları direk olarak belirli bir hücredeki gen ürünlerinin düzeylerini göstermektedir hatta protein aktivitelerini, etkileşimlerini, subsellüler dağılımlarını da nitelendirmektedir (Ong and Mann, 2005 ). Ancak genomun aksine proteom özel yerleşim gösteren ve sürekli olarak değişim gösteren moleküllerin etkin bir dizisinden oluşmaktadır. Oysa insan genomunun protein üretimi esnasında meydana gelen posttranslasyonel modifikasyonlar, dizi silinmeleri, alternatif yapıştırımlar nedeniyle yaklaşık olarak 32.000 farklı geni içerdiği tahmin edilirken, total proteomun proteom olarak tanımlanan bir milyonu aşkın farklı protein türlerini içerdiği tahmin edilmektedir (Ferrer-Alcón et al. 2009). Bu şekilde proteinlerin geniş bir aralıktaki modifikasyonları DNA sequenceslerinden tümüyle tahmin edilememektedir. Genom projesinden elde ettiğimiz verilerden genom tarafından kodlanan genlerin yaklaşık sayısını tahmin etmekteyiz. Ancak bunun asıl sayısını tahmin etmek birkaç nedenden dolayı zordur. Birinci olarak, ekson-intron'lar genomik DNA'dan doğru olarak tahmin edilememektedir dolayısıyla genomik bilginin belirli bir genin varlığının protein çalışmalarından elde edilen bilgiler ile entegre edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İkinci olarak ise transkriptin alternatif splicingi bir protein ürününden daha fazla ürün vermektedir. Bu nedenlerden dolayı mRNA veya genomun direk analizi bir hücredeki protein ürünlerinin tam sayısını yansıtmamaktadır. Üçüncü olarak da bölmelere ayrılma (kompartmentalizasyon) ve yer değiştirme (translokasyon)'den dolayı, aynı proteinin farklı özelliklerinin ve farklı fonksiyonlarının farklı yerlerde olabileceği bulunmuştur (Şekil 2.3) (Lau et al. 2003).



**Şekil 2.3.** Protein ürünlerinin oluşması için genomik bilgi akışı

Protein aktivitesi sadece protein biyosentezi ve protein yıkımı oranları tarafından kontrol edilmeyip, aynı zamanda proteinin lokalizasyonunun ve dayanırlılığının, moleküler etkileşimlerinin düzenleyicileri olan belirli ve seçici kovalent işlemler (PTM'ler) ile de kontrol edilmektedir (Jensen ON, 2004). PTM'ler bir proteinin proteolitik ayrılma özelliklerinin değişmesi veya bir veya daha fazla amino aside modifiye eden bir grubun eklenmesi ile oluşan kovalent işlemlerdir. Bir proteinin PTM'leri, proteinin aktivite durumu, lokalizasyonu, turnoverı ve diğer proteinlerle etkileşimi olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 2.6) (Mann and Jensen, 2003). Proteinlerin fosforilasyon, ubiquitinasyon ve glikozilasyon gibi PTM'leri proteinlerin ilişkilerini, yerleşimlerini, aktivitelerini ve fonksiyonlarını düzenleyen önemli biyolojik anahtarlardır (Shi et al. 2009). Örneğin, protein fosforilasyonunun hücrede sinyal transdüksiyon yolağında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (Lewis et al. 2000). Ubikuitinasyon; proteinin kararlılığında, hücresel lokalizasyonunda ve biyolojik aktivitesinde değişikliklerle sonuçlanabilmektedir. Ubikuitinasyon/deubikuitinasyon yolunu içeren genlerdeki mutasyonlar veya ubiquitinasyon sisteminin fonksiyonundaki bozukluk; metabolik hastalıklar, nörodejenerasyon ve çeşitli kanser tipleri gibi çok farklı insan hastalıkları ile ilişki olarak bulunmuştur (Choo and Zhang, 2009). Glikolizasyonun ise proteinin katlanmasını, lokalizasyonunu ve hareketini, çözünürlüğünü, antijenitesini, biyolojik aktivitesini ve yarılanma ömrü gibi hücre-hücre etkileşimlerini etkilediği bilinmektedir (Blom et al. 2004).

## Çizelge 2.6. Önemli ve yaygın olarak görülen birkaç PTM'ler

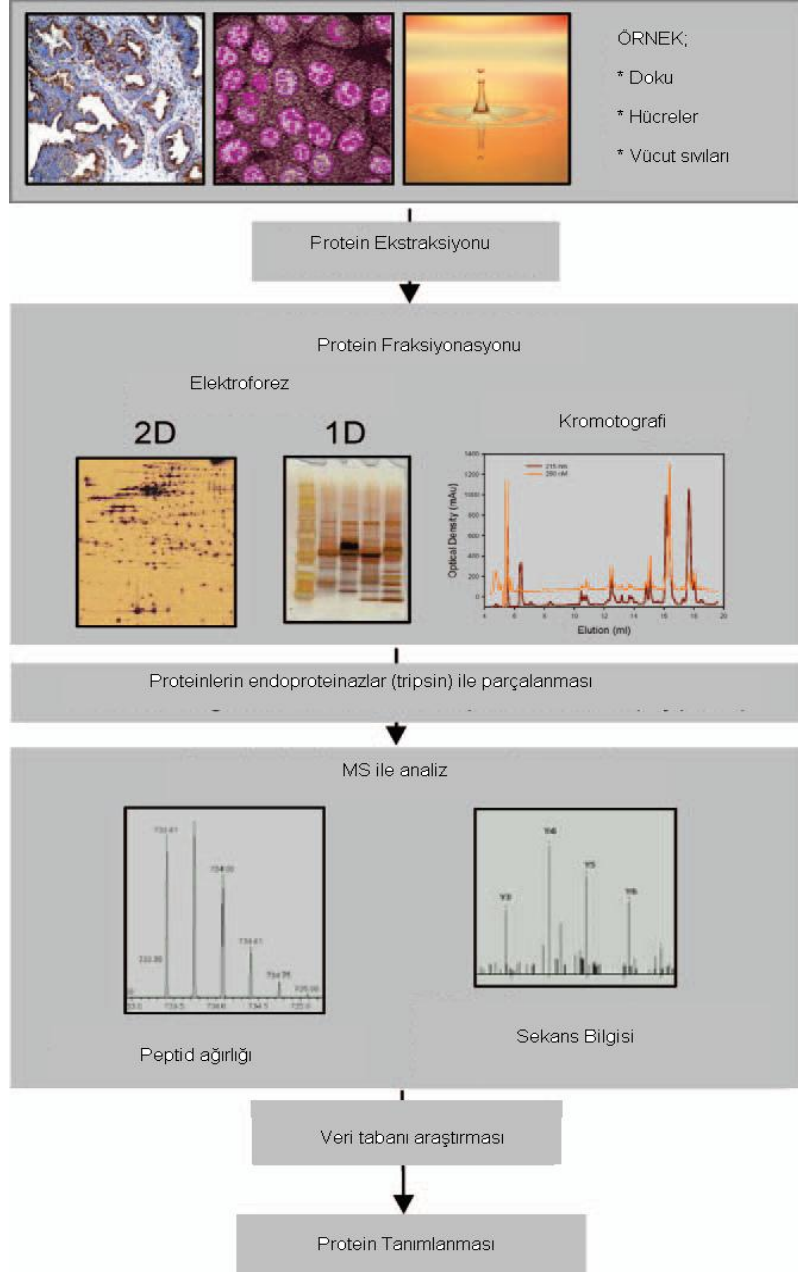
PTM tipi	Fonksiyonu
Fosforilasyon	Geriye dönüşümlü, enzim aktivitesinin aktivasyonu/inaktivasyonu, moleküler etkileşimlerin modülasyonu
Asetilasyon	Protein kararlılığı, N ucunun korunması, protein-DNA etkileşiminin düzenlenmesi
Metilasyon	Gen ekspresyonunun düzenlenmesi
Glikozilasyon	Geriye dönüşümlü, hücre-hücre tanınması/sinyal, vücuttan salınan proteinler, düzenleyici fonksiyonlar
Ubiquitinasyon	Sinyal yokluğu

Teknik olarak üç çeşit proteomiks sınıflandırılabilir. İlki örnekler arasında protein ifadelerin kantitatif çalışması olan ve hastalığa spesifik biyobelirteçlerin de tespit edilebileceği protein ekspresyon proteomiksidir. İkinci tipi yapısal proteomiksidir. Bu yaklaşımın temel amacı, protein komplekslerinin veya subsellüler lokalizasyonda veya organelde bulunan proteinlerin yapılarını ayrıntılarıyla göstermektir. Transkripsiyon esnasında çok büyük bir kompleks olarak iş yapan birçok proteinin olduğu transkriptom gibi bir kompleksde protein-protein etkileşimlerini veya nukleus ve kloroplast, mitokondri gibi bir kompartman içindeki tüm yapısal proteinleri veya protein türlerini tanımlayabilir. Üçüncüsü ise fonksiyonel proteomiksidir. Subsellüler alanlarda protein profillerinin analizi, moleküler düzeyde hücrelerin fonksiyonel organizasyonunu anlamamızı sağlayan önemli bir yaklaşımdır. Bir proteinin subsellüler lokalizasyonunun bilgisi, proteinin fonksiyonunu açıklamamıza yardımcı olabilir (Lau et al. 2003).

Proteomiks teknolojileri serumda, plazmada, idrarda, dokuda ve diğer biyolojik örneklerde hastalıklara özgün biyobelirteçlerin keşfi için çok büyük veri toplama yetenekleri göstermektedir (Mauri and Scigelova, 2009). Bir proteomda ayrılmış olarak gözükten proteinlerin iki boyutlu dizilimini gösteren en kolay ve en eski metod iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE)'dir. En çok yaygın olan bu teknik, izoelektrik odaklama (IEF) ve protein karışımlarını birinci boyutta izoelektrik noktalarına (pI) ve ikinci boyutta ise moleküler ağırlıklarına ayırımını gerçekleştiren denatüre edici sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezini (SDS-PAGE) birleştirmektedir (Rampitsch and Bykova, 2009). 2DE çalışmalarında iki örnekteki boyanan proteinler karşılaştırılır ve artarak veya azalarak regüle olan proteinler saptanır (Ong and Mann, 2005 ). 2-DE ayırma, olağanüstü



çözülme gücü ve artmış hassasiyeti, tekrarlanabilirliği, proteom analizinin verimliliği ve kantitatif analize izin veren çeşitli boyaların kullanılabilirliği ile dikkat çekmektedir (Shi et al. 2009). 2-D jel proteomiksin problemlerine gelince; komigrasyon (boyanmış bir spot, altında birden daha fazla protein içerebilmektedir), kimyasal heterojenite (membran ve nükleer protein gibi zayıf suda çözünebilir protein sınıflarının örnek olarak seçilmesi gibi), zaman alıcı işlemlerin olması, 10 kDa'dan daha küçük olan protein/polipeptidler için uygulanabilir olmaması ve yüksek hidrofobik proteinler için kullanımının hala sınırlı olması karşımıza çıkmaktadır (Thongboonkerd, 2007, Zhang, 2007). Proteinlerin 2DE ile ayrılmalarından sonra her bir jeldeki protein spotlarının miktarı yoğunluklarına göre hesaplanır (Yan and Chen, 2005). Proteinler tripsin veya diğer endoproteinazlar (kimotripsin, endoproteinaz-GluC, vs.) ile kütle spektrometresi (MS) analizi öncesi parçalanmaktadır (Wiśniewski JR, 2008). Tripsin karboksil ucundaki arginin ve lizin aminoasidinden ayırmaktadır (Olsen et al. 2004). Proteolizisi takiben, ayrılan peptidler jeldeki spotlardan geri alınır ve tanımlanmak üzere MS analizi yapılır (Yan and Chen, 2005, Locke et al. 2009). MS analizli proteomik çalışmalarının genel özeti Şekil 2.4'de gösterilmektedir (Wiśniewski JR, 2008).



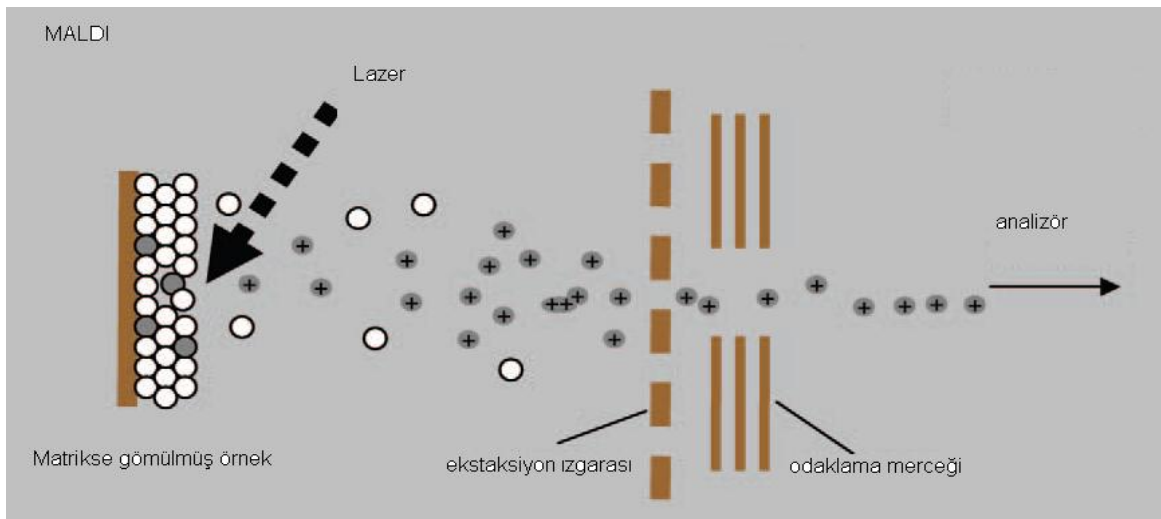
**Şekil 2.4.** MS analizli proteomik çalışmalarının genel özeti

MS hassasiyet, yüksek dinamik aralık, yüksek çözünürlük ve tüm yaşam bilim alanlarını kapsayan geniş bir spektrum için çok güçlü analitik bir araç olarak çok yönlü kullanılabilen bir dizi özelliğe sahiptir (Francese et al. 2009). MS teknolojisi proteinlerin uzamsal lokalizasyonlarını korumakla birlikte, yaklaşık olarak 2000-70.000 kütle aralığından daha fazla olan 100'den daha fazla proteinin belirlenmesine rutin olarak olanak sağlamaktadır (Reyzer and Caprioli, 2005).

Esasen, MS gaz fazındaki iyonların kütle/yük ( $m/z$ ) oranını ölçmektedir. MS analit molekülleri gaz fazındaki iyonlara dönüştüren bir iyon kaynağından, iyonize olmuş

analitleri  $m/z$  oranına göre ayıran bir kütle çözümleyicisi, ve iyonları her bir  $m/z$  değerine göre numaralandırıp kaydeden bir detektörden oluşmaktadır (Han et al. 2008). MS ölçümleri, solüsyondan moleküllere ya da bu evrede solid faza transfer eden bir metod ile gaz fazındaki iyonize olmuş analitler ile gerçekleştirilmektedir. En çok yaygın kullanılan iki teknik; matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonlaşma (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI)'dur (Guerrera and Kleiner, 2005). Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütle ve yüke sahiptir ve  $m/z$  değerlerinin yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir (Biberoğlu G, 2003).

MALDI lazer radyasyonlu bir matriks ile ko-kristalize olmuş proteinleri ve peptidleri iyonize etmektedir (Şekil 2.5) (Wiśniewski JR, 2008). Çoğu proteinleri, 10ng (50kDa'luk bir protein için 200 fmol), güvenilir bir şekilde MALDI tespit edebilmektedir (He and Chiu, 2003). Endüstriyel MALDI-TOF MS'ler emisyon kaynağı olarak ultraviyole (336 nm) veya infrared lazer ile donatılmışlardır. Ultraviyole (UV) lazerli bir MALDI'de başlıca kullanılan matriksler Çizelge 2.7'de özetlenmiştir (Sauer, 2007).



**Şekil 2.5.** MALDI lazer ışını katı matriksi uyarır ve analitleri iyonize eder. Uyarılan iyonlar MS'ne gider.

## Çizelge 2.7. UV lazerli MALDI'de başlıca kullanılan matriksler

---

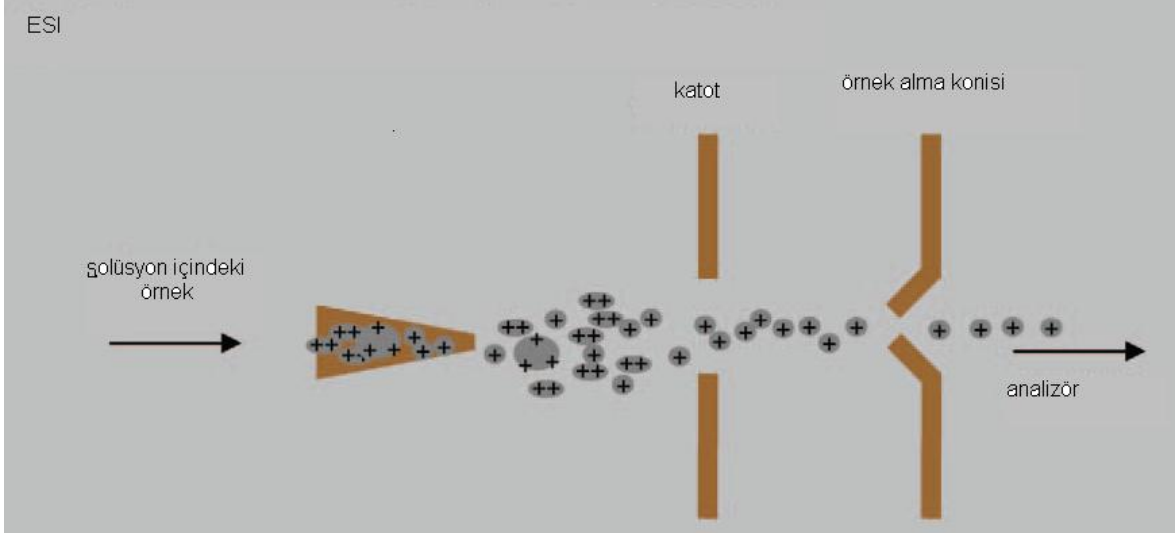
### Matriksler

---

Alfa- siyano-4-hidroksisinnamik asit  
Alfa- siyano-4-hidroksisinnamik asit-metil ester  
Orto-aminobenzoik asit  
Salisilamid  
2,3,4-Trihidroksiasetofenon  
2,4,6-Trihidroksiasetofenon  
3-metoksi-4-hidroksisinnamik asit  
3-hidroksipikolinik asit  
Pikolinik asit  
6-Aza-2-tiothimin

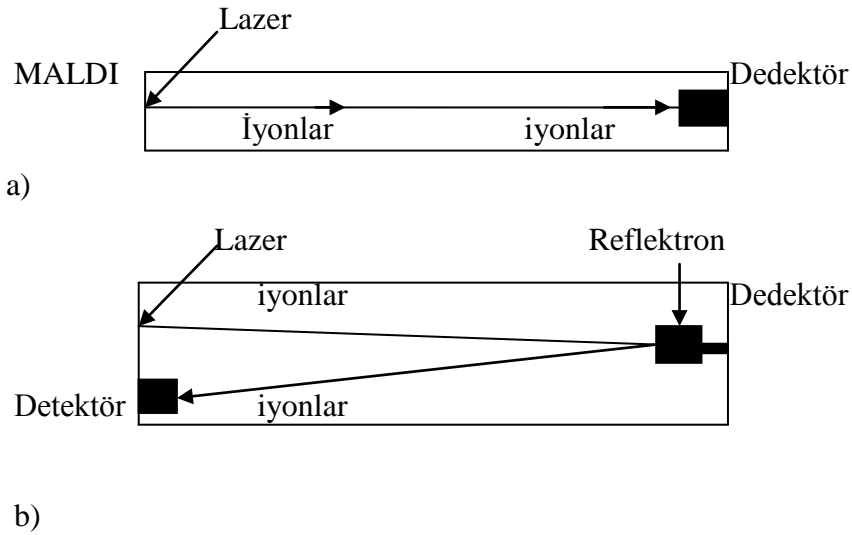
---

ESI bir solusyonun dışındaki peptid ve proteinleri iyonize etmektedir (Şekil 2.6) (Wiśniewski JR, 2008). Her iki metodda, hedef moleküllerin bütünlüğü yüksek doğruluklu kütle analizi ile korunabilmektedir (Liu et al. 2009). Peptid/protein analizinde en sık kullanılan matriksler küçük peptidler için alfa siyano-4 hidroksi-sinnamik asid ve daha büyük peptidler ve proteinler için 3,5-dimethoksi-4-hidroksi-sinnamik asiddir. Matriks analit karışımı hedef plakaya uygulanır. Çözücü buharlaşır ve matris ve analitler hedefte ko-kristalize olurlar. 337 nm'de bir lazer ışını (genellikle azot lazer), aromatik matris moleküller tarafından emilen ışık sağlar. Enerji daha sonra gaz fazı içine desorbe olan analite aktarılır (Jonsson, 2001).



**Şekil 2.6.** ESI solüsyondaki peptidleri ve proteinleri iyonize eder ve buharlaştırır.

MALDI'de iyonizasyon kaynağı olarak kullanılan üç çeşit kütle çözümlayicisi bulunmaktadır: bir doğrusal-uçuş-zamanı (TOF), bir TOF reflektron, Fourier kütle analizörü dönüşümü (Şekil 2.7a, b) (Lewis et al. 2000). TOF-MS esasen 35-40 kDa üzerindeki peptidlerin spektrası için kullanılmaktadır (Govorun and Archakov, 2002).



**Şekil 2.7. a)** Time-of-flight kütle analizörlü MALDI, **b)** TOF ve TOF reflektronlu MALDI

Doğrusal TOF kütle analizörü üç cihazın en basit olanıdır ve MALDI icadı ile bir rönesans kazanmıştır. TOF analizi, iyonların tümüne aynı miktarda enerjinin verildiği bir dedektöre doğru hızlanan bir dizi iyon dayanmaktadır. Ancak iyonlar aynı enerjiye sahip

olmalarına rağmen farklı kütlelerde olduğundan dedektöre ulaşma zamanları farklıdır. En küçük iyonlar hızlarının fazla olmasından dolayı dedektöre ilk ulaşırken daha büyük olan iyonlar daha büyük olan kütleleri yüzünden dedektöre daha geç ulaşmaktadırlar. Çözümleyiciye TOF denilmesinin sebebi kütlelerin iyonların uçuş zamanı ile belirlenmesidir. Fourier kütle dönüştürücüsü (FTMS), bir manyetik alan varlığında bir yörüngede dönen yüklü bir atomun prensibine dayanmaktadır. Farklı tipteki MALDI MS'lerin karşılaştırılması çizelge 2.8'de gösterilmektedir (Lewis et al. 2000).

**Çizelge 2.8.** Farklı tipteki MALDI MS'lerin karşılaştırılması

	TOF	TOF Reflektron	FTMS
Doğruluk	0.05–0.2% (50–200 ppm)	0.03% (30 ppm)	0.005% (5 ppm)
Rezolüsyon	2000	10 000	100 000
m/z oranı	>300 000	10 000	10 000
Tarama Hızı	ms	ms	s

Kantitatif proteomiks teknolojisi hızlı bir şekilde gelişmektedir ve biyolojik süreçlerin dinamik yapısını çalışmak için güçlü imkanlara sahiptir (Abu-Farha et al. 2009). Aslında proteomiks araştırmacılarının aktif olarak kapsamlı fonksiyonel analiz ve kompleks veri topluluklarının sistematik bilgisinin ortaya çıkarılması için biyoinformatikçilerle iş birliği içinde olmaları gerekmektedir (Kumar and Mann, 2009). MS (MALDI-TOF, MS/MS, MALDI-TOF-TOF) verileri elde edildikten sonra proteinlerin tanımlanması Mascot, Proteome Discoverer, Swiss-Prot gibi veri tabanları (Çizelge 2.9) aracılığı ile yapılmaktadır (Bairoch and Boeckmann, 1994, Govorun and Archakov, 2002, Lubec et al. 2005, Wiśniewski JR, 2008 ).

**Çizelge 2.9.** 2D-Elektroforetik haritaların veri tabanları

<b>İsim</b>	<b>Var olan Örnek jel görüntüleri</b>
SWISS_2DPAGE	İnsan karaciğer, plazma, plateletler, böbrek, vs
NIMH_NCI Protein Disease Database (PDD)	Plazma, idrar, serebrospinal sıvı
Argonne Protein Mapping Group (PMG)	Fare karaciğer, meme bezi hücre serisi, kanser vs.
HEART_2DPAGE	İnsan kalbi
HSC_2DPAGE	İnsan, fare ve sıçan kalbi
Mito_pick	İnsan mitokondri
Yeast 2D_PAGE	S. cerevisiae
2D PAGE Max_Planck_Institute	Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae

ESI'da nükleik asitlerin iyonları, kompleks bir yükü desteklenen desolvasyon süreci ile çözüldüğüden çıkarılmaktadır. ESI'nın verimi tuz kontaminasyonlarına karşı çok hassas olmasıdır (Hoffmann at al. 2009). ESI MS/MS'de, yüklü damlacıkların ince taneciklerini püskürtten 1ml peptid solüsyonu içeren bir mikrokapiller tüp ile kapiller ve MS girişi arasında potansiyel bir fark oluşturulur. Çözünmemiş peptid iyonlar çözücü yüksek bir vakum odasında buharlaşmış olarak şekillendirilir ve ilk MS taramasını üretmek için çözümlenirler (He and Chiu, 2003). ESI, rutinde DNA moleküllerinin ayrılmasını sağlamak amaçlı (sıvı) kromatografi ile birleştirilmiş olarak kullanılabilir. ESI büyük moleküllerin(> 20 kDa) belirlenmesinde kullanılabilir ayrıca küçük PCR ürünlerinin analizini yapmak için de uygulanmaktadır (Sauer, 2006).

## 2.6. Epilepside Proteomik Yaklaşımlar

Epilepsiler merkezi sinir sisteminin bir bölgesinde veya diğer bölgelerinde hipereksitabilite oluşturma yatkınlığı olan kompleks bir hastalık grubudur. Epileptik nöbet tipleri veya sendromları oldukça değişken olabilir ve birçok nedeni olabilir. Benzer şekilde altında yatan çeşitli hücresel ve moleküler mekanizmalar büyük olasılıkla çeşitli epileptiform aktivelerden sorumludur (Engel ve Pedley, 2008, s.217). Epilepsi ile ilgili uzun zamandan beri birçok çalışmanın yapılmış olmasına rağmen, epilepsinin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik ilerlemeler sınırlıdır. Proteomiks internal durumlara, eksternal uyaranlara veya gelişimsel değişikliklere bir hücre cevabındaki değişiklikler ile değişen proteinleri bulmamızı sağlayan bir tekniktir (Liu et al. 2009). Proteomiks; hastalıkların patogenezinin anlaşılmasına, hastalıkların tanısı için hedef biyobelirteçlerin geliştirilmesine ve hastalıkların erken belirlenmesine olanak sağladığından dolayı artan bir şekilde farklı araştırma alanlarda uygulanmaya başlamıştır (Ferrer-Alcón et al. 2009). Proteomiks teknolojileri ile epilepsi alanında yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda beyin dokusunda proteomik yaklaşımlar ile hastalıklarla ilişkili protein belirteçlerin tanımlanmasına, tanı veya diagnozda yardımcı olunabilmesine, ve spesifik ilaç terapisi için potansiyel hedeflerin seçilmesine dair araştırmalar yapılmıştır (Liu et al. 2009).

TLE'li hastaların serebrospinal sıvılarının proteomiks analizinin yapıldığı bir çalışmada; epilepsili hastalarda tetranektin, talin-2, apolipoprotein E, immunoglobulin lambda hafif zinciri(IGL@), immunoglobulin kappa değişken hafif zincir 1-5 (IGKV1-5), ve prokollajen C-endopeptidaz enhansır 1 (PCOLCE) proteinleri tanımlanmıştır (Xiao et al. 2009). TLE 'li hastaların superior temporal girusunda otopsi ve biyopsi örneklerinden yapılan çalışmalardan birinde de 209 protein tanımlanmıştır (Dumont et al. 2006). Başka bir çalışmada da yine TLE'li hastaların beyninde bulunan proteinlerin bir kısmı neurotransmitter metabolik ve glikolitik enzimleri, sitoprotektif proteinler, sitoiskelet proteinleri, apolipoprotein A-I olarak sınıflandırılmıştır (He et al. 2006). mTLE'li hastaların hipokampusunda tanımlanan proteinlerin bir kısmı "antioksidan proteinler (peroksiredoksinler 3 ve 6), şaperonlar (T-kompleks protein 1-alfa, stres ile indüklenen fosfoprotein 1), sinyal protein MAP kinaz kinaz 1, sinaptosomal proteinler (sinaptotagmin I, alfa-sinuklein), nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)-bağımlı deasetilaz sirtuin-2 ve 26S proteaz regülör subunit 7 protein, nöronal-spesifik septin 3" olarak sınıflanmış ve bu proteinlerin mTLE'li hastalarda değiştiği belirtilmiştir (Yang et al. 2006). Ayrıca mTLE'li



hastaların hipokampusunda Apolipoprotein A-I formunun arttığı yapılan bir proteomiks çalışmasında gösterilmiştir (Yang et al. 2005). TLE’li hastaların epileptik serebral korteksi ile aynı yaşta fakat epilepsili olmayan kontrolleri arasında yapılan bir proteom çalışmasında mitokondriyal tip Mn-superoksid dismutaz (Mn-SOD) tanımlanmış ve bu proteinin kontrole göre azaldığı bulunmuştur (Eun et al. 2004).

Yukarıdaki çalışmalardan da gözlenebileceği gibi hastalarda gerçekleştirilen proteomiks çalışmaları TLE’li hasta grubunda cerrahi olarak çıkarılan beyin dokularında gerçekleştirilmiştir. Deneysel epilepsi modellerinde TLE modellerinin yanı sıra az da olsa absans epilepsi modellerinin de proteomiks çalışmalarında kullanıldığı görülmektedir.

TLE’nin pilokarpin modelinde sıçanların hipokampusunda tanımlanan proteinlerin “sitoiskelet modifikasyonu, sinaptik fonksiyon, mitokondriyal disfonksiyon, iyon kanalları, şaperon” ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Liu et al. 2008). Status epileptikusun lityum pilokarpin modelinin uygulandığı sıçanların hipokampusunun proteom tekniği ile incelendiği bir çalışmada ısı şok proteini, dihidroprimidinaz ile ilişkili protein-2, sitoiskelet proteinleri, dihidropteridin redüktaz tanımlanmıştır (Greene et al. 2007). TLE’nin kindled modelinde sıçanların hipokampus proteomu incelenmiştir bu çalışma sonucunda voltaj bağımlı anyon kanalı 1(VDAC1), voltaj bağımlı anyon kanalı 2 (VDAC2) tanımlanmıştır (Jiang et al. 2007). Mitokondriyal sitokrom bc1 kompleksinin bir komponenti olan rieske proteini hem 2005 yılında kindled modelinde sıçan hipokampusunda hem de 2007 yılında epilepsili hastalarda tanımlanmıştır (Junker et al. 2005, Petcu et al. 2007).

Absans epilepsinin moleküler mekanizmasını protein düzeyinde daha iyi anlayabilmek adına yapılmış sadece iki proteomiks çalışması vardır. İlk çalışma absans epilepsinin  $\gamma$ -butirolaktan ile indüklenen fare modelinde farelerin talamusunda yapılmıştır ve bu çalışmada bulunan proteinler “sitoiskelet, nöronal korunma, nörotransmitter salınımı, kalsiyum bağlanması, metabolizma” ile ilgili olarak sınıflandırılmıştır (Ryu et al. 2007). Diğer çalışma absans epilepsinin deneysel bir modeli olan mutant stargazerlerin talamusunda yapılmıştır. Bu çalışmada tanımlanan proteinler “enerji metabolizma, stres cevabı, aksonal büyümenin regülasyonu, endoplazmik retikulum işlemleri” ile ilgili olarak sınıflandırılmıştır (Ryu et al. 2008).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Laboratuvarında (DETAB) üretilen genetik olarak absans epilepsili WAG/Rij ve Wistar ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışmamıza Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulundan onay verilmiştir (HAEK 6/4). Tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında [sabit ısı (20 ± 5°C) ve %40-70 bağıl nemli bir odada ventilizasyon sistemi altında], 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde, yiyecek ve içecek alımları serbest olacak şekilde barındırıldılar. Hayvanlar, steryotaksik cerrahinin ardından, bireysel kafeslerinde tutuldular. Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

A- Absans epilepsili 1 aylık WAG/Rij sıçanlar (n: 5)

B- Absans epilepsili 6 aylık WAG/Rij sıçanlar (n: 5)

C- Epileptik olmayan 1 aylık Wistar sıçanlar (n: 5)

D- Epileptik olmayan 6 aylık Wistar sıçanlar (n: 5)

Deney grubunun düzeneği her bir hayvan için üç farklı dokunun incelenmesi açısından kodlama yapılarak tekrardan isimlendirilmiştir, Çizelge 3.1'de her bir alt grup adına bir hayvanın örnekleme yapılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Deney grubunun kodlama düzeneği

<b>DENEY GRUBU</b>	<b>KODU</b>
<i>Absans epilepsili bir aylık Wag/Rij sıçanlar</i>	<i>AI</i>
1.hayvan	AI 1
1.hayvanın korteksi	AI 1A
1.hayvanın hipokampusu	AI 1B
1.hayvanın talamusu	AI 1C
<i>Absans epilepsili 6 aylık Wag/Rij sıçanlar</i>	<i>AII</i>
1.hayvan	AII 1
1.hayvanın korteksi	AII 1A
1.hayvanın hipokampusu	AII 1B
1.hayvanın talamusu	AII 1C
<i>Epileptik olmayan 1 aylık Wistar sıçanlar</i>	<i>AIII</i>
1.hayvan	AIII 1
1.hayvanın korteksi	AIII 1A
1.hayvanın hipokampusu	AIII 1B
1.hayvanın talamusu	AIII 1C
<i>Epileptik olmayan 6 aylık Wistar sıçanlar</i>	<i>AIV</i>
1.hayvan	AIV 1
1.hayvanın korteksi	AIV 1A
1.hayvanın hipokampusu	AIV 1B
1.hayvanın talamusu	AIV 1C

### **3.1. Deney Planı**

6 aylık Wistar ve WAG/Rij erkek sıçanlara EEG kaydı için steryotaksik alet yardımıyla epidural elektrot yerleştirildi. Bir haftalık dinlenme döneminin ardından, hayvanlardan 2'şer saat süre ile EEG kayıtları alındı. Kayıt işlemi tamamlandıktan sonra anestezi altındaki hayvanların kafaları kesilerek tüm beyin çıkartıldı; frontopariyetal korteks, hipokampus ve talamus bölgeleri izole edildi. WAG/Rij sıçanlarda 1 aylık dönemde absans nöbet aktivitesi gözlenmediği için 1 aylık yaş grubundaki WAG/Rij ve Wistar sıçanların EEG kaydı yapılamadı sadece beyin dokuları yukarıda tanımlandığı şekliyle alındı.

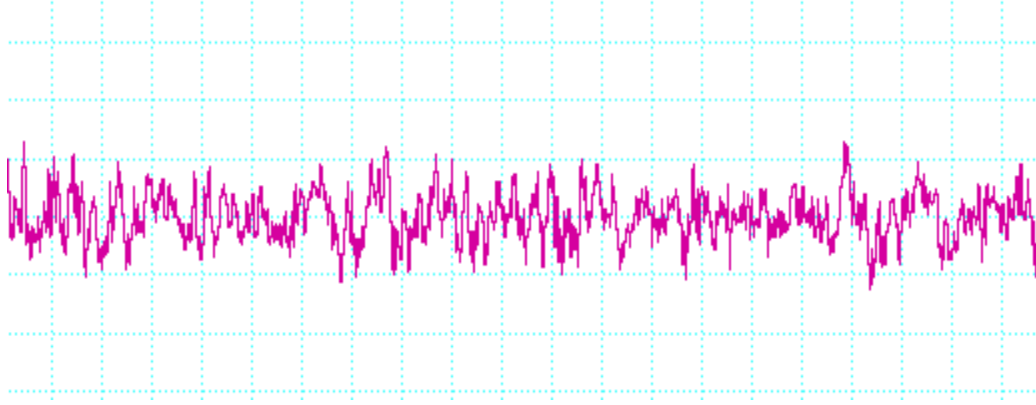
### **3.2. Cerrahi İşlemler**

Cerrahi işlemler sırasında 6 aylık Wistar ve WAG/Rij sıçanlara ketamin (100 mg/kg-ip) ve klorpromazin (1 mg/kg-ip) anestezi altında, steryotaksi aleti yardımıyla koordinatları Paxinos ve Watson atlasına uygun olacak şekilde tripolar EEG kayıt elektrotları yerleştirildi (Plastic Products Company, MS 333/2A). Elektrotlar, yerleştirildikten sonra dental akrilik yardımıyla kafatasına sabitlendi. Elektrot koordinatları aşağıdaki şekildedir;

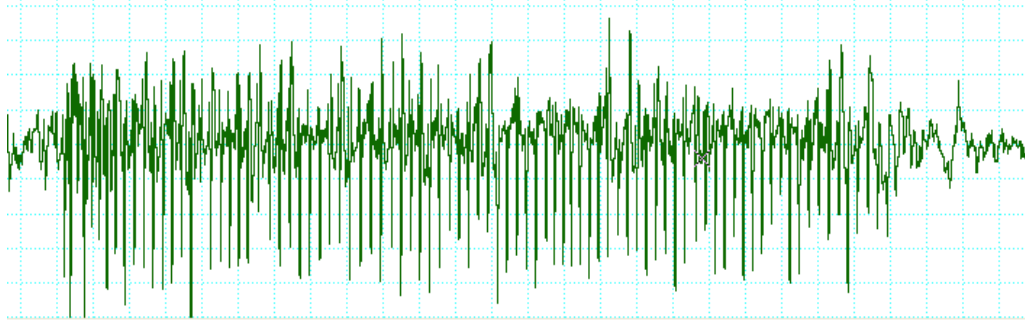
EEG kaydı için; AP 2.0, L 3.5 (frontal bölge), AP -6.0, L 2.0 (pariyeto-okspital bölge) ve referans elektrodu serebellum üzerinde olacak şekilde tripolar kayıt elektrodu yerleştirildi.

### **3.3. EEG Kayıtlarının Alınması**

EEG kaydı için elektrod yerleştirilmesinden sonra sıçanlar bir haftalık dinlenme periyoduna bırakıldılar. İkişer saatlik EEG kayıtları alındı (Şekil 3.1.A, Şekil 3.1.B). WAG/Rij sıçanlarda EEG 'de spontan olarak gözüken DDD'lerin sayı ve süresi değerlendirildi.



**Şekil 3.1.A.** 6 aylık Wistar sıçanlardan elde edilen EEG görüntüsü



**Şekil 3.1.B.** 6 aylık Wag/Rij sıçanlarda EEG'deki DDD görüntüsü.

### **3.4. Proteomiks Çalışması**

#### **3.4.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Bu çalışmada kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Bio-Rad, Merck, Fluka, Sigma, Applichem, Amresco, Molekula ve Fermentas gibi firmaların maddeleridir. Kullanılan kimyasallardan; Bovin serum albumin (BSA) protein miktar ölçüm tayininde; üre, tiyoüre, 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonyum]-1-propansülfonat (CHAPS), amfolit, diklorodifeniltrikloroetan (DTT) ve bromofenol mavisi (BBF) rehidratasyon tamponunda; üre, Tris-HCl, Sodyum dodesil sülfat (SDS), gliserol, DTT ve

iyodoasetamit dengeleme tamponlarında; hidroklorik asit (HCl), akrilamid, SDS, ultra saf su, amonyum persülfat ve tetrametiletildiamin (TEMED); Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jel dökümünde; agaroz SDS-PAGE tamponunda; asetik asit, metanol ve saf su fiksatif solüsyonunda; Sypro-Ruby boyası jel boyama işleminde; asetonitril (ACN), amonyum bikarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), formik asit ve tripsin enzimi tripsin ile muamelede kullanılmıştır.

### 3.4.2. Deneyde Kullanılan Araç ve Cihazlar

Deney ve analizlerde kullanılan araç ve cihazlar aşağıdaki sıralamada görülmektedir.

- ❖ Protein Miktar Ölçüm Spektrometresi (BİO-RAD SmartSpec 3000)
- ❖ Protein Miktar Ölçüm Spektrometresi, V-tabanlı plaklarda (ELİSA spektramax-M2)
- ❖ İzoelektrik odaklama, IEF (BİO-RAD Protean IEF cell)
- ❖ Elektroforez tankı, büyük jel için (BİO-RAD; Protean Plus Dodeca Cell)
- ❖ Güç Kaynağı (BİO-RAD Powerpac 1000)
- ❖ Dodeca sirkülasyon pompası (BİO-RAD variable speed pump)
- ❖ Dodeca soğutucu (POLYSCİENCE su banyosu)
- ❖ Görüntüleme (BİO-RAD VersaDoc)
- ❖ Kesici (BİO-RAD, Spot Cutter)
- ❖ Maldi kütle spektrometresi (Waters)

Ayrıca deneyler süresince;

- ReadyStrip IPG Strip Instruction Manual (BİO-RAD)
- Wicks Kâğıdı (BİO-RAD)
- Jel dökme aparatı (BİO-RAD Protean Plus multi-casting Chamber)
- Çalkalayıcı (HEİDOLPH unimax 1010)
- İnkübatör (MAJOR SCİENCE dry both)
- Mikropipet (GILSON)
- Vortex (LABNET)
- Santrifüj (BECKMAN COULTER microfuge 18 centrifuge)
- Soğutmalı santrifüj (SİGMA)
- Dondurucu, -20°C, -80°C (SANYO) kullanılmıştır.

### **3.4. 3. Deneyde Kullanılan Yöntemler**

Deneyde kullanılan yöntemler sırayla anlatılmıştır.

#### **3.4.3.1. Örneklerin elde edilmesi**

DETAB’da üretilen 1 aylık Wistar ve 1 aylık Wag/Rij, 6 aylık Wistar ve Wag/Rij erkek sıçanlar ketamin (100 mg/kg-ip) ve klorpromazin ksilazin (1 mg/kg-ip) anestezisi altında, dekapite edilerek frontopariyetal korteks, hipokampus ve talamus bölgeleri izole edildi. Ayrılan beyin bölgeleri endroflara konarak soğuk zincirde kuru buz içerisinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına iletildi. Örnekler - 80°C’ de muhafaza edildi.

#### **3.4.3.2. Bradford protein miktar tayini**

Gram miktarlarını bildiğimiz doku örneklerinin üzerine protein izolasyonu için 100 gram doku örneğine 40 µl lizis tamponu (Mops, sodium acetate, 0,5M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), pH 7,0) olacak şekilde ilave edilerek µl’deki total protein miktarı tayin edildi. Bio-Rad SmartSpec 3000 (küvetli) ve ELİSA spektramax-M2 (kuyucuklu tabakalı) spektrofotometreleri, sonuçların karşılaştırmalı olarak kullanılması amacı ile, örnekteki toplam protein miktarı tayininde kullanıldı.

#### **3.4.3.3. SmartSpec 3000 spektrofotometresi ile Bradford protein miktar tayini**

BSA ile çeşitli oranlarda standartlar hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bunun için; standartlar 1 ml’ sinde 250, 500, 750 ve 1000 µg protein içerecek şekilde ultra saf su ile hazırlandı (stok olarak hazırlanıp, +4°C’ de muhafaza edildi). Örnek sayısına göre miktar belirlenen 5X halde bulunan ‘‘Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate’’ boya, 1X haline dönüştürüldü, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Örneklerin içerdiği protein yoğunluğuna göre çeşitli konsantrasyonlarda stok örnekler hazırlandı (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:50,.....,1:100, 1:200,.....,1:500, 1:800). İçerisinde hiç protein bulunmayan kör (blank) suyla hazırlandı. Stok, örneklerden ve körden 10’ ar µl alınarak üzeri

etiketlenen temiz eppendorf tüplere alındı. Ardından üzerlerine hazırlanan 1X boyadan 490' ar µl konuldu. Örneğin boya ile etkileşmesi için 5 dakika beklenildikten sonra Bio-Rad Smartspec 3000 spektrofotometrede tek kullanımlık plastik küvetlerde 595 nm' de absorbanlarına göre protein miktarları ölçüldü.

#### **3.4.3.4. ELİSA spektramax-M2 (kuyucuklu plaka) ile Bradford protein miktar tayini**

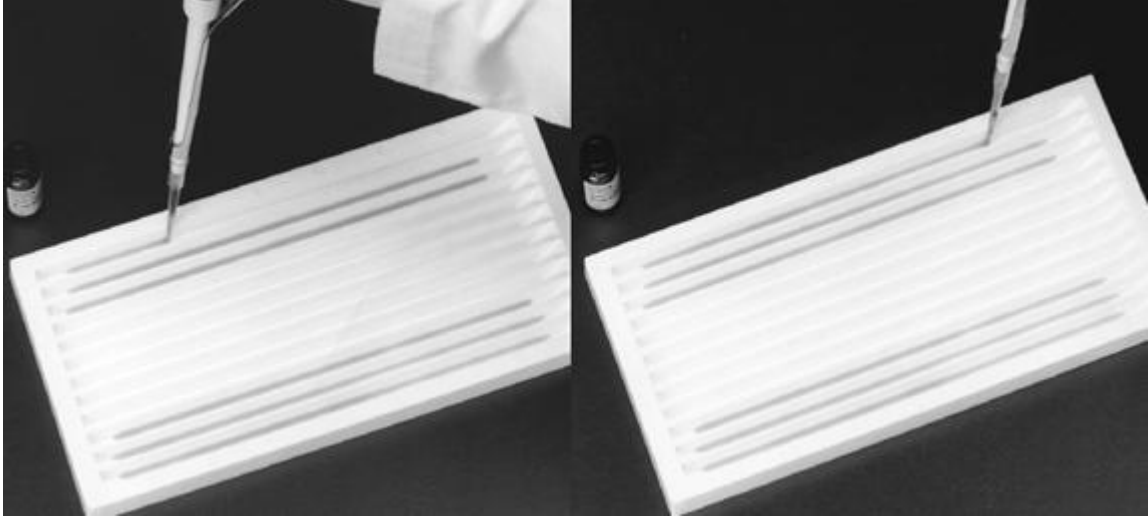
BSA ile çeşitli oranlarda standartlar hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bunun için; standartlar 1 ml' sinde 250, 500, 750 ve 1000 µg protein içerecek şekilde ultra saf su ile hazırlandı (stok olarak hazırlanıp, +4°C' de muhafaza edildi). Örnek sayısına göre miktar belirlenen 5X halde bulunan "Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate" boya, 1X haline dönüştürüldü, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Örneklerin içerdiği protein yoğunluğuna göre çeşitli konsantrasyonlarda stok örnekler hazırlandı (1:1, 1:5, 1:10, 1:30, 1:50,.....,1:100, 1:200,.....,1:500, 1:800). İçerisinde hiç protein bulunmayan kör (blank) suyla hazırlandı. Stok örneklerden ve körden 5' er µl alınarak kuyucuklu plakaya konuldu. Ardından üzerlerine hazırlanan 1X boyadan 245' er µl konuldu. Örneğin boya ile etkileşmesi için 5 dakika beklenildikten sonra ELİSA spektramax(M2) spektrofotometresinde tek kullanımlık plastik kuyucuklu plakalarda 595 nm' de absorbanlarına göre protein miktarları ölçüldü.

#### **3.4.3.5. Rehidratasyon**

Bu çalışmada pH 3–10 aralıklı 17 cm' lik lineer immobilize pH gradient (IPG) şeritler kullanılarak aktif rehidratasyon işlemi yapıldı. Kullanıma başlamadan önce şeritler oda sıcaklığında 15–20 dakika bekletildi. Alkonoks ile temizlenmiş 17 cm' lik anot/katot telli tablanın kanalları iyice kurulandı. Protein miktar tayininin ardından şerit uzunluğuna göre rehidratasyon tamponu ile orantılı olarak örnek karıştırıldı. Deneyde; örnekler 175 µg protein içerecek hacimde şeritlere rehidratasyon tamponu ile karıştırıldıktan sonra kanal köşesinden pipet yardımıyla tek bir çizgi halinde çekildi (Şekil 3.2). Üzerine; kullanıma hazır olan şeritlerin koruyucu bandı çıkarıldıktan sonra jel kısmı altta olacak şekilde yerleştirildi. Burada; anot/katot yönlenmesine dikkat edildi. Şeritlerin altında baloncuk



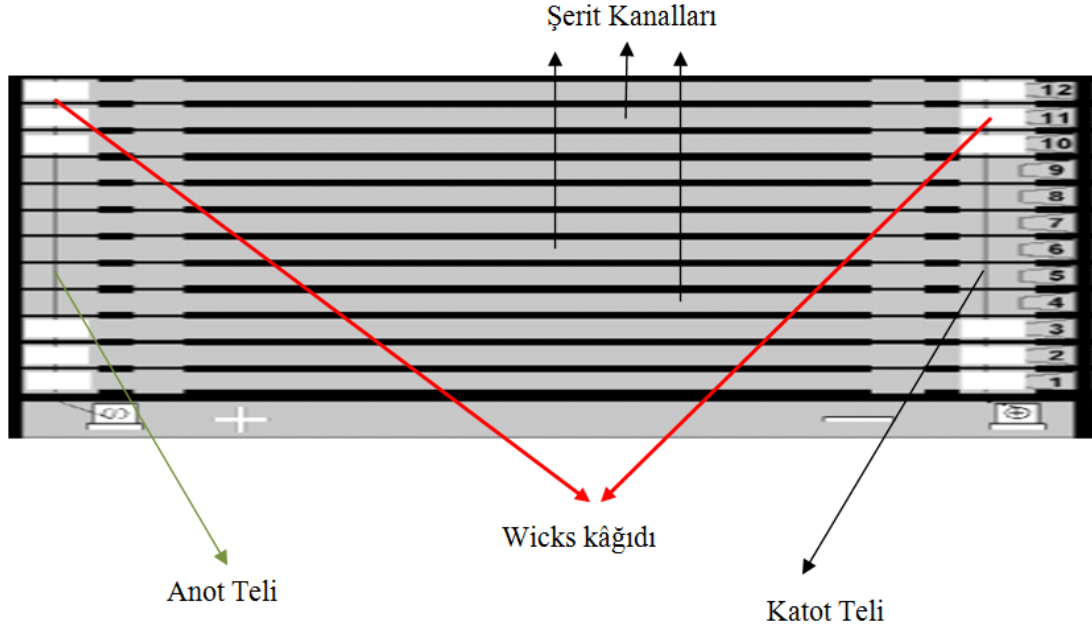
kalmadığından emin olunduktan sonra buharlaşmayı önlemek amacıyla şeritlerin üzeri kapanacak kadar (5–6 ml) mineral yağ ilave edildi. Aktif rehidratasyon; İzoelektrik odaklama (IEF) cihazında 20°C’ de, 50 V’ luk akım altında 12–16 saat sürdü.



**Şekil 3.2.** Tablaya örneğin yayılması

#### **3.4.3.6. IEF (1. Boyut)**

Rehidratasyonu biten örnekler IEF cihazından alındı, buharlaşmayı önlemek için kullanılan mineral yağı süzüldü. Temiz anot/katot telli bir tabla alınarak, akımın düzenli olması ve jeli yakmaması için tellerin üzerine Wicks kağıdı (ince uzun parçalara ayrılmış Whatman kağıdı) konuldu (Şekil 3.3). Wicks kâğıtları 10 µl ultra saf su ile ıslatıldı. Mineral yağından iyice temizlenmiş şeritler jel kısmı altta olacak şekilde anot/katot yönlenmelerine dikkat edilerek tablanın kanallarına yerleştirildi. Yine buharlaşmayı önlemek için şeritlerin üzeri mineral yağ ile kaplandı. Tablanın kapağı kapatılıp, IEF cihazına yerleştirildi. İzoelektrik odaklama; 17 cm’ lik şerit için 20°C’ de akım 250 V’ dan başlayarak, 3 saatte 10000 V’ a, 12- 14 saat içerisinde de 60000 V’ a çıkarak toplamda 15–17 saat kadar sürdü.



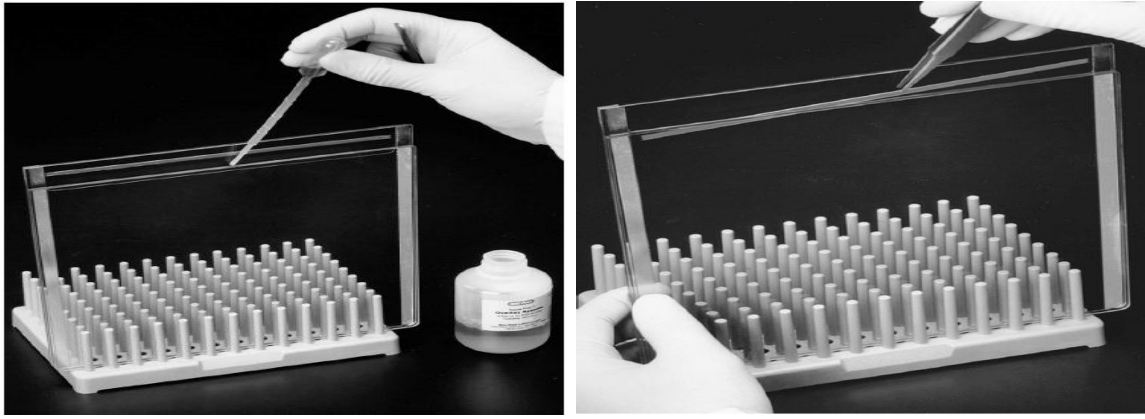
**Şekil 3.3.** Elektrik akımının geçtiği tellerin üzerine elektrot kağıtlarının (wicks) yerleştirilmesi

#### 3.4.3.7. SDS-PAGE (2.Boyut)

İkinci boyuta hazırlamak için izoelektrik odaklaması biten şeritlerin mineral yağı süzüldü. Ardından dengeleme tamponu I (1,5M Tris-HCl pH 8.8, 6M Üre, %20 v/v Gliserol, %2 w/v SDS, %2 DTT ) 17 cm' lik şerit başına 6 ml olacak şekilde ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre bitiminde dengeleme tamponu I süzüldü, şeritler temiz bir kanala alınarak üzerine yine 17 cm' lik şerit başına 6 ml olacak şekilde dengeleme tamponu II (1,5M Tris-HCl pH 8.8, 6M Üre, %20 v/v Gliserol, %2 w/v SDS, %2.5 İyodoasetamid ve iz miktarda BBF) ilave edildi. Dengeleme tamponu II ışığa duyarlı olduğundan tablanın üzeri alüminyum folyo ile kaplandı, 15 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre bitiminde dengeleme tamponu II süzülerek, şeritlerin ikinci boyuta hazır hale gelmesi sağlandı.

Deneyde; Protean Plus Dodeca Cell, Bio-Rad elektroforez tankı ile yürütme yapıldı. Bunun için; jel dökme aparatı, camları ve camlar arasına yerleştirilen asetatlar %70(v/v)' lik etil alkol ile Whatman kâğıdı yardımıyla iyice silindi. Whatman kâğıdının tüy bırakmaması için mümkün olduğunca katlanmadan kullanıldı. Jel dökme aparatı içerisine camlar düzgün bir şekilde yerleştirildikten sonra aparatın kapağı iyice sıkıştırıldı.

Daha önce hazırlıklarına başlanmış olan; ayrılma jeli (1.5M Tris-HCl pH 8.8, %40' lık Akrilamid, %10 w/v SDS, ultra saf su, %10 w/v Amonyumpersülfat, TEMED) %12' lik olacak şekilde hazırlanarak yavaşça fazla baloncuk oluşturmadan camlar arasına döküldü. Jel üzerindeki hava kabarcıklarını almak için %20(v/v)' lik izopropilalkol ilave edildi. Polimerleşme için 3–4 saat beklenildi. Whatman kâğıdı ile ayrılma jeli üzerindeki izopropil alkol temizlendi. Üzerine % 4' lük toplama jeli (0.5M Tris-HCl pH 6.8, %40' lık Akrilamid, %10 w/v SDS, ultra saf su, %10 w/v Amonyumpersülfat, TEMED) döküldü, 1–2 saat kurumaya bırakıldı. Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra taraklar çıkarıldı. Açılmış olan protein belirteç kuyucuğuna 10µl protein belirteci (Fermentas, ABD) yüklendi. Ardından %0,5 (w/v)'lik agar (içinde bir miktar izleme boyası-BBF içermekte olan) yardımı ile şeritler toplama jelinin başlangıç kısmına kadar itilerek yerleştirildi (Şekil 3.4.(A), Şekil 3.4.(B)).



(A)

(B)

**Şekil 3.4.** (A) Toplama jeli üzerine agar ilave edilmesi, (B) Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek, sabitlenmesi

Agar donduktan sonra camlar Protean Plus Dodeca Cell, Bio-Rad cihazına yerleştirildi. 1X SDS tamponu (10X SDS-PAGE yürütme tamponu 250 mM Tris, 192 mM Glisin, 10 g SDS 1L' ye tamamlanması ile hazırlanan), 11°C' de 120 V' da 17 saat yürütme yapılarak ikinci boyut ayırım gerçekleştirildi.

#### 3.4.3.8.Boyama ve Görüntüleme

Proteinlerin iki boyutlu elektroforez sonrası izoelektrik noktası ve molekül ağırlığı farkına göre ayrıldığını görebilmek için boyama işlemi yapıldı. Jelleri boya ile muamele

etmeden önce proteinlerin jele daha iyi tutunması ve jelin daha iyi boyanması için fiksasyon tamponu(%10 (v/v) Metanol, %7 (v/v) Asetik Asit, Ultra Saf Su) ile muamele edildi. Fiksasyon tamponu; 17 cm' lik jele 250 ml tampon olacak şekilde ilave edilip iki saat soğuk bir odada çalkalayıcı üzerinde bekletildi, süre bitiminde fiksasyon tamponu süzüldü. Fiksasyon tamponundan alınan jelin üzerine 250 ml *sypro-ruby* boyası, Bio-Rad ilave edildi ve soğuk odada çalkalayıcı üzerinde dört buçuk saat bekletildi. Süre bitiminde *Sypro-ruby* boyası süzüldü, boyamayı durdurmak ve sabitlemek için tekrardan 250 ml fiksasyon tamponunda 30 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu aşamadan sonra saf su içerisine alınan jel, kesim aşamasına kadar küflenmeden saklanabilmesi için bir damla asetik asit ilave edilerek ağzı kapalı karanlık ve soğuk bir ortamda saklandı. Boyaması biten jel, Bio-Rad VersaDoc görüntüleme cihazına konuldu. Bio-Rad PDQuest 8.0. programı aracılığıyla jelin görüntüsü alındı. Ardından; en iyi görüntünün alındığı kamera ayarları ve ışığa maruziyet süresi not edilerek, bütün jellerin görüntülerinin aynı ayarlarda alınması sağlandı.

#### **3.4.3.9. Jellerin Değerlendirilmesi**

Değerlendirme hem görsel hemde bilgisayar programı yardımıyla yapıldı. PDQuest 8.0 yazılımı kullanılarak yapılan analizlerde öncelikle jellerin aynı ayarda görüntüsünün alınıp alınmadığı kontrol edildikten sonra jel görüntülerinin aynı parlaklık ve seçicilikte olması sağlandı. Görünen jel resimlerinin aynı boyutta olması sağlanarak homojen bir analize zemin oluşturuldu. Jel görüntülerindeki zemin ve lekelerin düzeltilmesi işleminden sonra, analize hazır hale gelindi. Her bir örnek setinin kendi içinde yapılan analizleri sonucu yazılımın otomatik olarak en çok spot bulduğu görüntü, temel jel olarak seçildi. Jeller arasında yapılan kantitatif analizle aynı protein spotlarının yoğunluk farklanmaları tespit edildi. Kalitatif analizle jeller arasındaki farklı protein spotları tespit edildi. Elde edilen verilerde bütün protein spotlarının tek tek üzerine gidilerek üç boyutlu görüntüleri incelendi. Aynı anda karşılaştırılan jellerdeki spotların yoğunluk farklanmaları tek bir grafikte histogramları oluşturularak gösterildi. Yazılım sayesinde yapılan regresyon analizi dağılım grafikleri yardımıyla miktarı değişen spot sayıları belirlendi. pI ve molekül kütle kalibrasyonu ile spotların pI ile moleküler ağırlığı ( $M_A$ ) belirlendi.

### 3.4.3.10. Spot Kesimi

Bu aşamada; öncelikle jel spot kesim cihazına (Spot Cutter, Bio-Rad, ABD) yerleştirildi. PDQuest yazılımı yardımıyla jelin kesim cihazında tekrar görüntüsü alındı. Alınan görüntü üzerinden otomatik veya elle işaretleme yöntemiyle cihaza kesim yerlerinin komutları verildi. Tripsin ile muamele sırasındaki protokolün uzunluğu nedeniyle seçilen proteinlerden fazla nokta kesimi yapıldı. Örneğin; Kesim için seçilen protein spotu üzerindeki alandan on nokta spot kesimi yapıldı. 96 kuyucuklu temiz V-tabanlı plaka alındı, ultra saf su ile yıkandıktan sonra içerisine 200' er µl olacak şekilde ultra saf su (Merck) konuldu. Plaka cihazda ki yerine yerleştirildikten sonra cihaza uygulaması için verilmiş olan komutlar başlatıldı. Cihaz tarafından kesilen spotlar, komut verilirken ki işaretleme sırasına göre kuyucuklu plakaya A1→A12, B1→B12,.....,H1→H12 sırası temel alınarak, kuyucuklara yerleştirildi. Hemen tripsin ile muameleye başlanmayacak ise kuyucuklu plaka streç film ile kaplanarak +4°C' de muhafaza edildi.

### 3.4.3.11. Tripsin Enzimi ile Muamele

V-tabanlı plaka eğer daha önceden buzdolabında muhafaza edildi ise, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Tripsin ile muamele sırasında kullanılan bütün çözeltiler kullanılmadan önce 37°C' de ön ısıya tabi tutuldular. Çoklu elektronik pipet yardımıyla kuyucuklardaki su dikkatli bir şekilde çekildi. Kuyucuklar üzerine 50 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ve 50 µl ACN çözeltisi ilave edildi. 10 dakika 37°C' de inkübasyona bırakıldı. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekildi. Aynı işlem bir kez daha tekrar edildi. 50 µl ACN kuyucuklara ilave edildikten sonra 5 dakika 37°C' de inkübasyona bırakıldı. ACN, pipetle geri çekildi. 10 dakika 37°C' de plaka bekletildi. 50 µl 10 mM DTT( taze hazırlanmış) ve 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50:50) karışımından ilave edilip 30 dakika 37°C' de inkübasyonu sağlandı. 50 µl 55 mM iyodoasetamid (taze hazırlanmış) ve 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50:50) karışımından ilave edilip 20 dakika 37°C' de inkübasyona bırakıldı. Üzerlerine 100 µl ACN eklendi. 5 dakika 37°C' de bekletildi. Kuyucuklardaki tüm sıvı geri çekildi. 50 µl 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> kuyucuğa ilave edildi. 10 dakika 37 °C' de bekletildi. 50 µl ACN kuyucuklara eklendi, 5 dakika 37 °C' de bekletildi. Konulmuş olan solüsyonlar pipetle geri çekildi ve plaka 15 dakika oda ısısında bekletildi. 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> içerisinde 5 ng/µl tripsin olacak şekilde çözelti hazırlandı. Her kuyucuğa 30 µl bu çözeltilen ilave edilip, 30

dakika oda sıcaklığında beklendi. Plaka üzeri streç film ile kaplandıktan sonra 37°C’ de en az 4,5 saat en fazla 12 saat olmak üzere bekletildi. İşlem sonrası plaka 15–30 dakika soğuması için dışarı çıkarıldı. % 1 (v/v) formik asit ve % 2 (v/v) ACN olacak şekilde ekstraksiyon tamponu hazırlandı. Bu tampondan 30 µl kuyucuklara ilave edildi. Kapağı kapalı bir şekilde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kısa süreli bir santrifüj yapıldı. Sıvı faz temiz (PZR) plakasına çeker ocak altında aktarıldı. 12 µl ekstraksiyon tamponu ve 12 µl ACN kuyucuklara tekrardan eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra sıvı faz yine çeker ocak altında PZR plakasına ilave edildi. Liyofilizatörde ağzı açık bir şekilde PZR plakası 3–4 saat kurutmaya bırakıldı.

### 3.4.3.12. MALDI ile protein analizi

MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması aşağıda gösterilmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması

### 3.4.3.12.1. MALDI plakasının temizlenmesi

1. 4 adet temiz ve plaka için uygun büyüklükte beher hazırlandı.
  - 1. Behere % 3-4' lük 100 ml amonyum hidroksit çözeltisi kondu.
  - 2. Behere 100 ml ultra saf su kondu.
  - 3. Behere 100 ml metanol kondu
  - 4. Behere ise 100 ml ACN kondu.
2. Plaka 1. beher içerisine kondu ve en az 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi.
3. Süre bitiminde plaka 2. behere alındı ve en az 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi.
4. Ardından plaka 3. beher içerisine alındı ve ultrasonik banyoda 5 dk bekletildi.
5. Son olarak plaka 4. beher içerisine alınarak ultrasonik banyoda 5 dk bekletilir.
6. Süre bitiminde ağzı kapaklı bir kutuda kurumaya bırakıldı.

### 3.4.3.12.2. MALDI plaka kuyucuklarının temizlenmesi

Plaka üzerine yükleme yapılacağında kuyucuklar öncelikle (pipet yardımıyla) 3-4 µl ultra saf su ile yıkandı. Su uzaklaştırıldıktan sonra kurumayı hızlandırmak amacı ile tüm kuyucuklar, 1-1.5 µl ACN ile yıkandı.

### 3.4.3.12.3. CHCA( MALDI MATRİKSİ) Rekristalizasyonu

#### Önceden Hazırlanacak Kimyasallar:

- α- Siyano-4- hidroksisinnamik asid (CHCA), 99% (Sigma Aldrich).
- %37' lik HCl: 100 ml' lik sigma şişesine 40-50 ml kondu.
- 0,1 N HCl: 207µL %37' lik HCl' den çekildi 25 ml' ye ultra saf su ile tamamlandı.
- %25'lik Amonyum hidroksit: 100 ml' lik sigma şişesine 40-50 ml kondu.
- ACN

### **Protokol (100 mg CHCA için)**

1. 100 mg CHCA 1 ml ACN içinde çözüldü ardından vortekslendi ve ardından 14000 rpm' de 3-5 dakika santrifüj edildikten sonra ACN atıldı.
2. 100 mg CHCA üzerine 10 ml HPLC su eklendi.
3. 30-60 saniye ultrasonik banyoda sonike edildi.
4. Çözünmesine bağlı olarak 35-60 µl arasında %25' lik Amonyum hidroksit konud.
5. 30 s ultrasonik banyoda inkübe edildi.
6. 500-1000 g arasında 10-15 dakika santrifüj edildi.
7. Elde edilen pellet ileride tekrar yıkamak (üzerine rekristalize edilecek yazılı olarak) için -20°C' ye kaldırıldı. Süpernatant temiz tüpe alındı.
8. Süpernatant üzerine 1.5 damla %36-37' lik HCl asit damlatıldı. 1000 rpm' de santrifüj edildi. Çökme iyi ise süpernatant atıldı. Çökme iyi değil ise tekrar birkaç damla HCl ilave edilip santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet kaldı.
9. Pellet üzerine 10 ml 0.1 N HCl ilave edildi. 1000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
10. Pellet üzerine 2. kez 10 ml 0.1 N HCl ilave edilerek 1000 rpm' de santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
11. Pellete 3-5 ml ACN ilave edilip, çözüldü. Çözünmesi için vortekslendi
12. Çözünme işleminden sonra çözelti (darası önceden alınmış) ependorflara 250 µL olacak şekilde *alikuatlarına* ayrıldı.
13. Ependorflar ağzı açık biçimde 60-80 °C sıcaklıktaki etüve kondu. Sıvı tamamen buharlaşınca kadar 30 dakikada bir kontrol edilerek kurutma yapıldı.
14. Ependorflar tekrar tartıldı ve matriks miktarları ependorflar üzerine not edilerek -20°C' de saklandı.

### **Çözücü hazırlığı**

% 50 ACN, % 50 su ve % 0,1 Trifloroasetik asit (TFA) çözeltisi rekristalize edilmiş CHCA matriksi üzerine 1 mg/ 50 µl olacak şekilde ilave edilerek ZipTip protokolünde kullanılmak üzere hazır hale getirilir.



### **Protein kesim ürünlerinin hazırlanması**

MALDI kütle spektrometresinin kalibrasyonunun yapılmasında molekül ağırlığı bilinen peptid karışımları kullanıldı. Bunun için; Angiotensin, Substance P, Glu Fib, Renin-14 ve Adrenokortikotropin hormon (ACTH-18,39) peptitleri (Sigma) kullanıldı (Çizelge 3.2). Bu peptitlerin 1 mg/ml olan stok çözeltilerinden, 10-50 pmol peptit içerecek şekilde karışım hazırlanır ve çözücü ile (1:1) oranında karıştırıldıktan sonra MALDI plakasının *Luck Mass* (LM)' lerine spotlanır.

**Çizelge 3.2.** MALDI kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptid karışımlarının kütleleri.

<b>5 PEPTİD KARIŞIMI</b>	<b>KÜTLE-Da</b>
ANGİOTENSİN	1296,6853
SUBSTANCE P	1347,7360
Glu Fib	1570,6774
Renin-14	1758,9326
ACTH-18,39	2465,1989

### **Ziptip uç prosedürünün uygulanması**

MALDI kütle spektrometresinde yapılacak ölçümlerde kirlilikler önem kazanmaktadır. Dolayısıyla plakaya yüklenecek örneklerin kirliliklerinden ZipTip (Millipore) uç kullanılarak arındırılmış olması gerekmektedir. Çizelge 3.3.'de ZipTip protokolü gösterilmektedir.

**Çizelge 3.3.** ZipTip<sub>C18</sub> (Millipore) Protokolü

<b>SOLÜSYON TÜRÜ</b>	<b>ZipTip Solüsyonları</b>
Hazırlama Solüsyonu	% 100 ACN
Numune Hazırlama Solüsyonu	%0,1 TFA in ddH <sub>2</sub> O (pH<4)
Dengeleme Solüsyonu	%0,1 TFA in ddH <sub>2</sub> O
Yıkama Solüsyonu	%0,1 TFA in ddH <sub>2</sub> O (elektrosprey MS için %5 metanol ilave edilebilir)
Temizleme Solüsyonu	%0,1 TFA/ %50 ACN/%50 su (matriksli veya matriksiz)*

\*Deneyde matriksli çözücü kullanılmıştır.

## **Protokol**

1. **Ziptip** uc pipete takılarak, 10 µl' ye ayarlandı.
2. Bu uç hazırlama solüsyonu ile 2 defa pipetlenerek yıkandı.
3. **Ziptip** uç dengeleme solüsyonu ile 2 defa pipetlenerek yıkandı.
4. Spotlanacak peptit veya proteininin 10 µl' si temiz bir ependorfa standart pipetle kondu.
5. **Ziptip** pipet ucu bu ependorfa batırıldı, 7-10 defa pipetlenerek, proteinlerin ziptip içerisinde tutulması sağlandı.
6. Yıkama solüsyonunun 10 µl' si standart pipetle temiz bir tüpe kondu.
7. **Ziptip** uç yıkama solüsyonuna batırıldı, 4 defa pipetlenerek kirlilikler yıkandı.
8. 1-5 µl kadar temizleme solüsyonu standart pipetle temiz bir tüpe kondu.
9. **Ziptip** uç temizleme solüsyonu içerisine batırıldı, kabarcık oluşmayacak şekilde 3 defa pipetlendi.
10. Temizleme solüsyonuna aktarılan peptitler spotlanmaya hazır hale getirildi.

**Not:** MALDI kalibrasyonunda kullanılan protein kesim ürünleri MALDI plakasının Luck Mass kuyucularına Ziptip protokolüne maruz bırakıldıktan sonra spotlandı.

### **3.4.3.13. Proteinlerin Tanımlanması**

MALDI kütle spektrometresinden alınan kütle/yük (m/z) değerlerine uyan peptid kütleleri *Protein Lynx Global Server* (PLGS) programı aracılığıyla tanımlandı. Bunun için; PLGS programından MALDI metal plaka kuyucukları sırayla işaretlendi ve bu kuyucuklarda MALDI kütle spektrometresi tarafından okunmuş olan m/z değerleri, veri tabanları kullanılarak bilinen benzer peptitler ile otomatik olarak karşılaştırıldı. PLGS programı protein veri tabanlarında yaptığı araştırma sonucu eşleşen peptitleri verdi. Tanımlama aşamasında elde edilen proteinlerin hepsi sıçan kaynaklı proteinlerdi. Bu verilerden eşleştiği söylenen proteinlerin molekül ağırlığı 2DE jelle de karşılaştırılarak tanımlamanın doğruluğu tespit edildi.

#### **3.4.3.14. İstatistik**

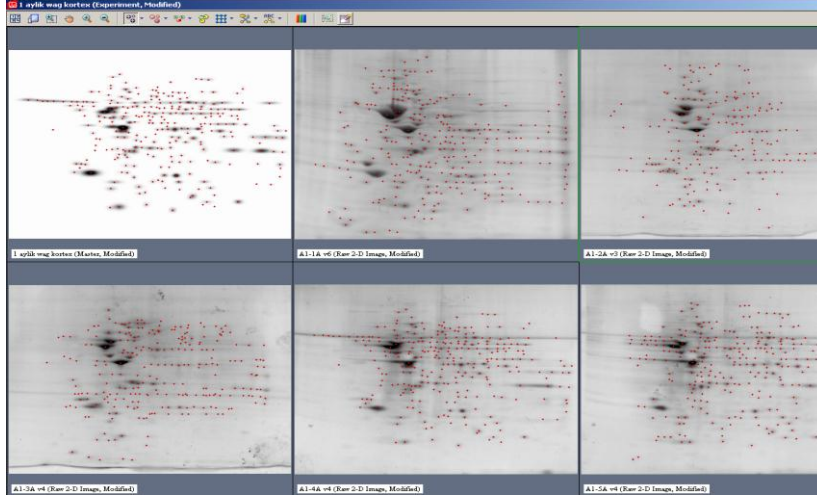
Sonuçlar “ortalama  $\pm$  standart hata” olarak ifade edildi. Deney ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında Student T testi kullanıldı.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

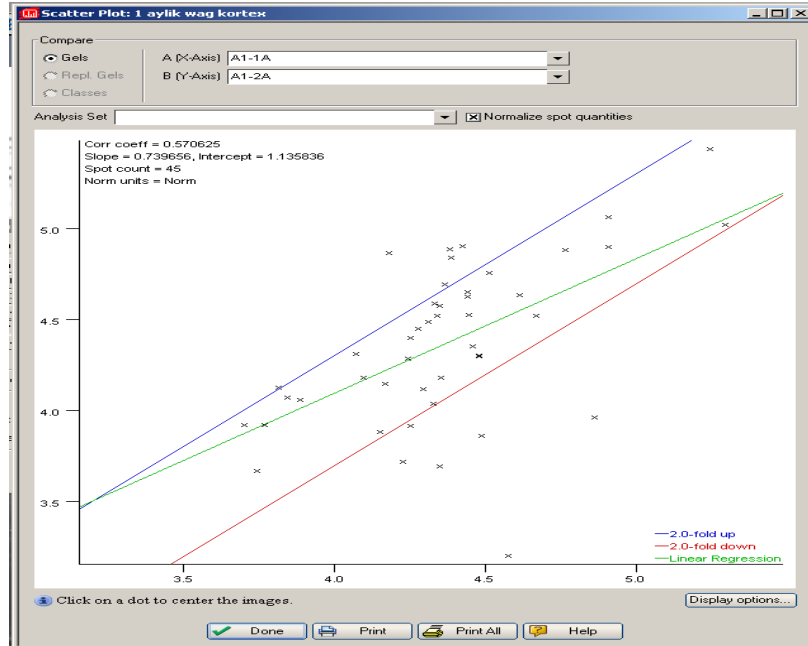
### 4.1. Grup İçinde Yapılan Proteomik Değerlendirmeleri

#### 4.1.1. 1 Aylık Wag/Rij sıçanların proteomik analizleri

##### 4.1.1.A. Korteksdeki proteomik analizler



Şekil 4.1. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen iki boyutlu (2D) jel elektroforezi görüntüsü.

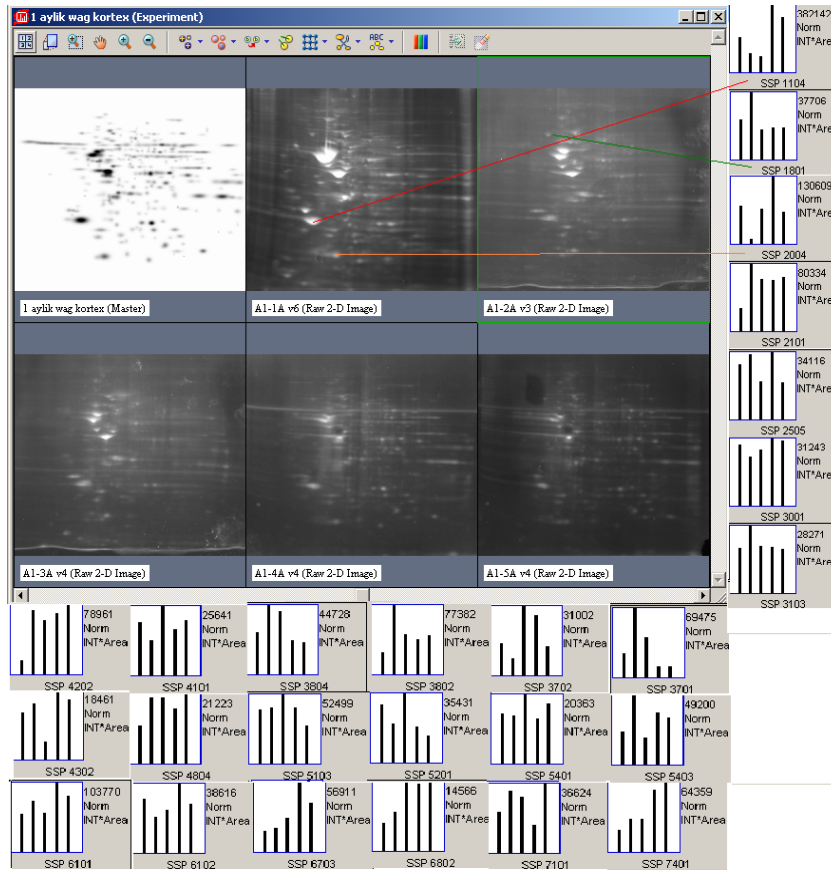


Şekil 4.2. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

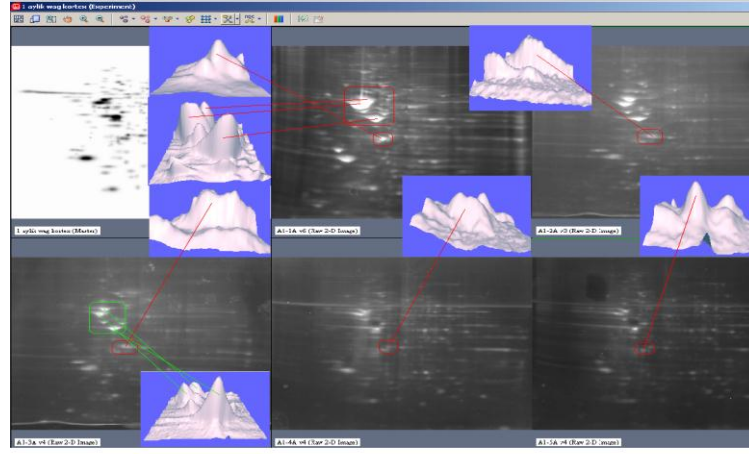
**Çizelge 4.1.** 1 aylık Wag/Rij sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN	
		SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A11A	279	103	179
A12A	200	80	125
A13A	251	85	160
A14A	280	280	0
A15A	278	153	124
Varyasyon kat sayısı % (V.K)= 13,3			

1 aylık Wag/Rij sıçanların korteks dokularında saptanan ortalama spot sayısı  $257,6 \pm 34.4$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 25'dir.

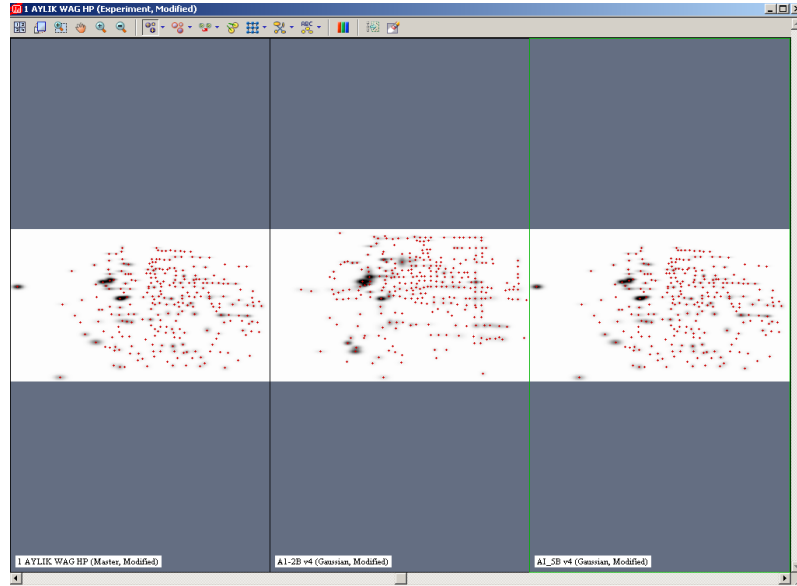


**Şekil 4.3.** 1 aylık Wag/Rij sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

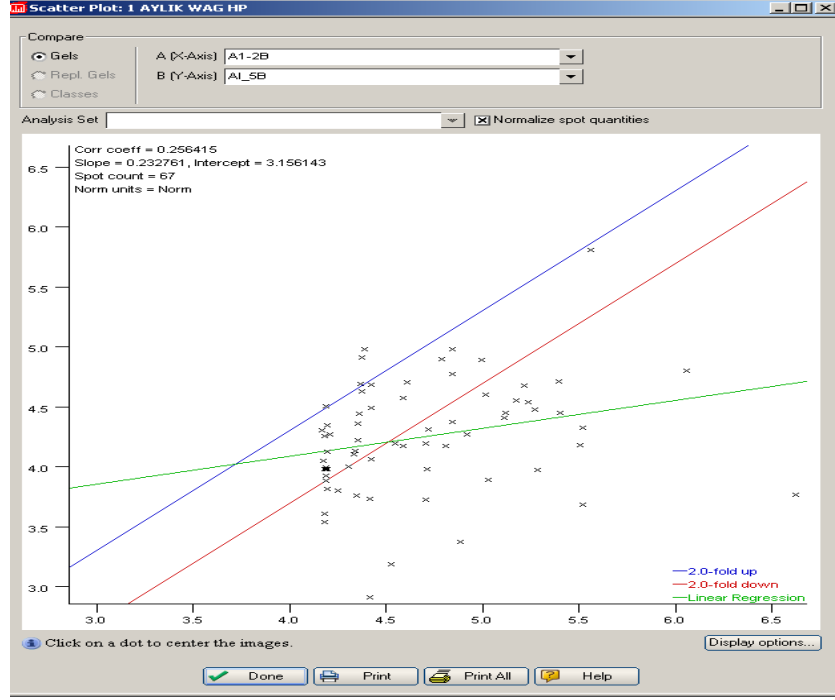


**Şekil 4.4.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların üç boyutlu(3D) görüntüsü.

#### 4.1.1.B. Hipokampusdaki proteomik analizler



**Şekil 4.5.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

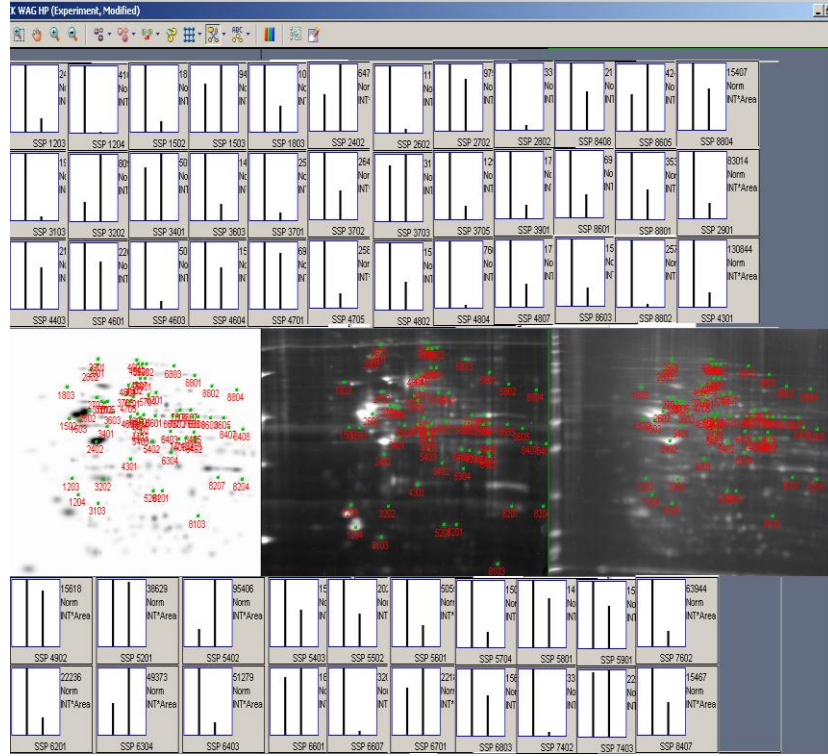


Şekil 4.6. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

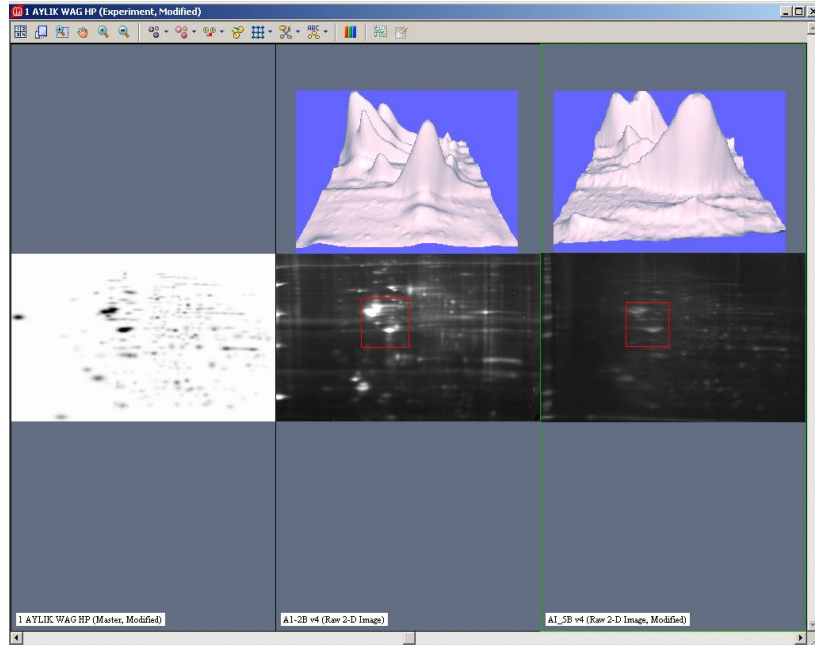
Çizelge 4.2. 1 aylık Wag/Rij sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN	
		SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A12B	309	68	241
A15B	264	264	0
% V.K= 11			

1 aylık Wag/Rij sıçanların hipokampuslarından saptanan ortalama spot sayısı 286,5  $\pm$ 31.8 olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 56'dır.



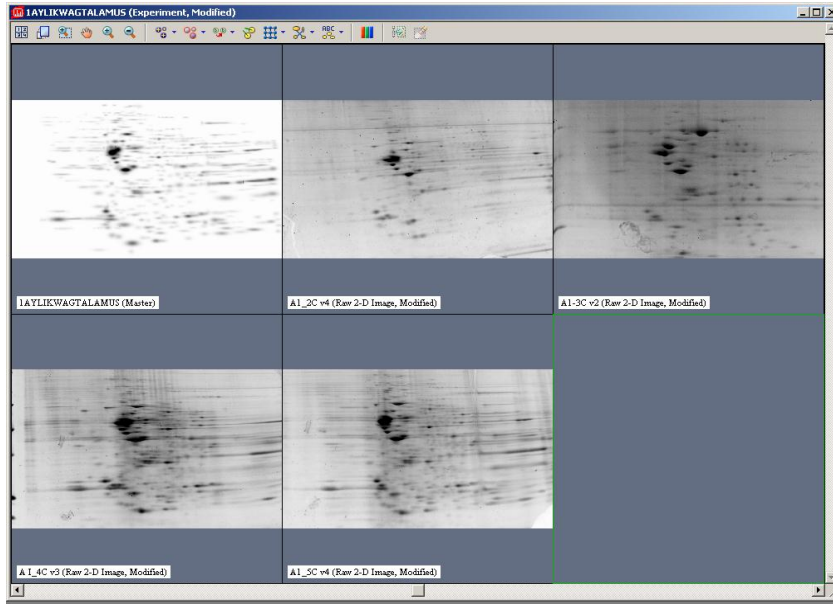
Şekil 4.7. 1 aylık Wag/Rij sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.



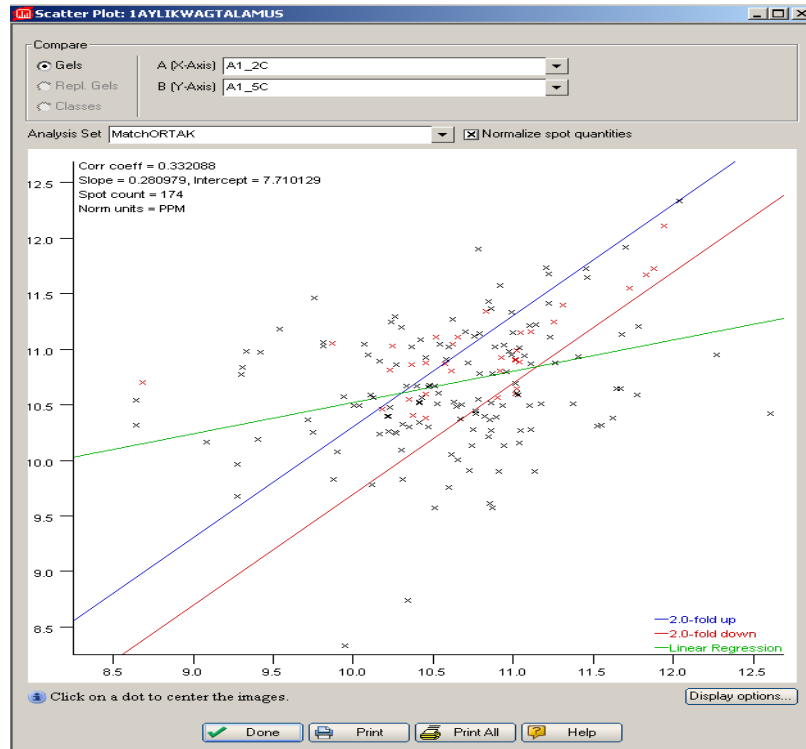
Şekil 4.8. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.



#### 4.1.1.C. Talamusdaki proteomik analizler



Şekil 4.9. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

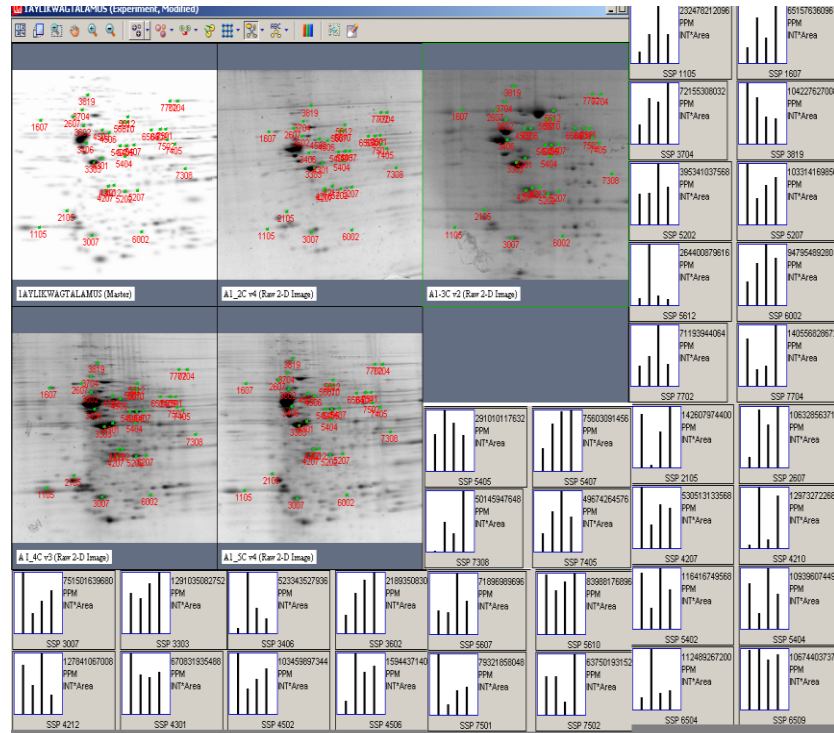


Şekil 4.10. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

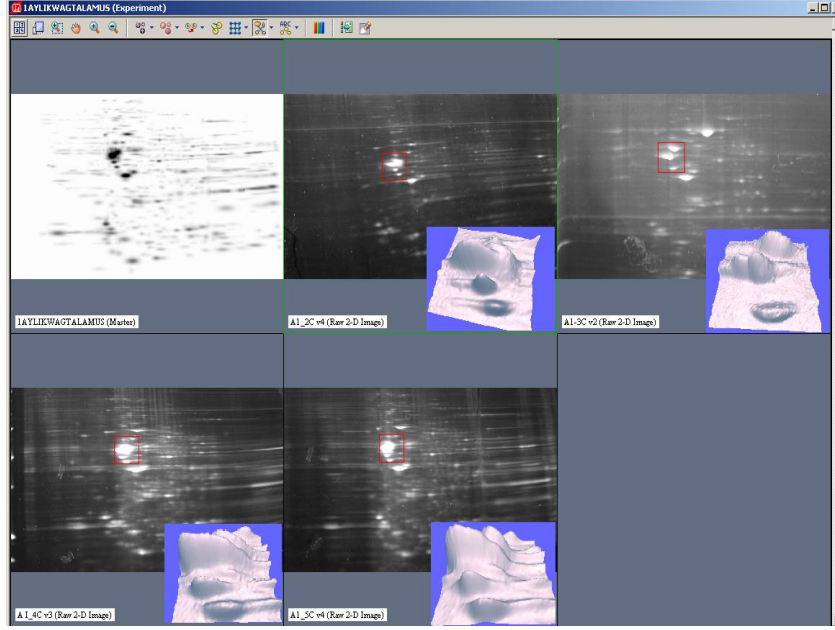
**Çizelge 4.3.** 1 aylık Wag/Rij sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN	
		SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A12C	412	180	232
A13C	317	122	195
A14C	537	291	246
A15C	544	544	0
% V.K= 24			

1 aylık Wag/Rij sıçanların talamuslarından saptanan ortalama spot sayısı 452,5  $\pm$ 108,8 olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 34'dür.



**Şekil 4.11.** 1 aylık Wag/Rij sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

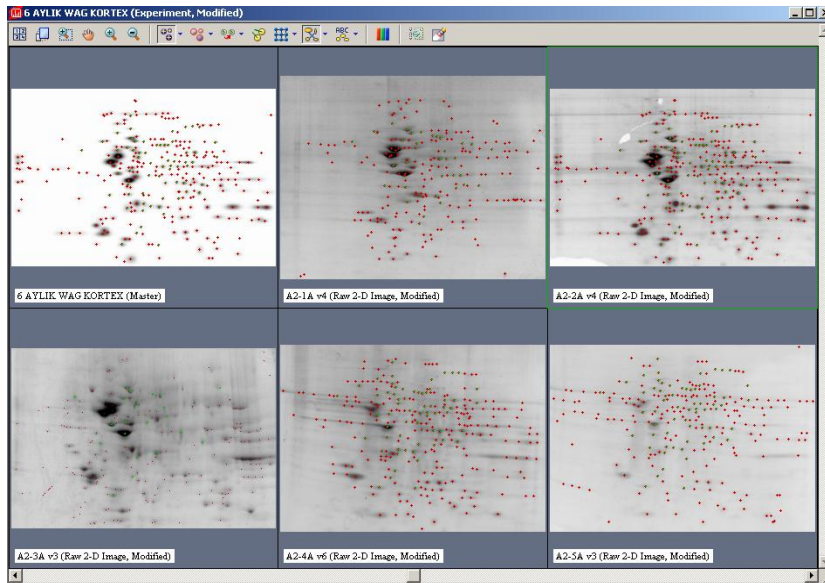


Şekil 4.12. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

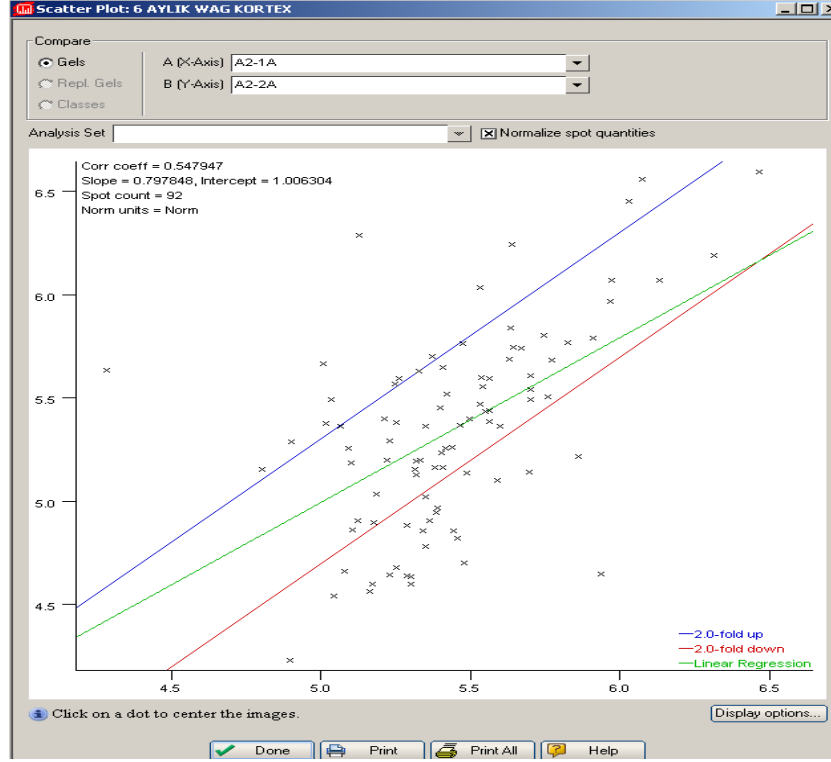
#### 4.1.2. 6 Aylık Wag/Rij sıçanların proteomik analizleri

6 aylık WAG/Rj sıçanların 1 saatteki ortalama SWD sayısı  $37 \pm 8,9$ , SWD süresi ise  $296,23 \pm 62,09$  sn olarak bulunmuştur.

##### 4.1.2.A. Korteksdeki proteomik analizler



Şekil 4.13. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

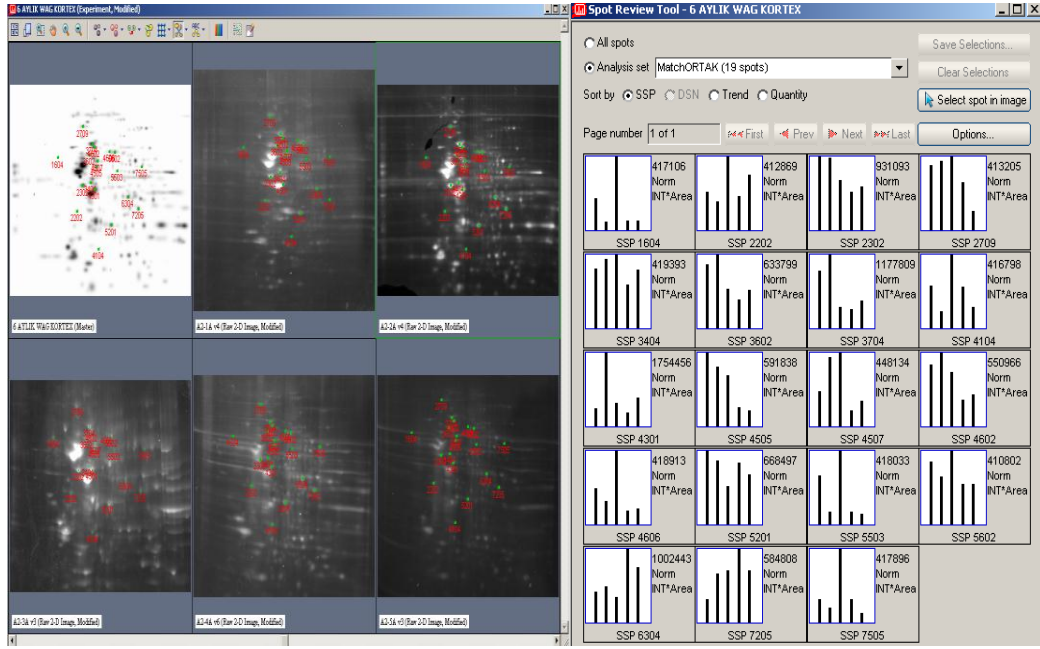


Şekil 4.14. 6 aylık Wag/Rij ırkı sığanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

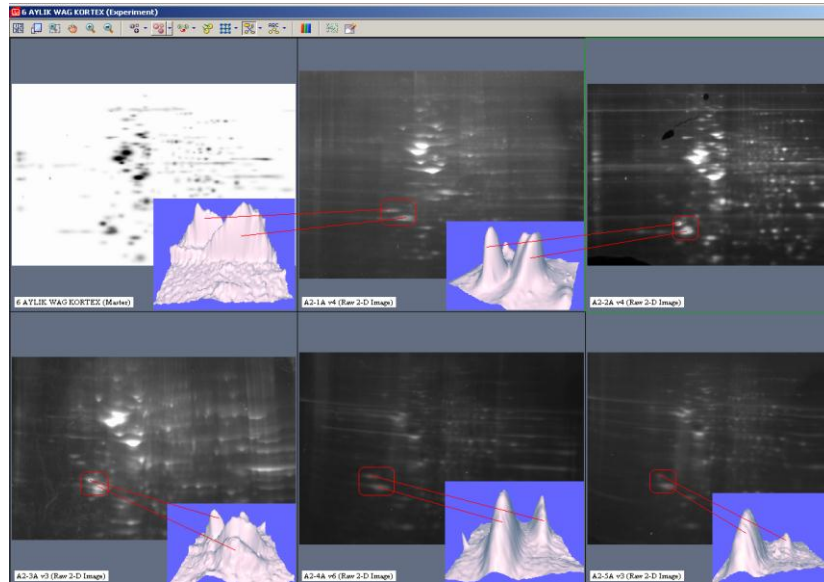
Çizelge 4.4. 6 aylık Wag/Rij ırkı sığanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A21A	216	106	110
A22A	282	282	114
A23A	222	108	114
A24A	276	108	168
A25A	246	98	148
% V.K= 12			

6 aylık Wag/Rij ırkı sığanların kortekslerinden saptanan ortalama spot sayısı 248,4  $\pm$ 30 olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 19'dur.

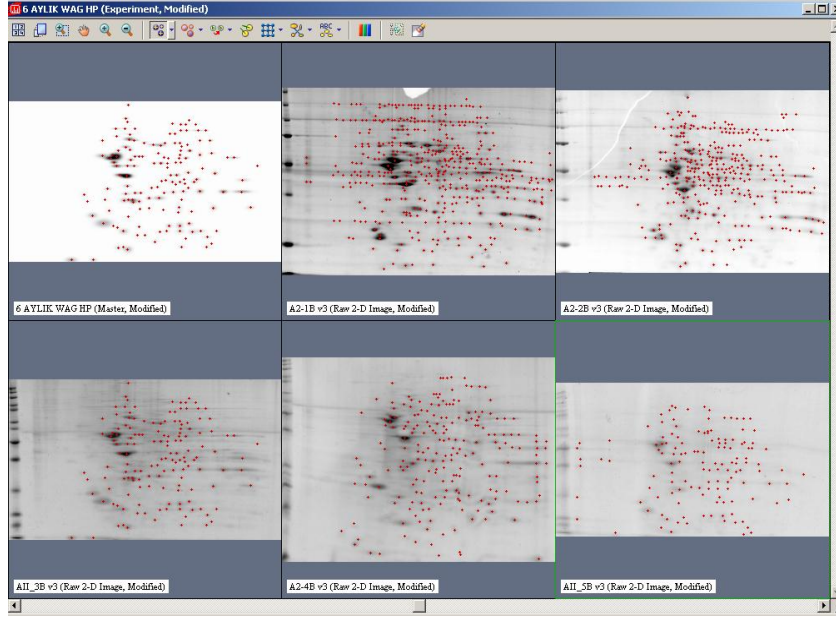


Şekil 4.15. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

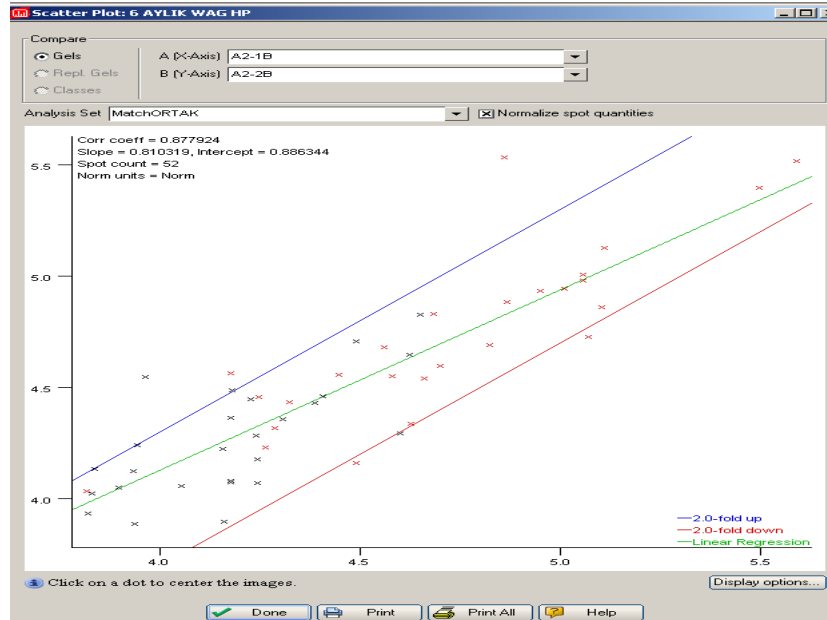


Şekil 4.16. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.2.B. Hipokampusdaki proteomik analizler



Şekil 4.17. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen iki 2D jel elektroforezi görüntüsü.

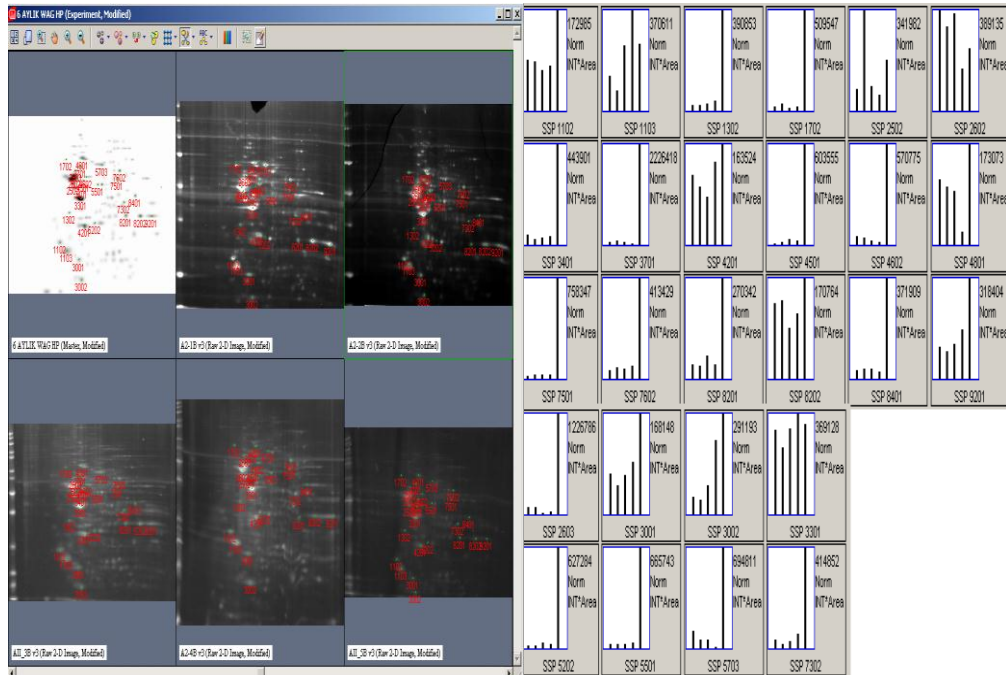


Şekil 4.18. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

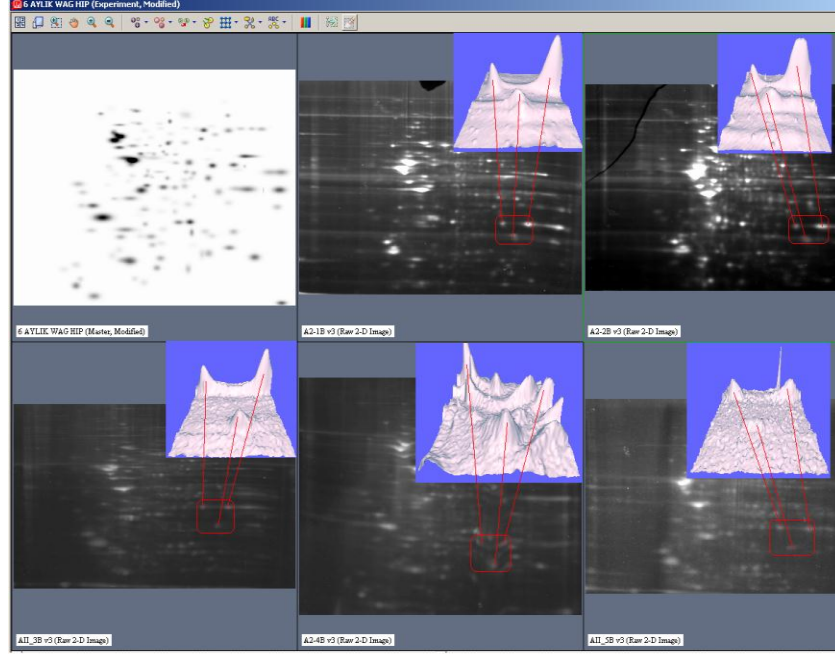
**Çizelge 4.5.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A21B	196	56	140
A22B	219	129	90
A23B	173	90	83
A24B	163	163	0
A25B	191	80	11
% V.K=11			

6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarında saptanan ortalama spot sayısı  $188,4 \pm 21,69$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 32'dir.

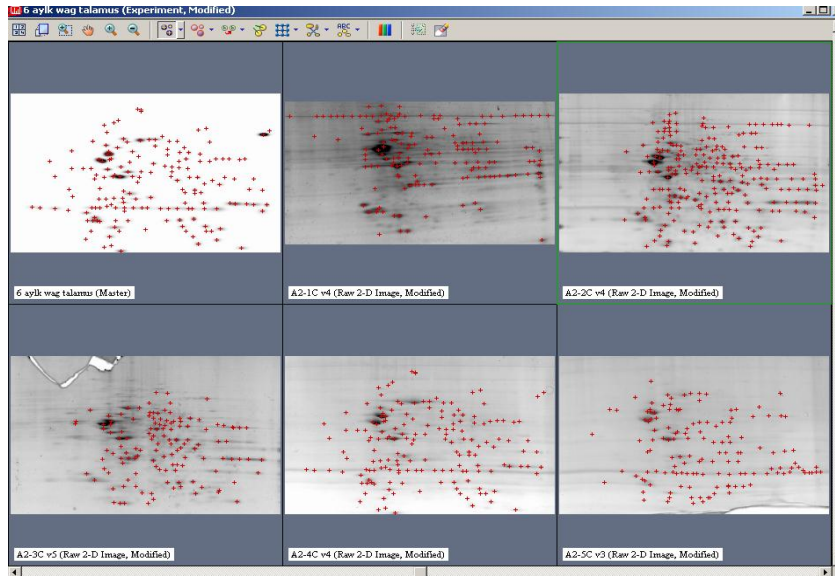


**Şekil 4.19.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.



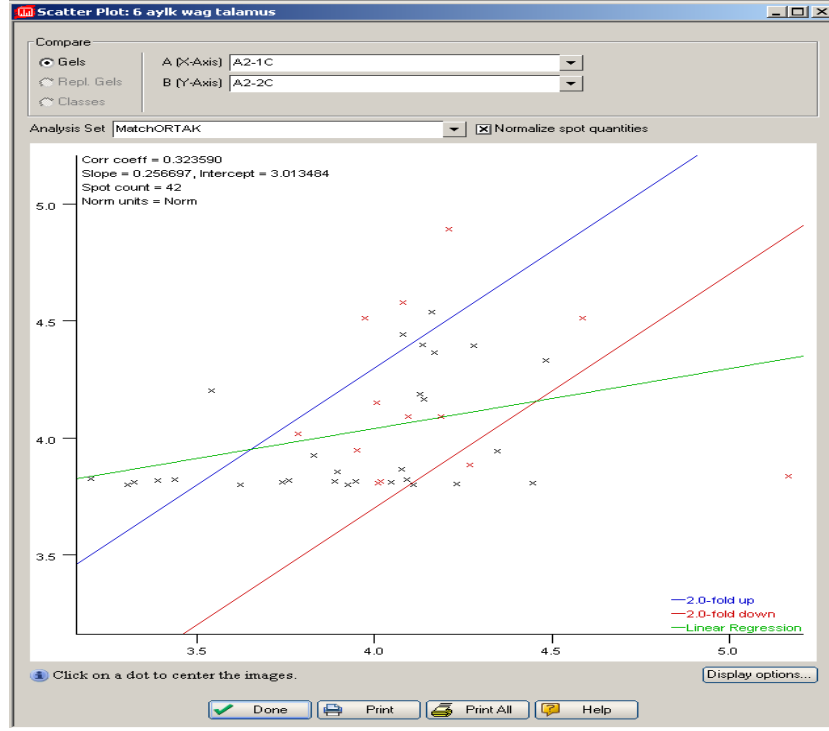
**Şekil 4.20.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.2.C. Talamusdaki proteomik analizler



**Şekil 4.21.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen iki 2D jel elektroforezi görüntüsü.



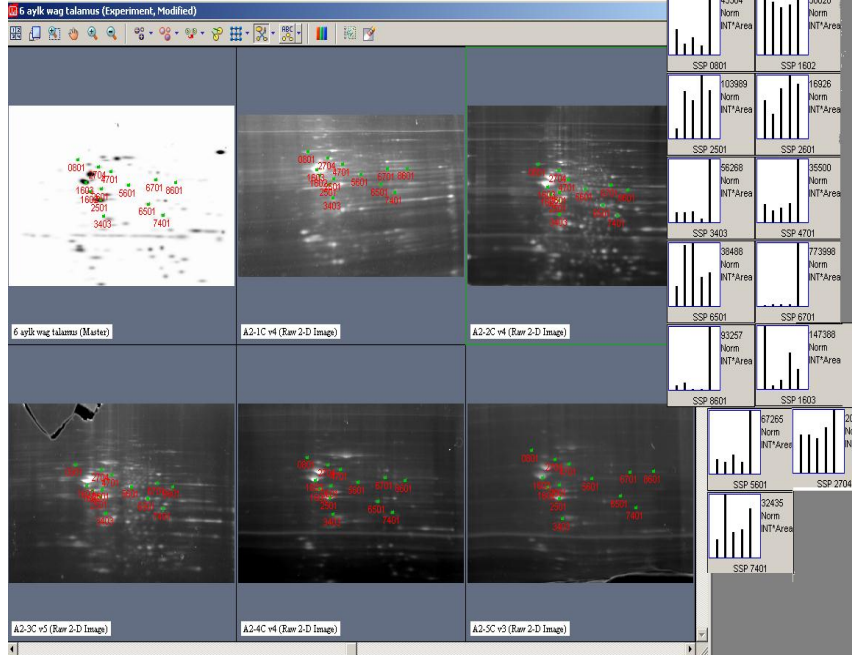


Şekil 4.22. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

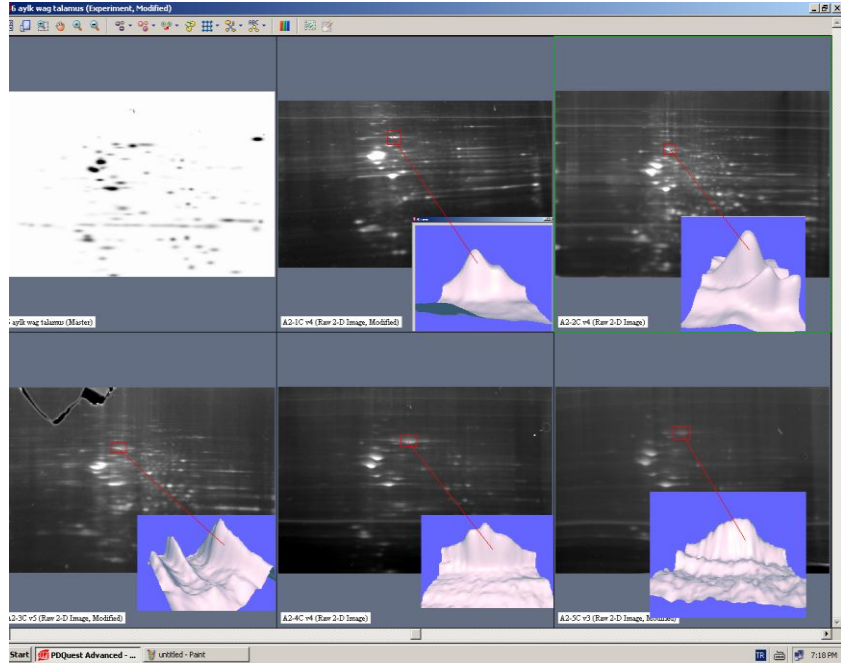
Çizelge 4.6. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A21C	159	63	96
A22C	226	104	122
A23C	127	74	53
A24C	164	164	0
A25C	139	80	59
% V.K=23			

6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından saptanan ortalama spot sayısı 163  $\pm$ 38,26 olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 13'dür.



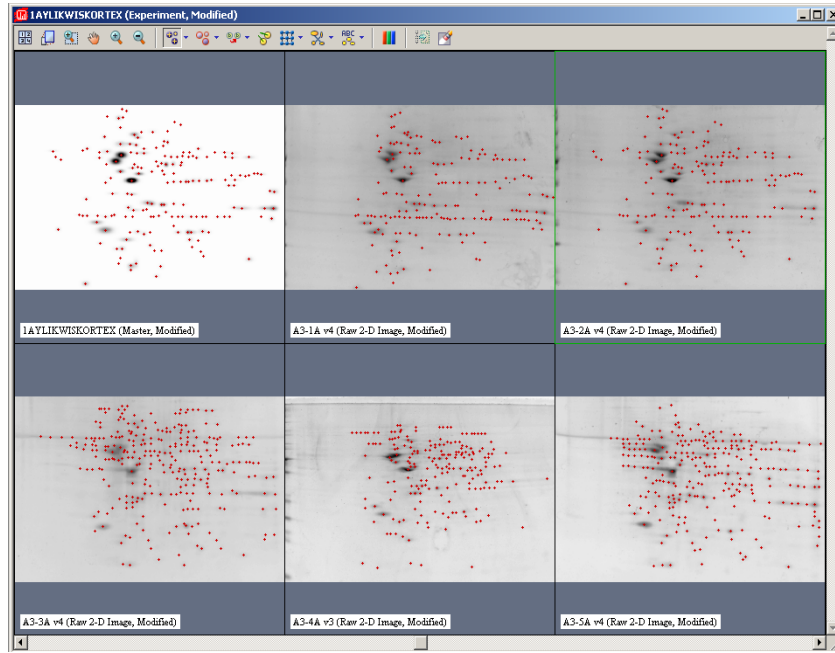
Şekil 4. 23. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.



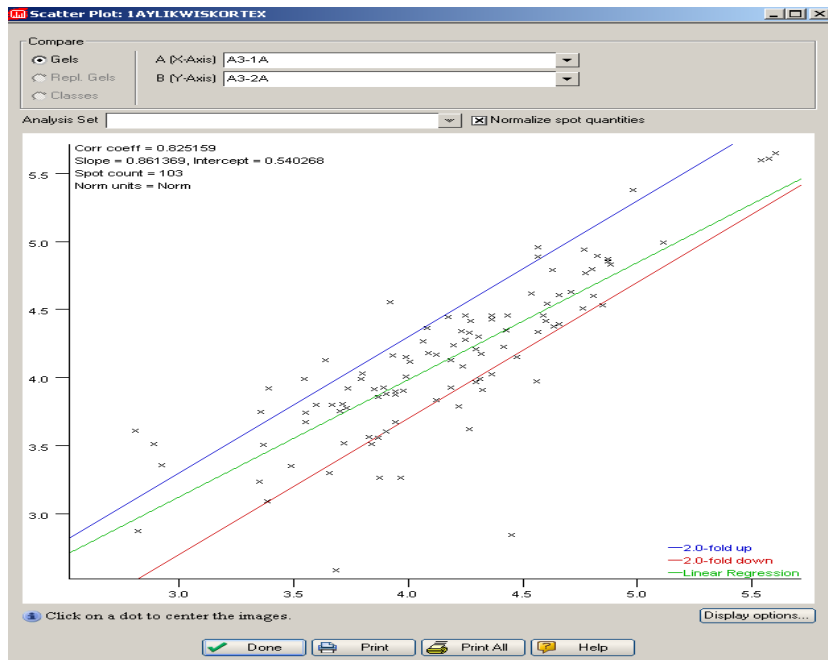
Şekil 4.24. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

### 4.1.3. 1 Aylık Wistar sıçanların proteomik analizleri

#### 4.1.3.A. Korteksdeki proteomik analizler



Şekil 4.25. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

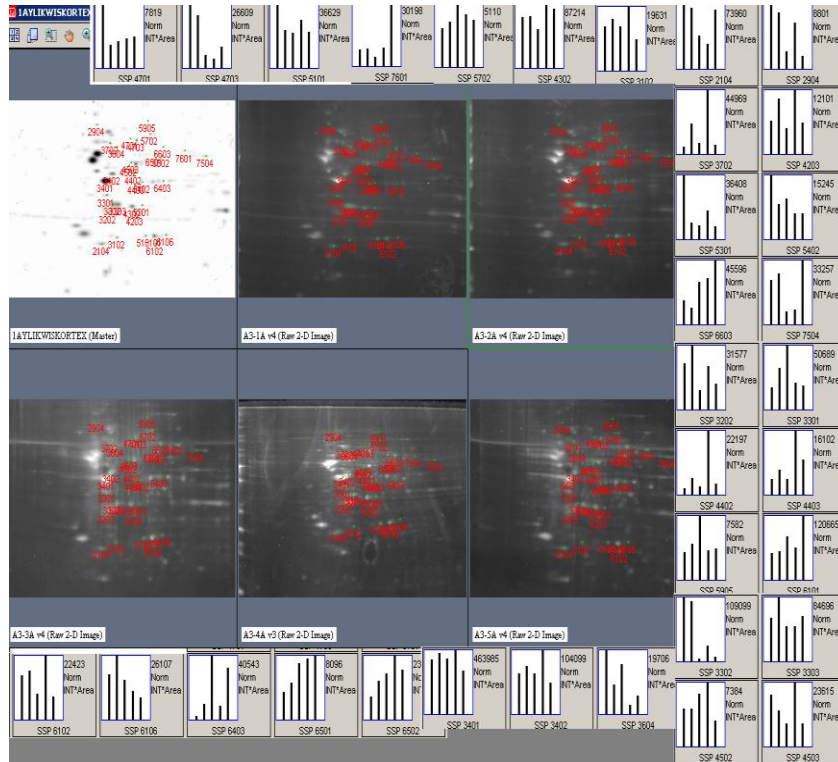


Şekil 4.26. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

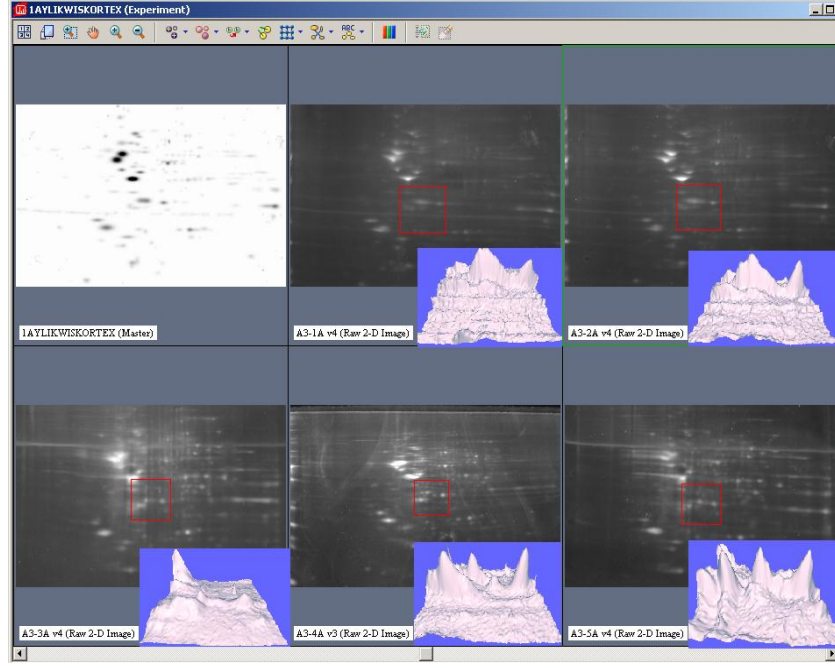
**Çizelge 4.7.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A31A	175	103	72
A32A	172	172	0
A33A	278	88	190
A34A	203	67	136
A35A	256	82	174
% V.K= 22			

1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinde saptanan ortalama spot sayısı  $216,8 \pm 48$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 33'dür.

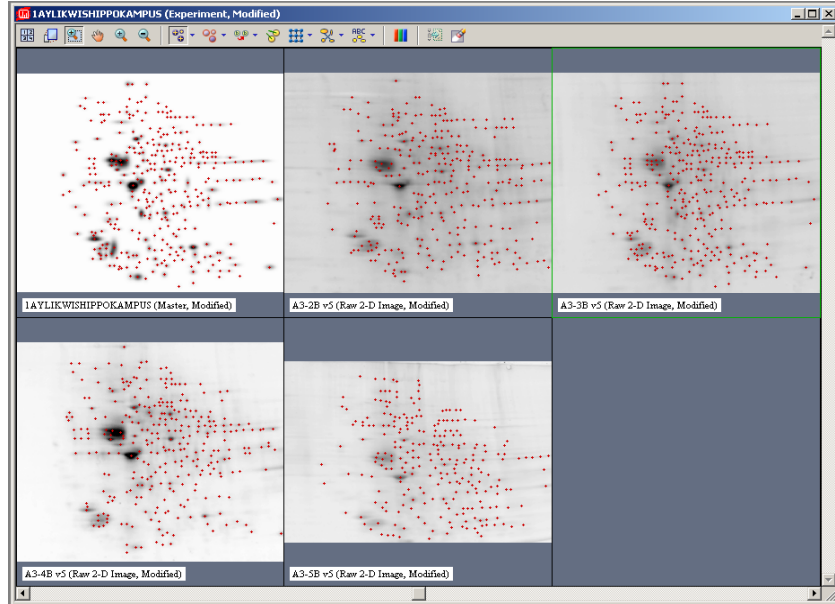


**Şekil 4.27.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

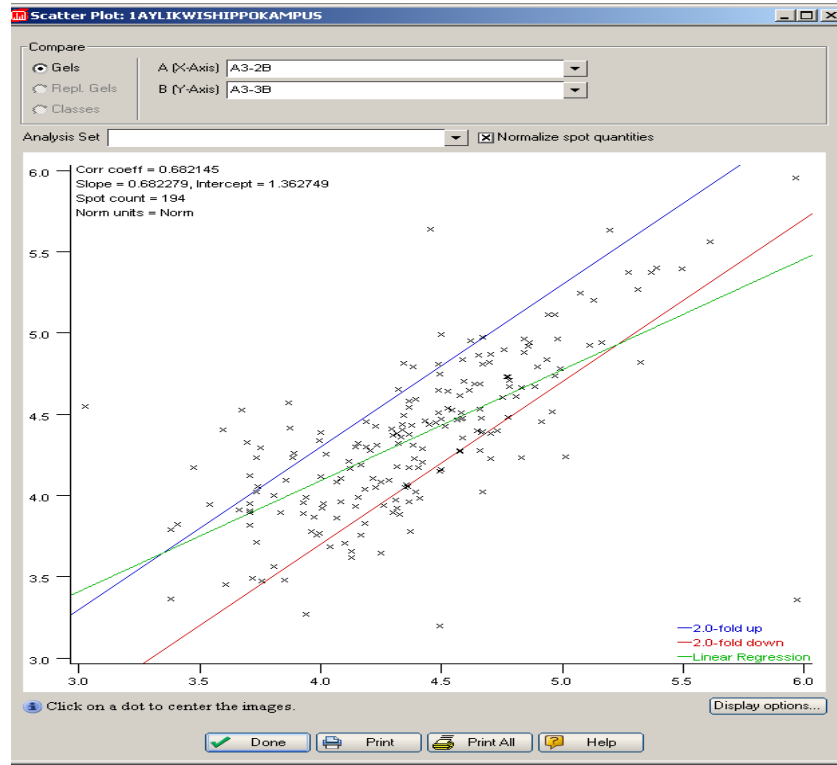


Şekil 4.28. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.3.B. Hipokampusdaki proteomik analizler



Şekil 4.29. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

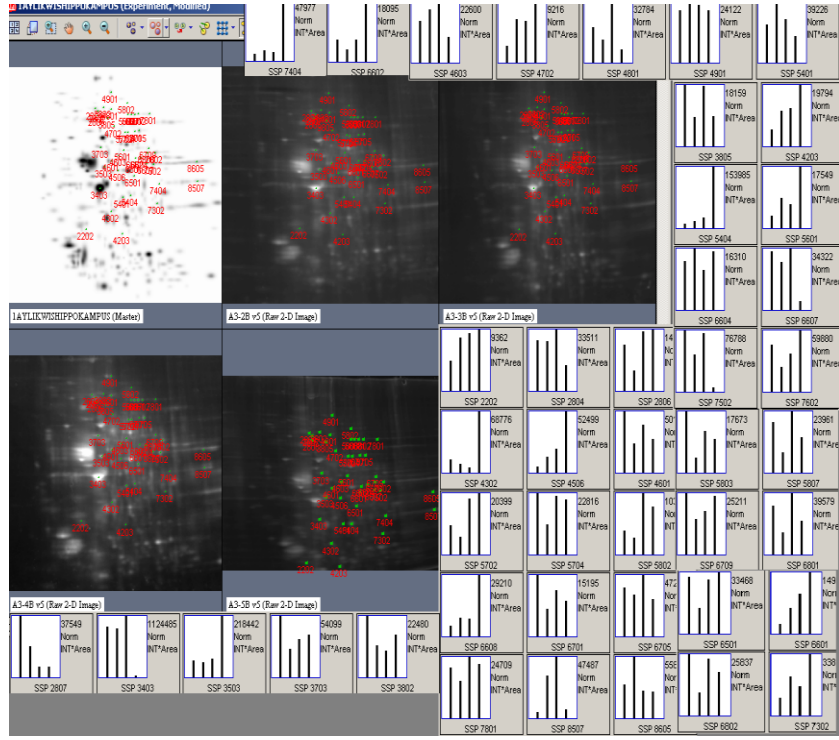


Şekil 4.30. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

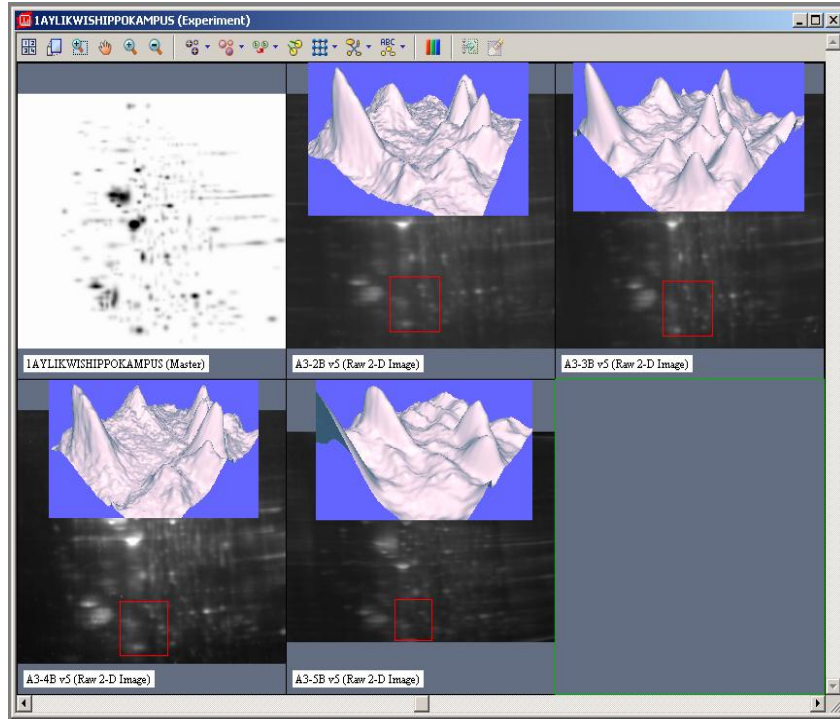
Çizelge 4.8. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A32B	309	214	95
A33B	339	339	0
A34B	297	198	99
A35B	249	128	121
% V.K= 12			

1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarında saptanan ortalama spot sayısı  $298,5 \pm 37,4$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 43'dür.

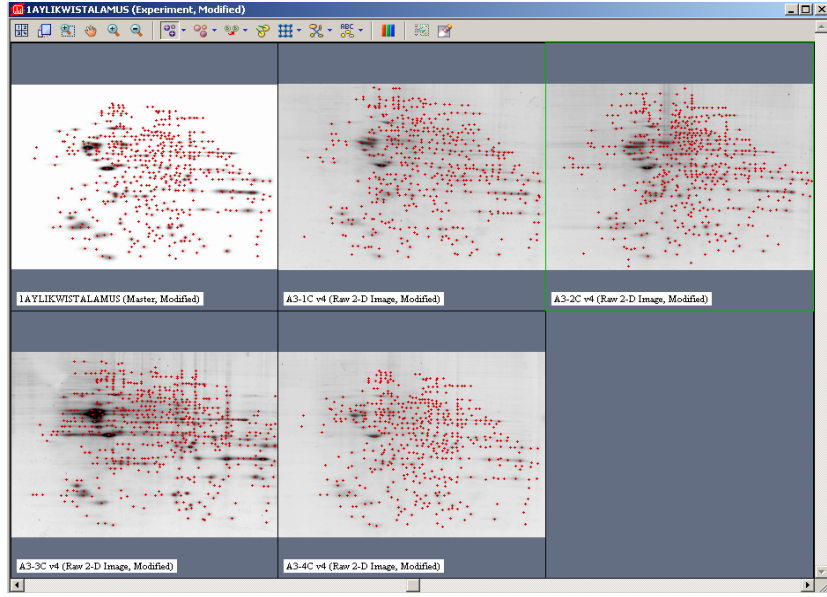


Şekil 4.31. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

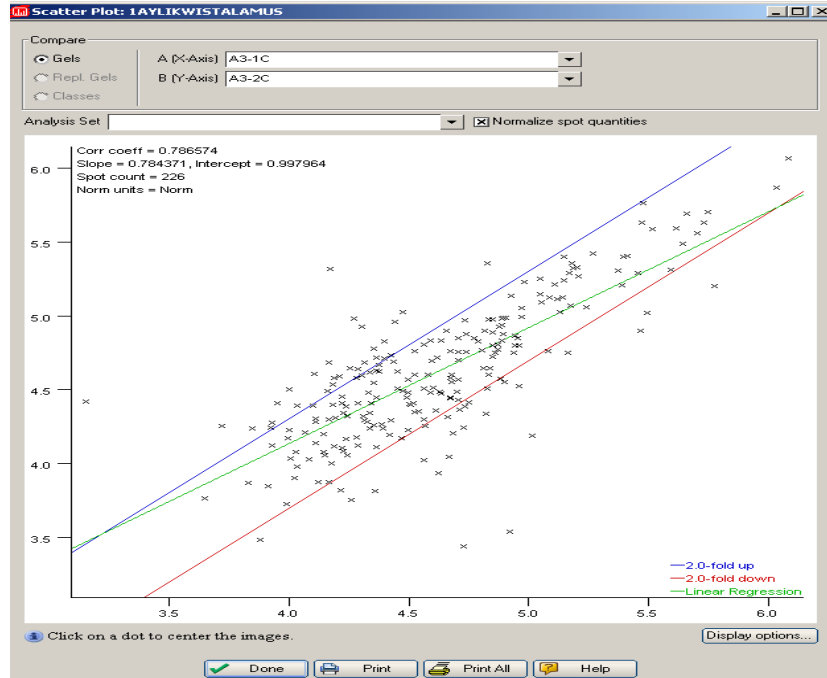


Şekil 4.32. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektrofrez görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.3.C. Talamustaki proteomik analizler



Şekil 4.33. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.



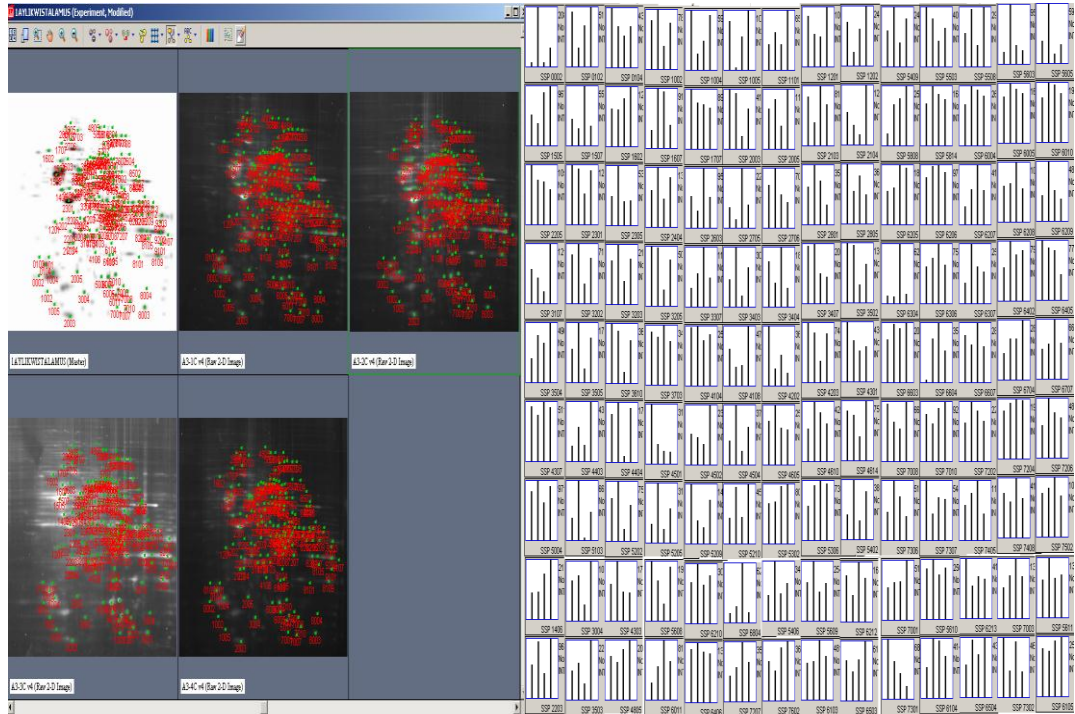
Şekil 4.34. 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



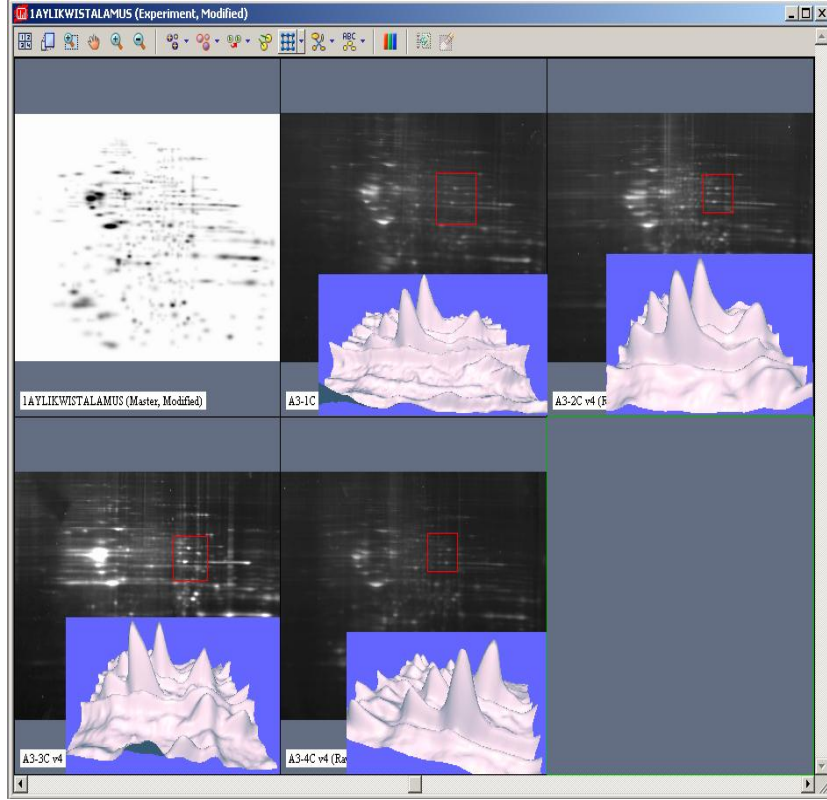
**Çizelge 4.9.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A31C	462	276	186
A32C	513	310	203
A33C	547	281	266
A34C	476	476	0
% V.K= 7			

1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarında saptanan ortalama spot sayısı  $499,5 \pm 38,2$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 126'dır.



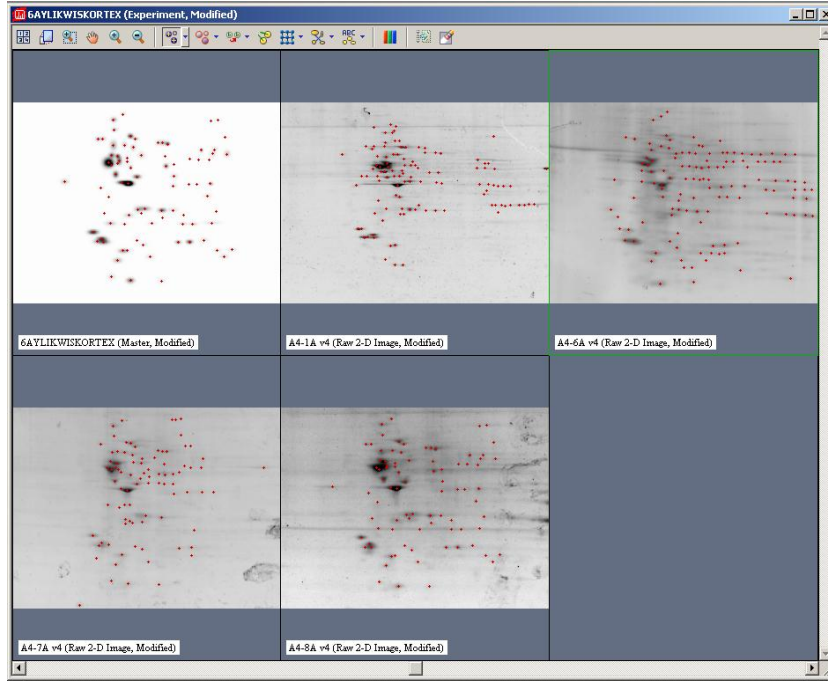
**Şekil 4.35.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.



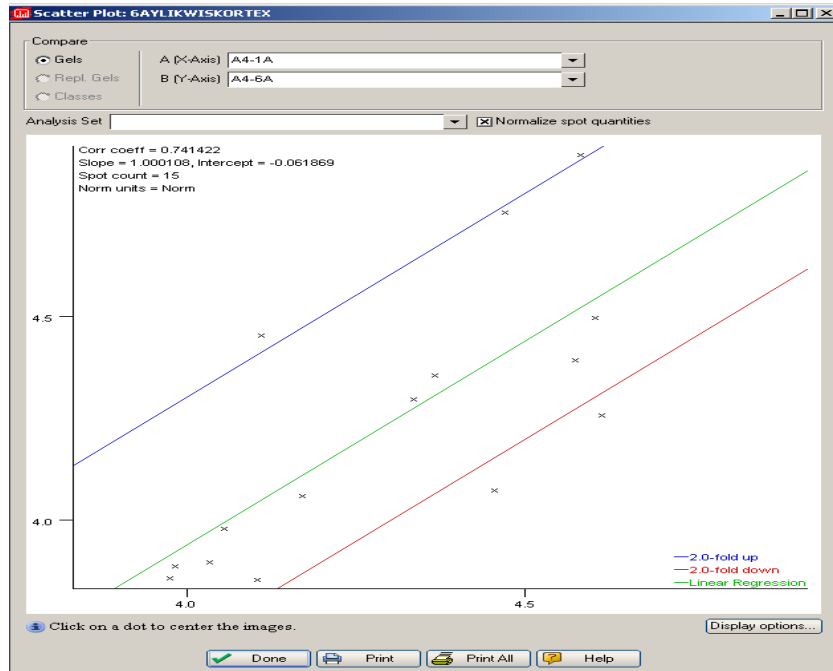
**Şekil 4.36.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.4. 6 Aylık Wistar sıçanların proteomik analizleri

##### 4.1.4.A. Korteksdeki proteomik analizler



Şekil 4.37. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

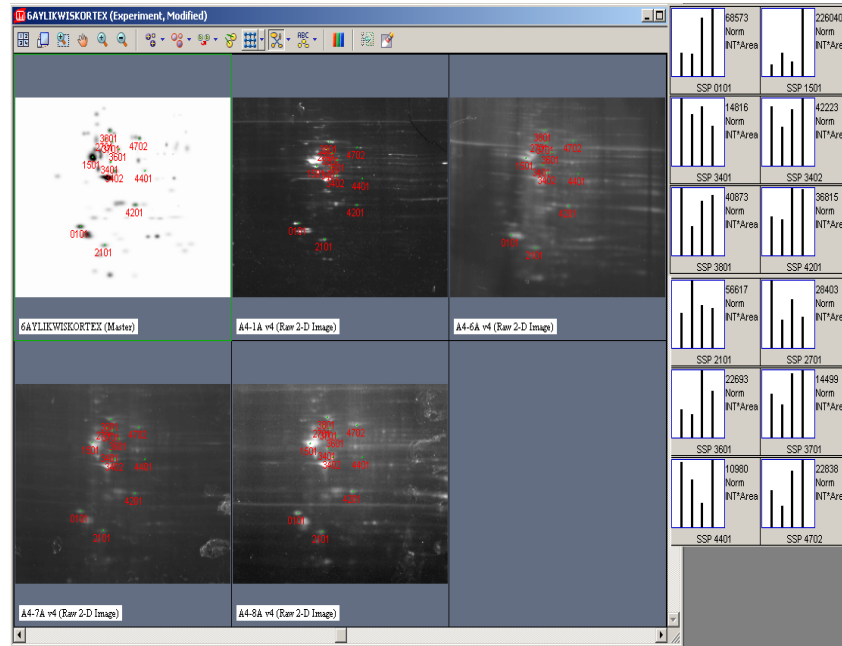


Şekil 4.38. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

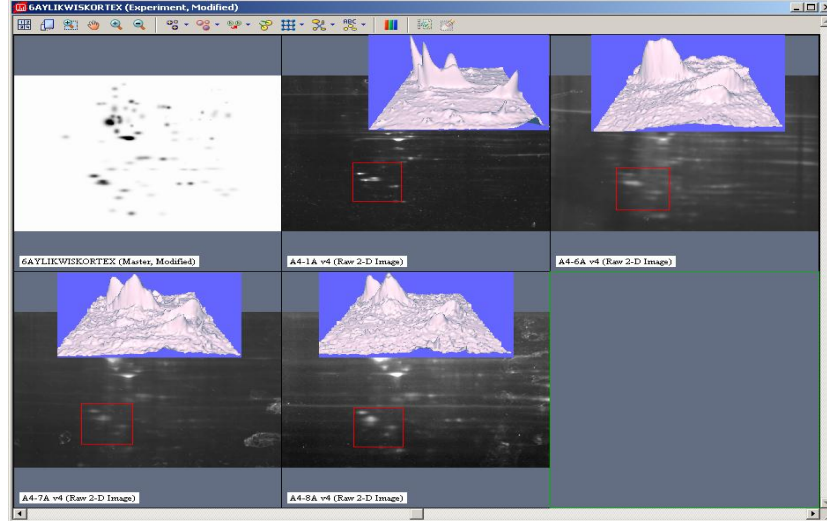
**Çizelge 4.10.** 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A41A	110	34	76
A46A	127	48	79
A47A	87	51	36
A48A	84	84	0
% V.K= 19			

6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinde saptanan ortalama spot sayısı  $102 \pm 20,31$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 12'dir.

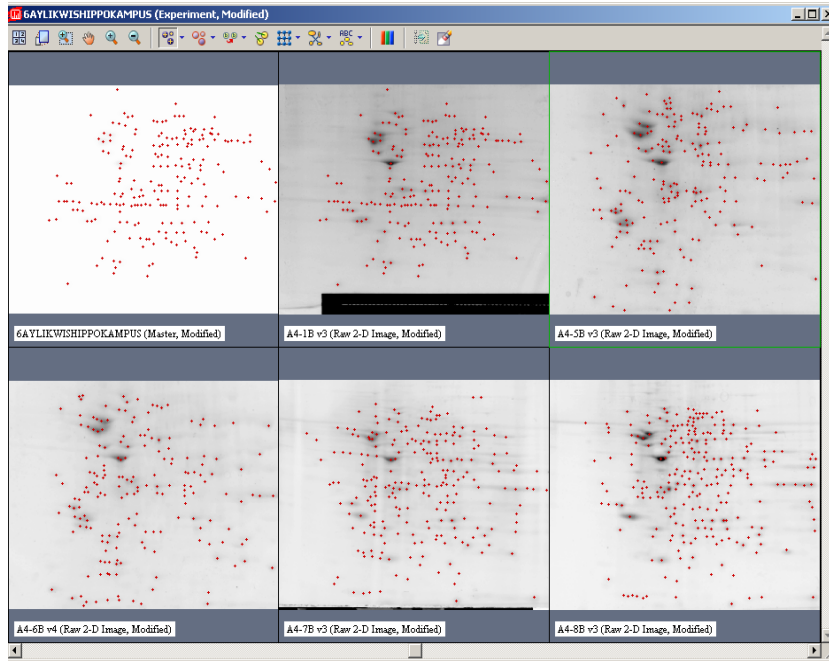


**Şekil 4.39.** 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

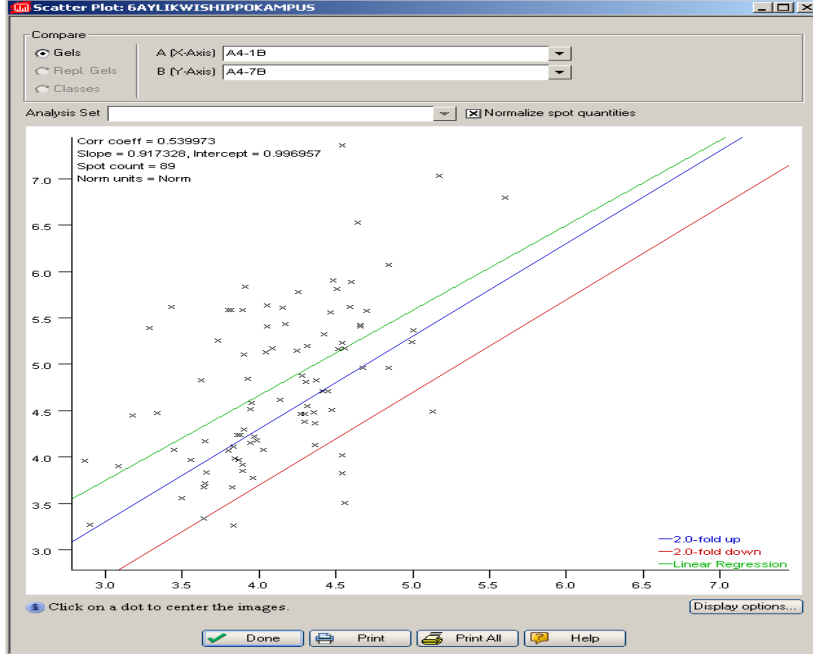


Şekil 4.40. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.4.B. Hipokampusdaki proteomik analizler



Şekil 4.41. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.

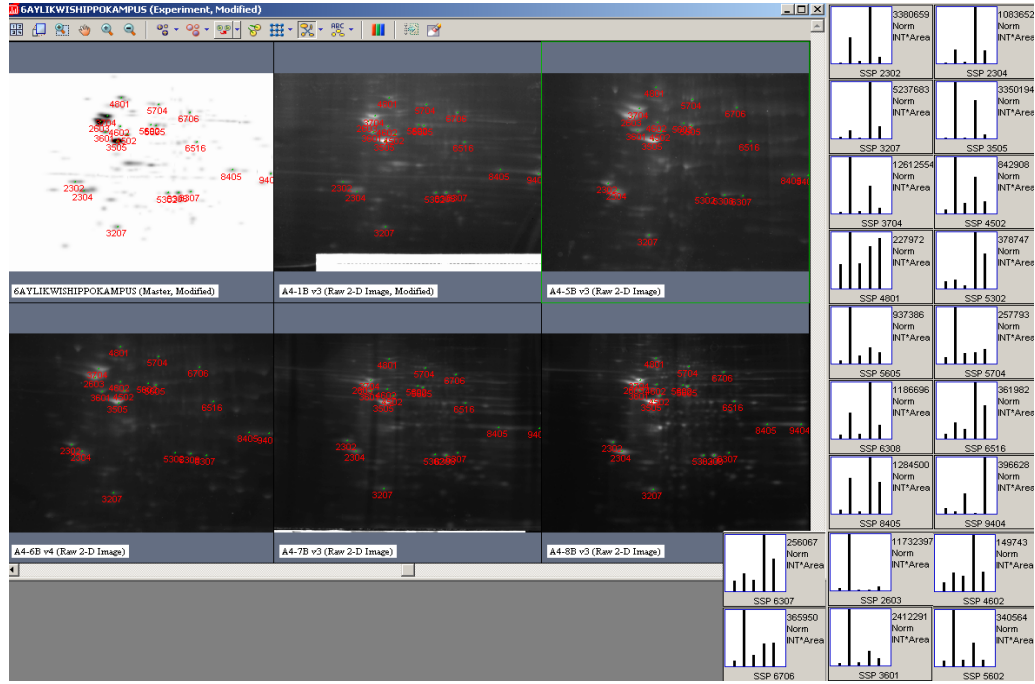


Şekil 4.42. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

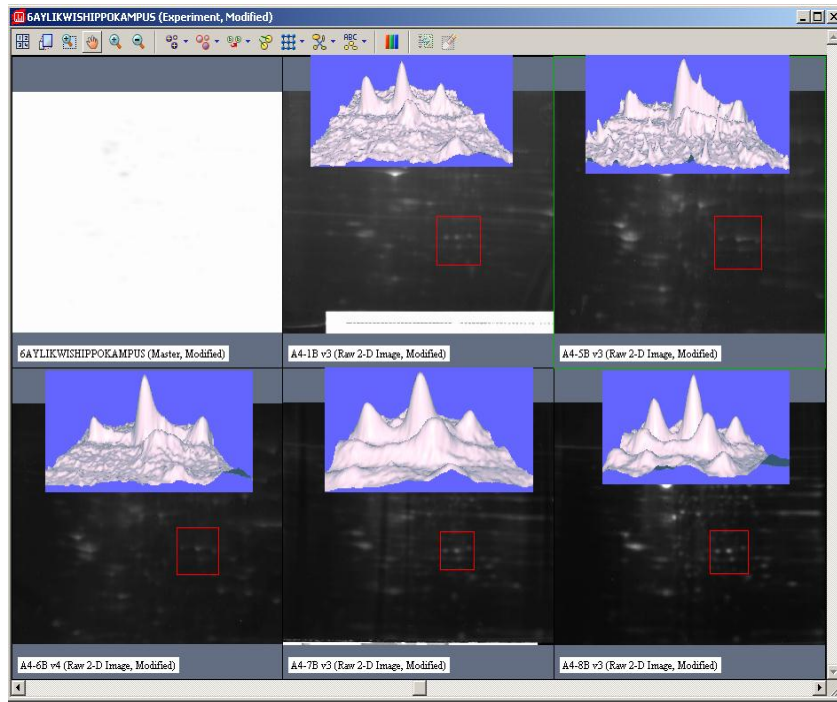
Çizelge 4.11. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A41B	206	206	0
A45B	195	63	132
A46B	184	64	120
A47B	234	99	135
A48B	245	92	153
% V.K= 12			

6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarında saptanan ortalama spot sayısı  $212,8 \pm 25,87$  olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 20'dir.

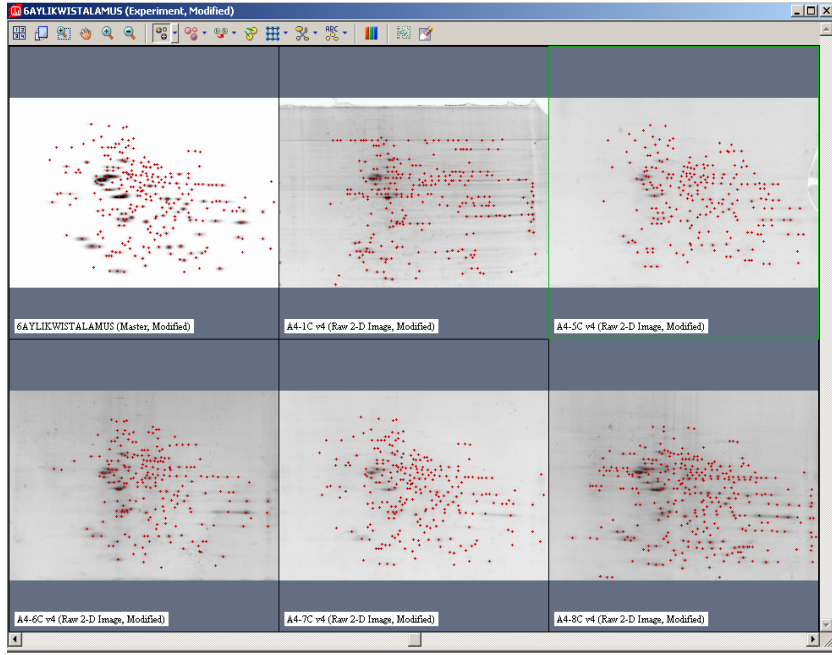


Şekil 4.43. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.

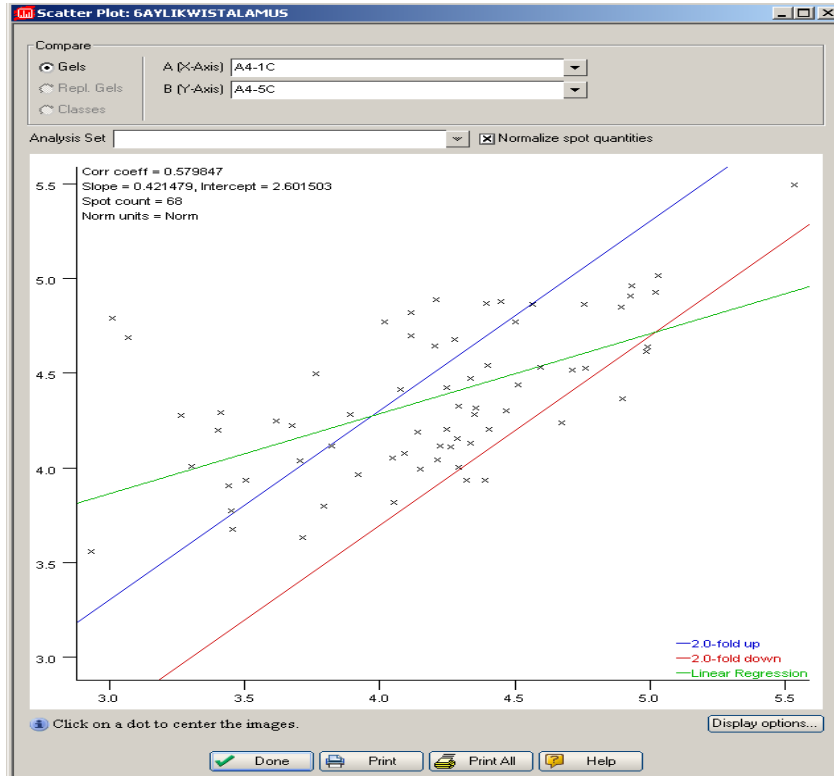


Şekil 4.44. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

#### 4.1.4.C. Talamusdaki proteomik analizler



Şekil 4.45. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsü.



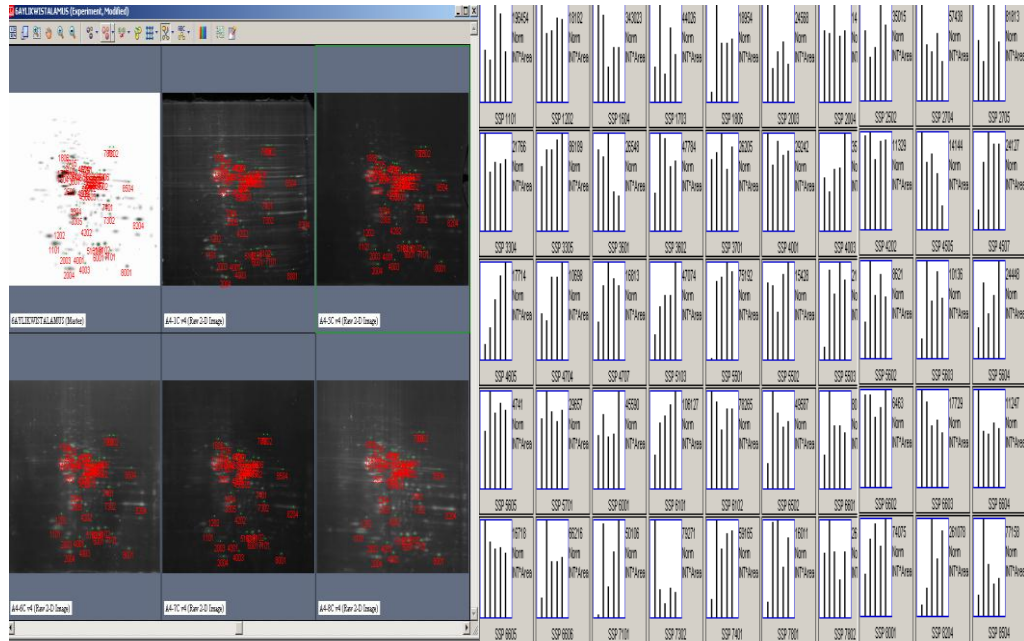
Şekil 4.46. 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



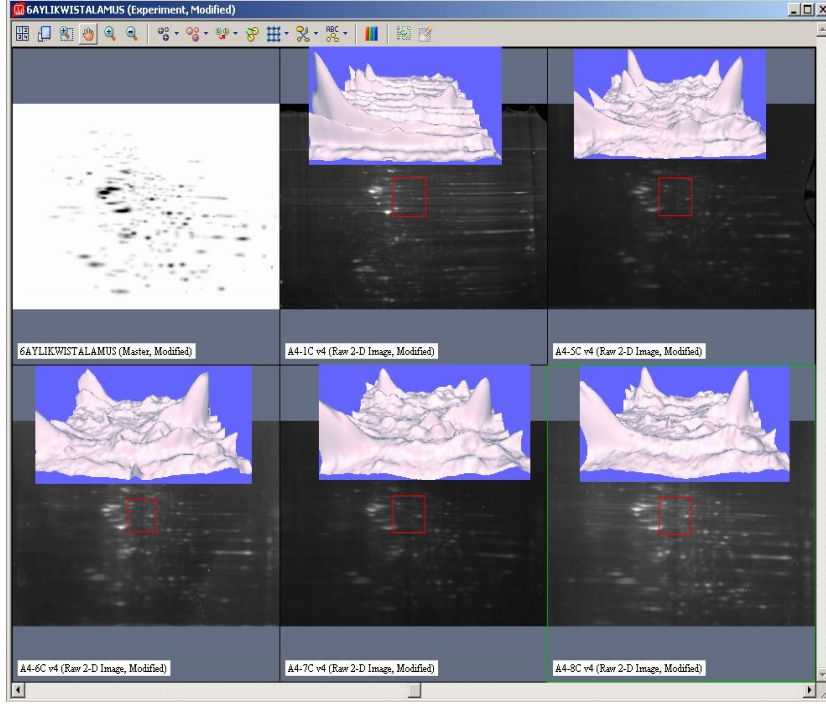
**Çizelge 4.12.** 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

DENEK KODU	SPOT SAYISI	EŞLEŞEN SPOT OLAN	EŞLEŞMEYEN SPOT SAYISI
A41B	268	113	155
A42B	229	144	85
A43B	217	152	65
A44B	259	259	0
A45B	319	179	140
% V.K=15			

6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarında saptanan ortalama spot sayısı 258,4±39.82 olarak bulunmuştur. Ortak spot sayısı ise 50'dir.



**Şekil 4.47.** 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki ortak olan spotların histogramının gösterilmesi.



**Şekil 4.48.** 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

**Çizelge 4.13.** Grup içinde yapılan proteomik analizlerde jeller arasındaki % VK'sının gösterilmesi

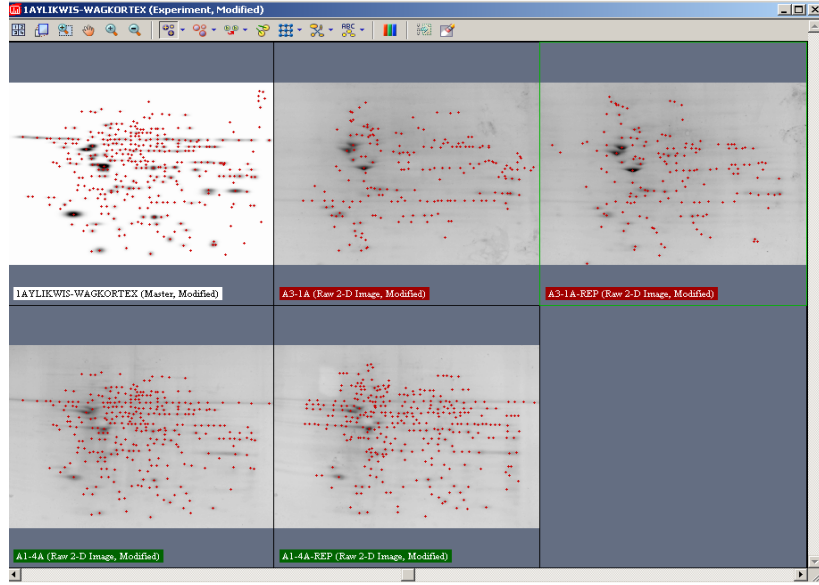
Beyin Bölgesi	WAG/Rij sıçan % VK		Wistar sıçan % VK	
	1 Aylık sıçan	6 Aylık sıçan	1 Aylık sıçan	6 Aylık sıçan
Korteks	13,3	12	22	19
Hipokampus	9,8	11	12	12
Talamus	24	23	7	15

## 4.2. Gruplar Arasında Yapılan Proteomik Değerlendirmeleri

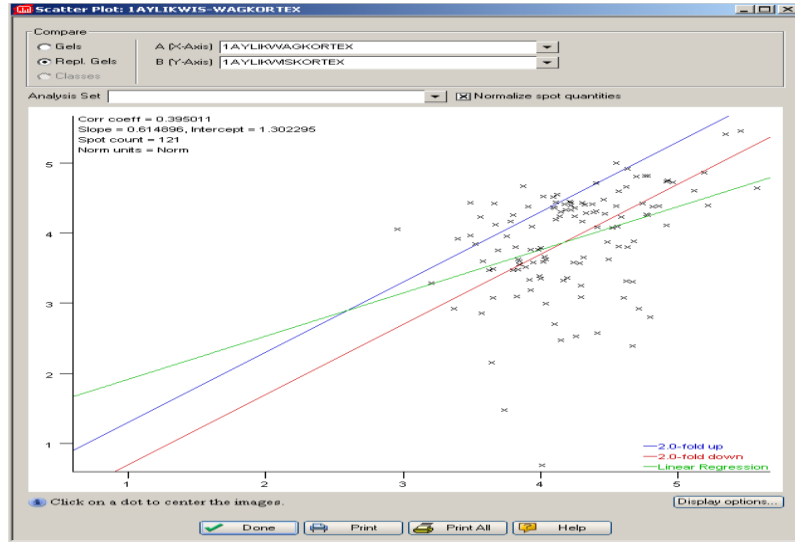
### 4.2.1. Türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar

#### 4.2.1.1. 1 Aylık yaştaki türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar

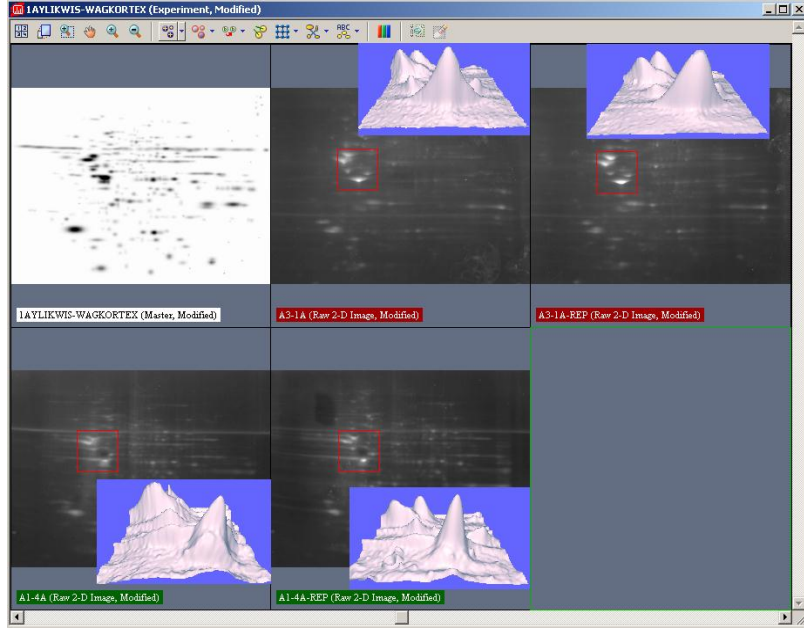
##### 4.2.1.1.A. 1 aylık Wistar sıçanın korteksi ile 1 aylık Wag/Rij sıçanın korteksinin proteomik analizi



Şekil 4.49. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.50. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

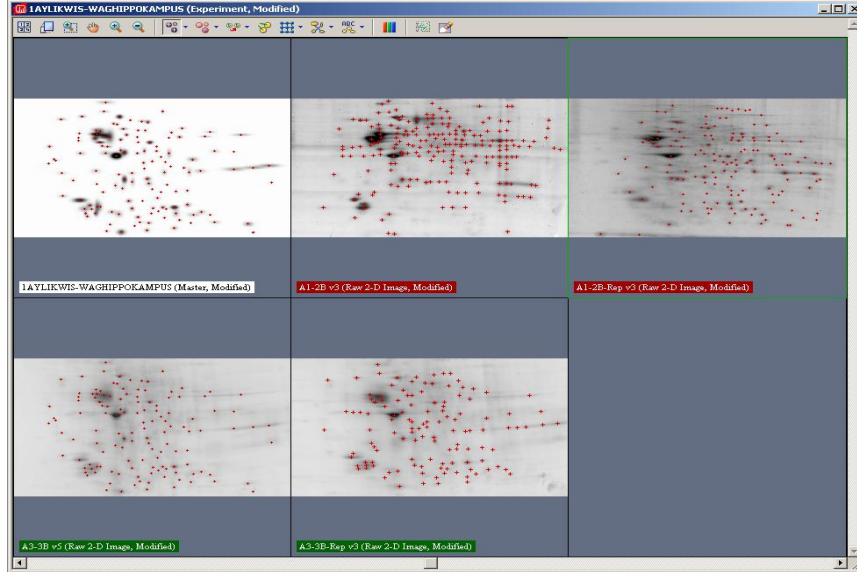


**Şekil 4.51.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

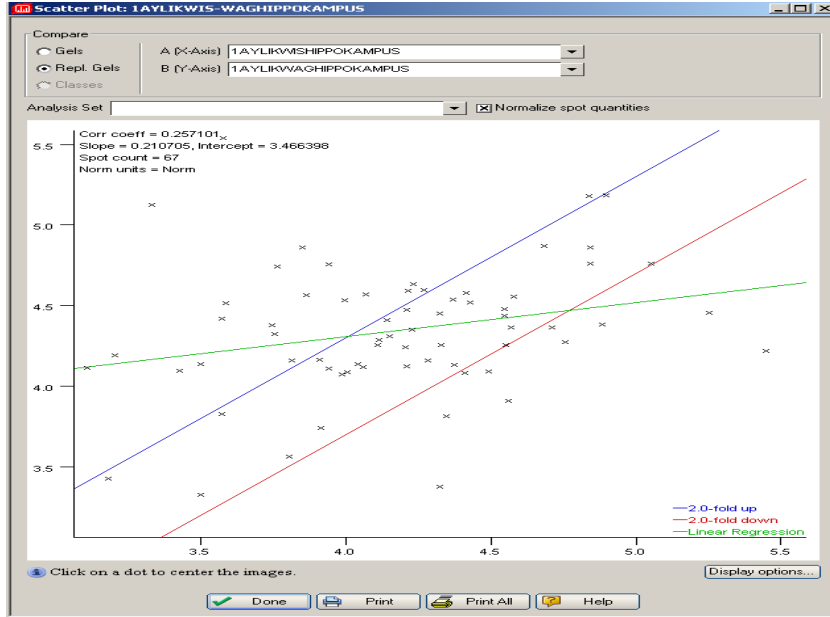
**Çizelge 4.14.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

1 aylık wag/wis kortekslerinin PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A3-1A	1 aylık wis sıçan	191	88	103	18	55	51	60
A3-1A_Tekrarı		165	94	71				
A1-4A	1 aylık wag sıçan	305	305	0				
A1-4A_Tekrarı		322	182	140				

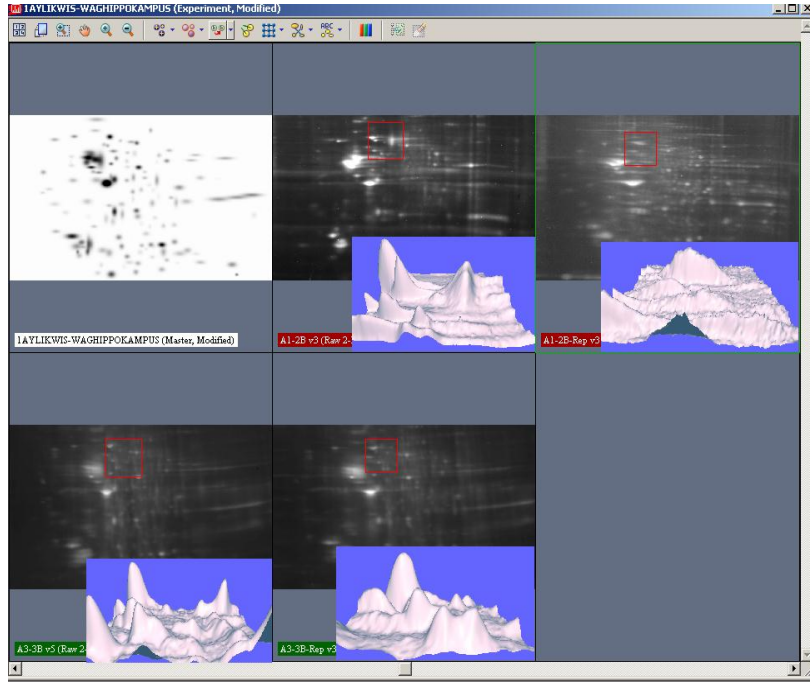
**4.2.1.1.B.** 1 aylık Wistar sıçanın hipokampusu ile 1 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusunun proteomik analizi



Şekil 4.52. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması



Şekil 4.53. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

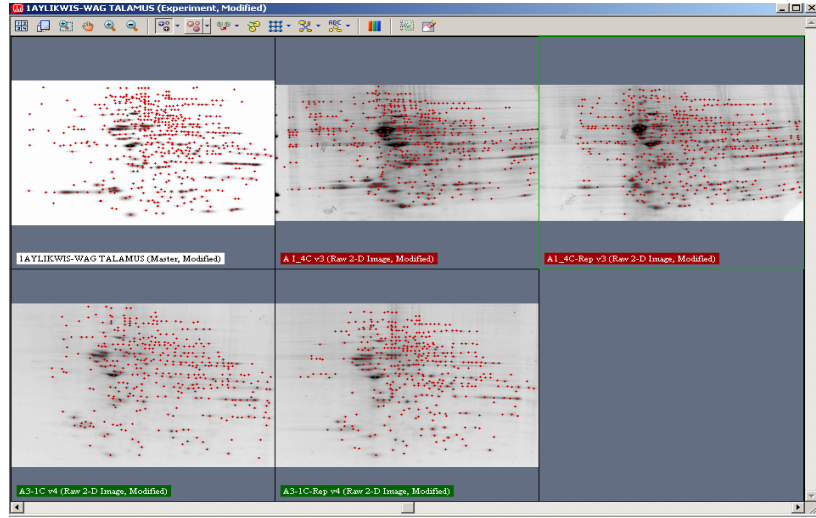


**Şekil 4.54.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

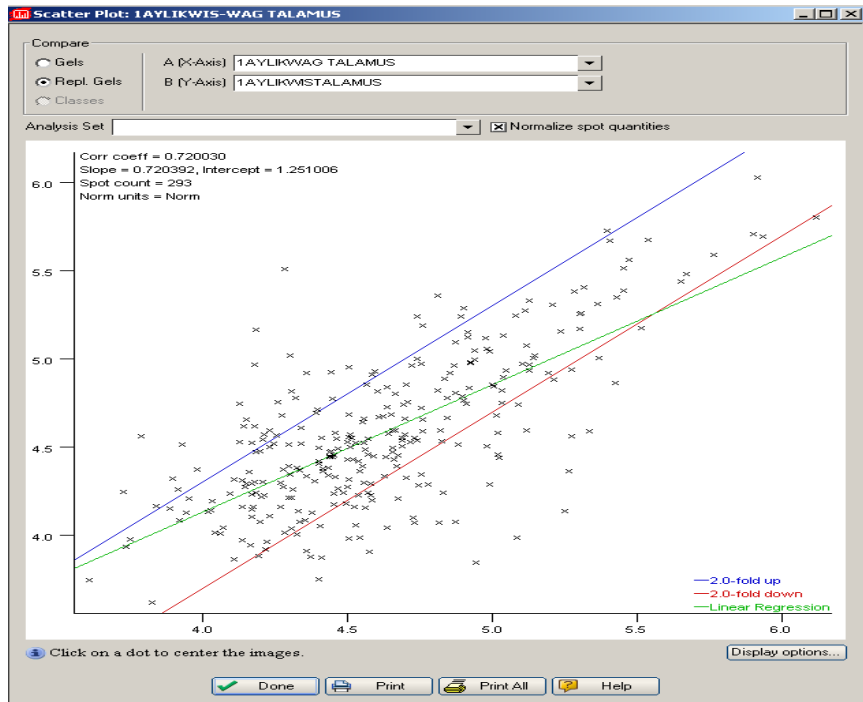
**Çizelge 4.15.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

1 aylık wag/wis hipokampuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Orta k spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A3-3B	1 aylık wis sıçan	130	130	0	10	21	36	6
A3-3B Tekrarı		123	48	75				
A1-2B	1 aylık wag sıçan	203	55	148	10	21	36	6
A1-2B Tekrarı		152	66	86				

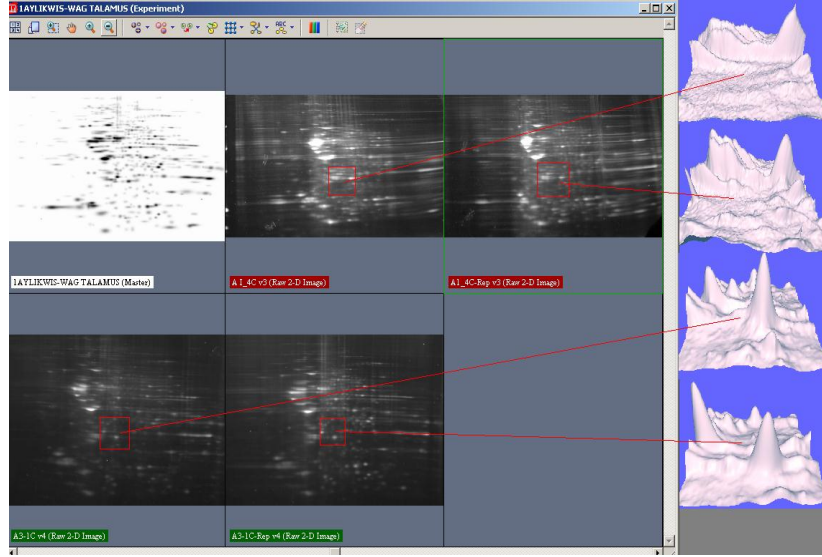
**4.2.1.1.C.** 1 aylık Wistar sıçanın talamusu ile 1 aylık Wag/Rij sıçanın talamusunun proteomik analizi



Şekil 4.55. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması



Şekil 4.56. 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



**Şekil 4.57.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

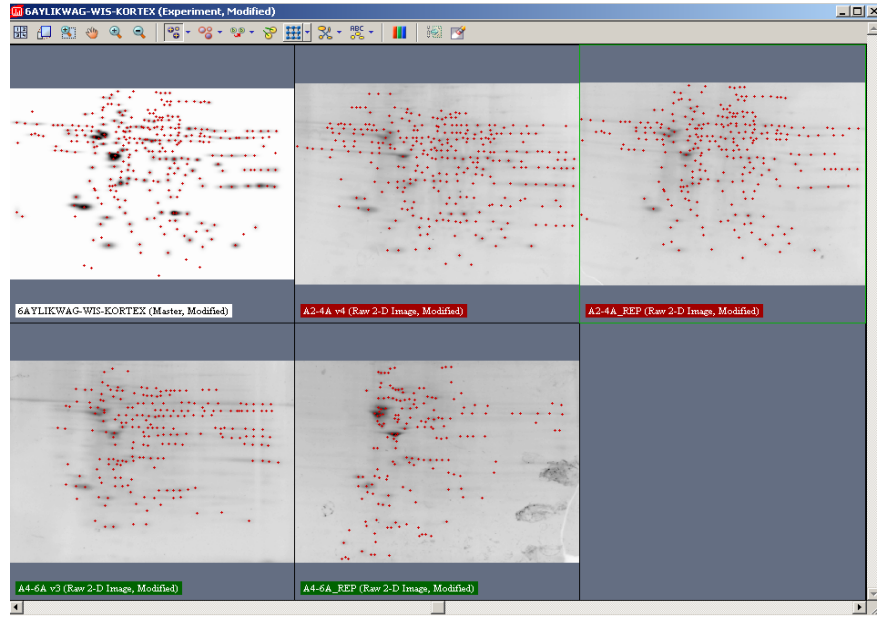
**Çizelge 4.16.** 1 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 1 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

1 aylık wag/wis talamuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A3-1C	1 aylık wis sıçan	376	262	114	38	50	205	57
A3-1C_Tekrarı		397	397	0				
A1-4C	1 aylık wag sıçan	489	286	203				
A1-4C_Tekrarı		487	320	167				

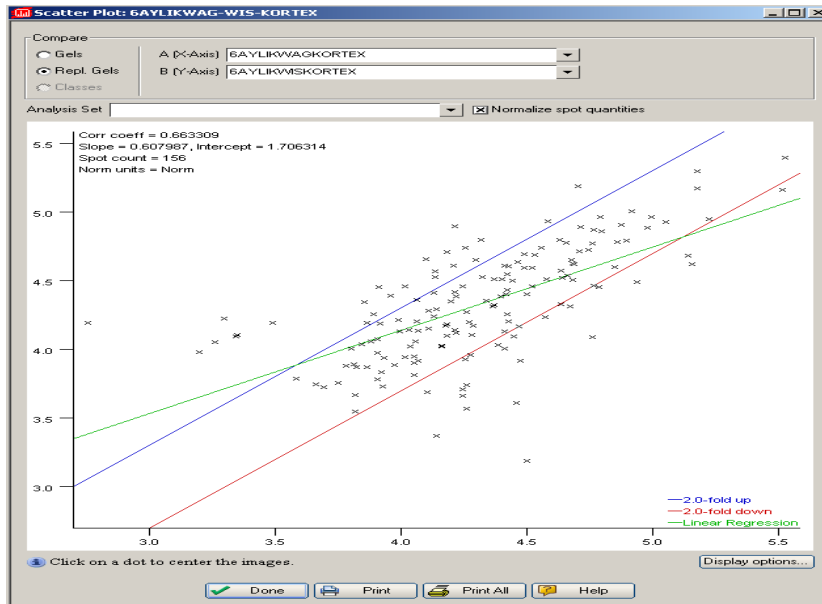
#### 4.2.1.2. 6 aylık yaştaki türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar

##### 4.2.1.2.A. 6 aylık Wistar sıçanın korteksi ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın korteksinin proteomik analizi

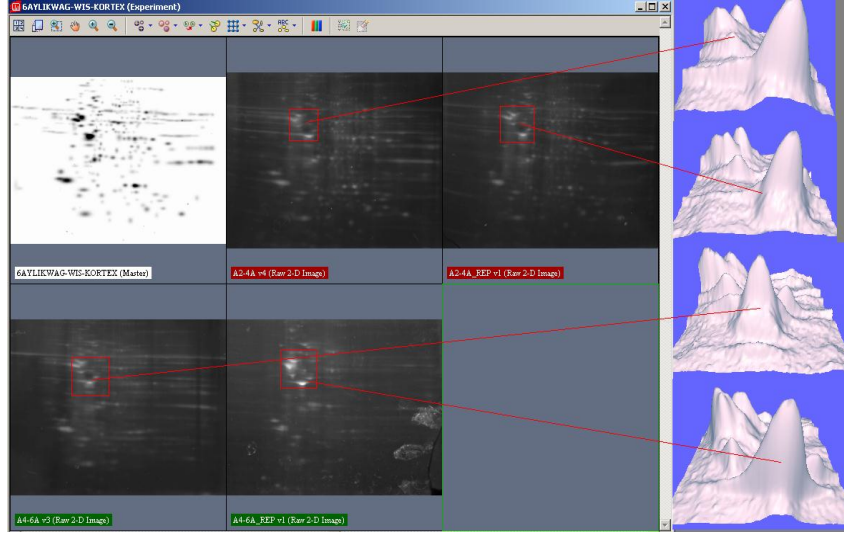




Şekil 4.58. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması



Şekil 4.59. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

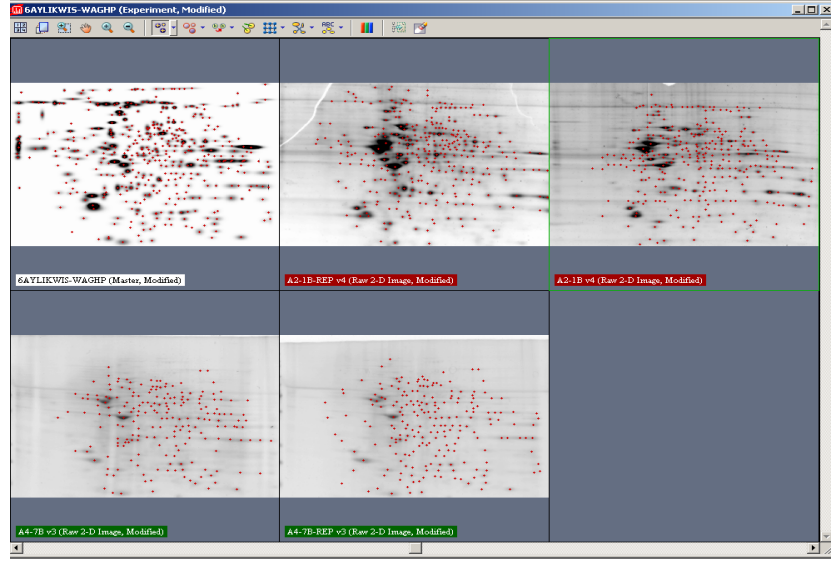


**Şekil 4.60.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

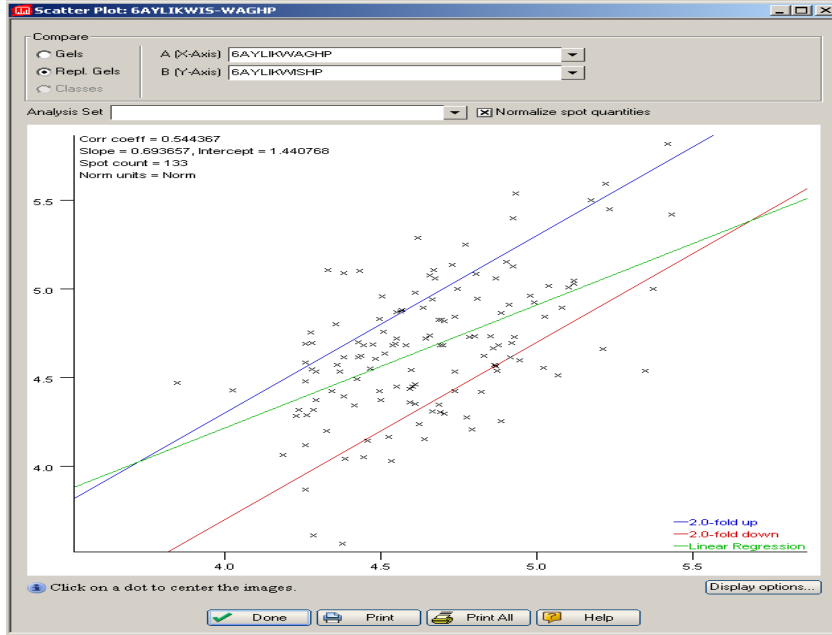
**Çizelge 4.17.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

6 aylık wag/wis kortekslerinin PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A4-6A	6 aylık wis sıçan	214	149	68	24	23	109	38
A4-6A_Tekrarı		173	81	92				
A2-4A	6 aylık wag sıçan	305	185	120				
A2-4A_Tekrarı		278	278	0				

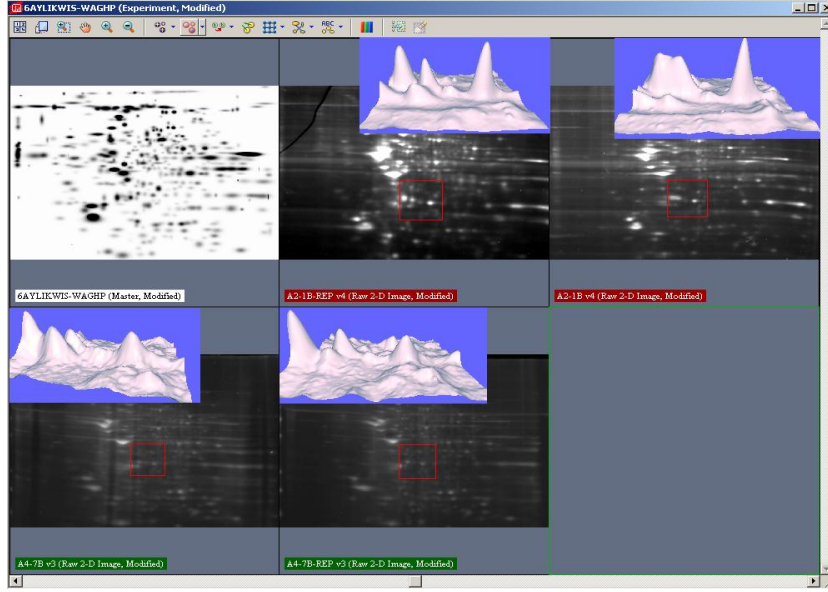
**4.2.1.2.B.** 6 aylık Wistar sıçanın hipokampusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusunun proteomik analizi



Şekil 4.61. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması



Şekil 4.62. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

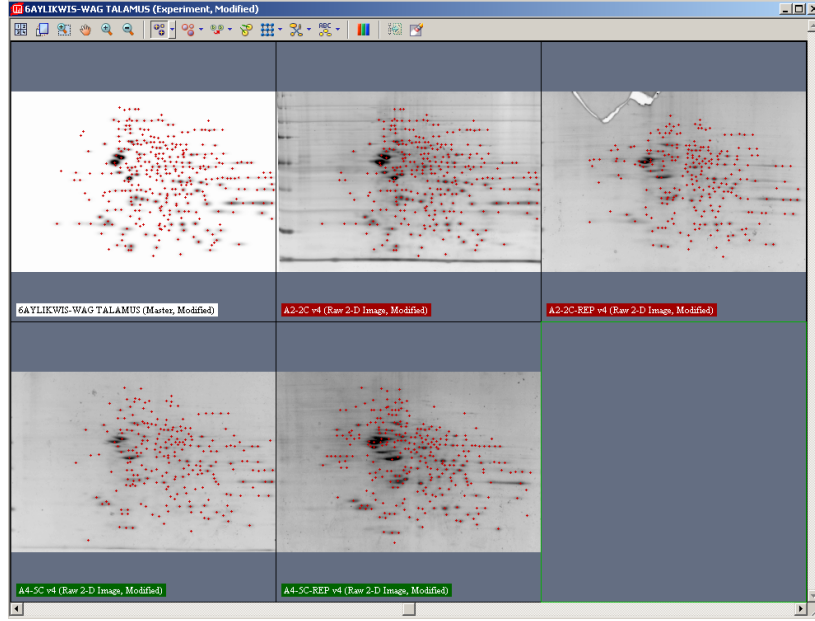


**Şekil 4.63.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

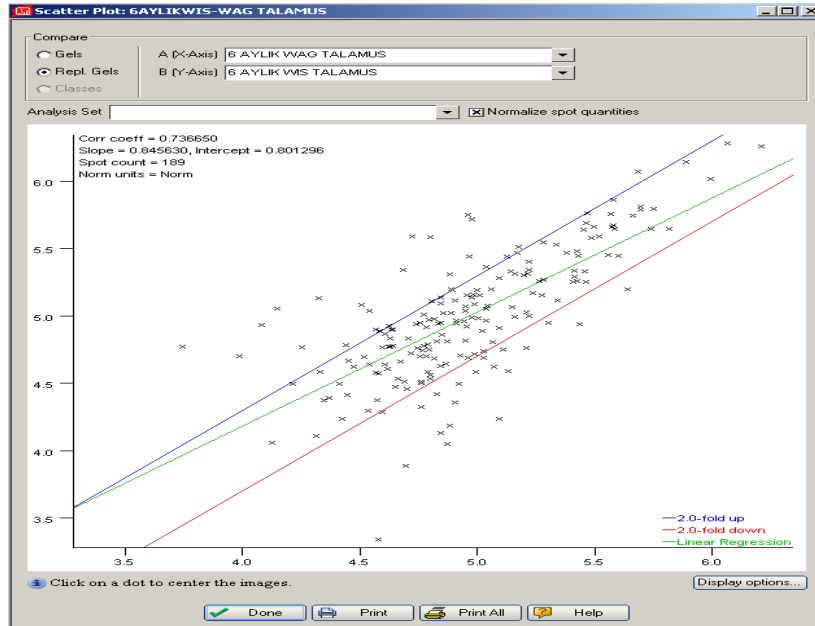
**Çizelge 4.18.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

6 aylık wag/wis hipokampuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A4-7B	6 aylık wis sıçan	200	156	44	27	27	79	80
A4-7B Tekrarı		210	208	2				
A2-1B	6 aylık wag sıçan	320	226	94				
A2-1B Tekrarı		314	198	116				

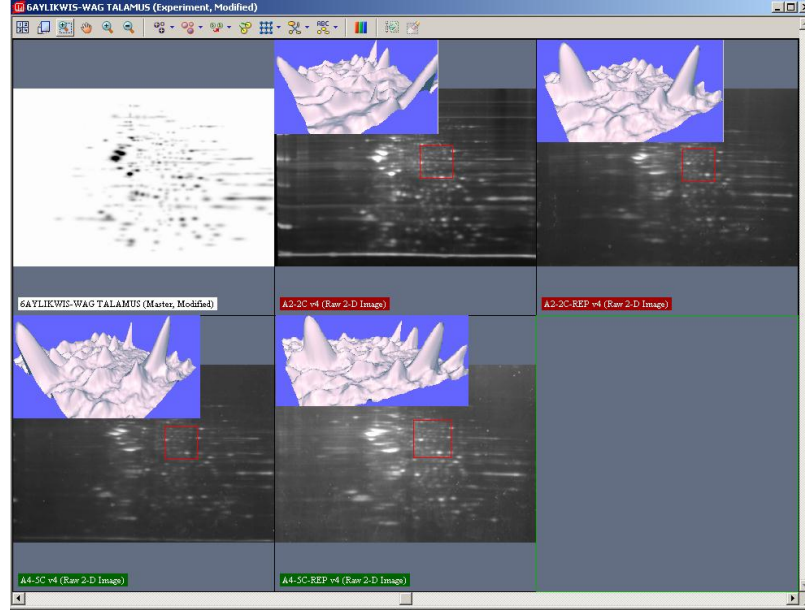
#### 4.2.1.2.C. 6 aylık Wistar sıçanın talamusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın talamusunun proteomik analizi



Şekil 4.64. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması



Şekil 4.65. 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



**Şekil 4.66.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

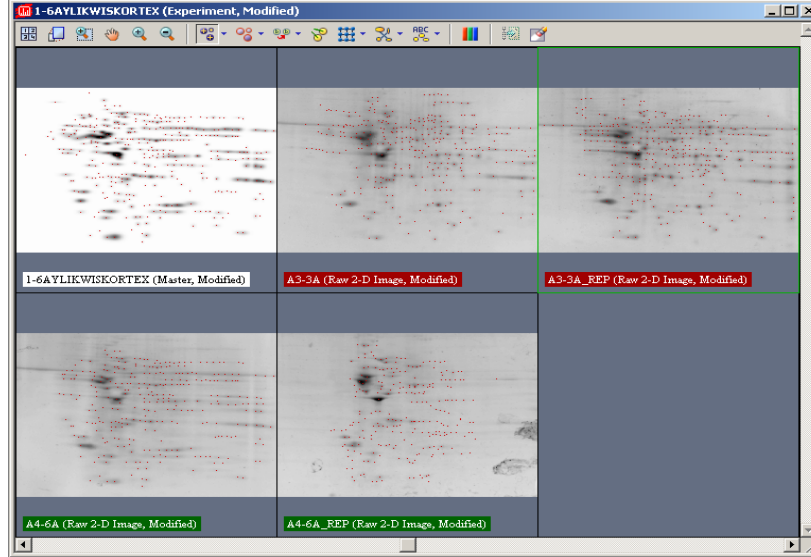
**Çizelge 4.19.** 6 aylık Wag/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

6 aylık wag/wis talamuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A4-5C	6 aylık wis sıçan	231	179	52	26	20	143	25
A4-5C_Tekrarı		286	169	117				
A2-2C	6 aylık wag sıçan	290	290	0	26	20	143	25
A2-2C_Tekrarı		248	163	85				

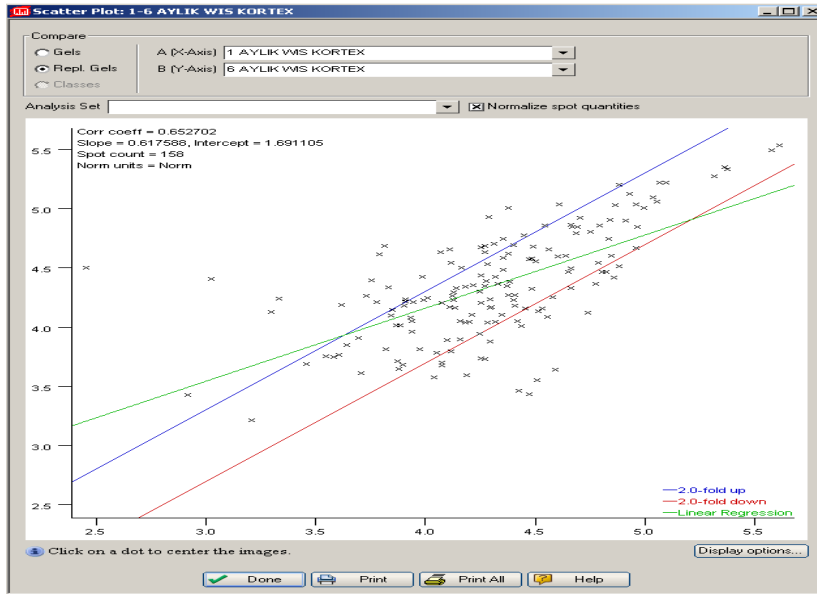
## 4.2.2. Yaşa bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar

### 4.2.2.1. Wistar sıçanlarda yaşa bağlı değişimin değerlendirilmesi

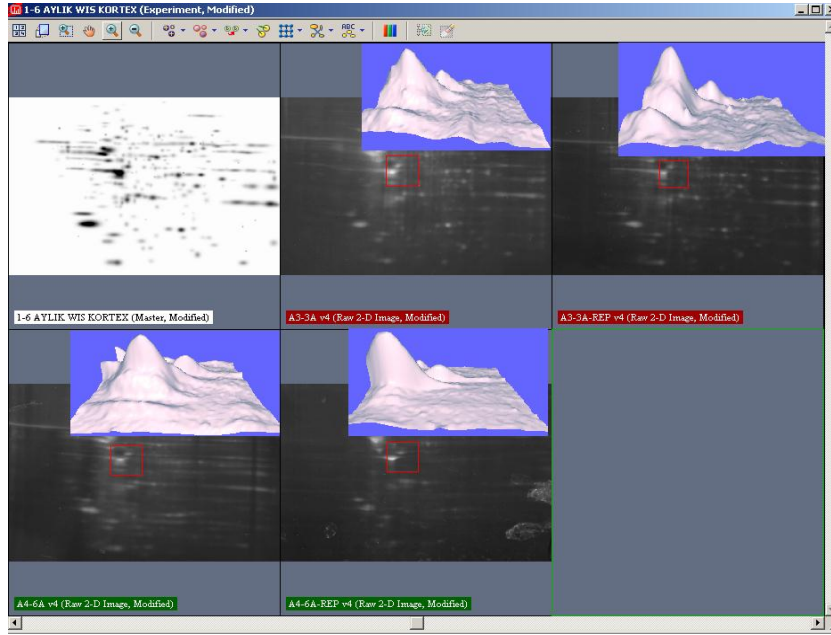
#### 4.2.2.1.A. 1 aylık Wistar sıçanın korteksi ile 6 aylık Wistar sıçanın korteksin proteomik analizi



Şekil 4.67. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.68. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



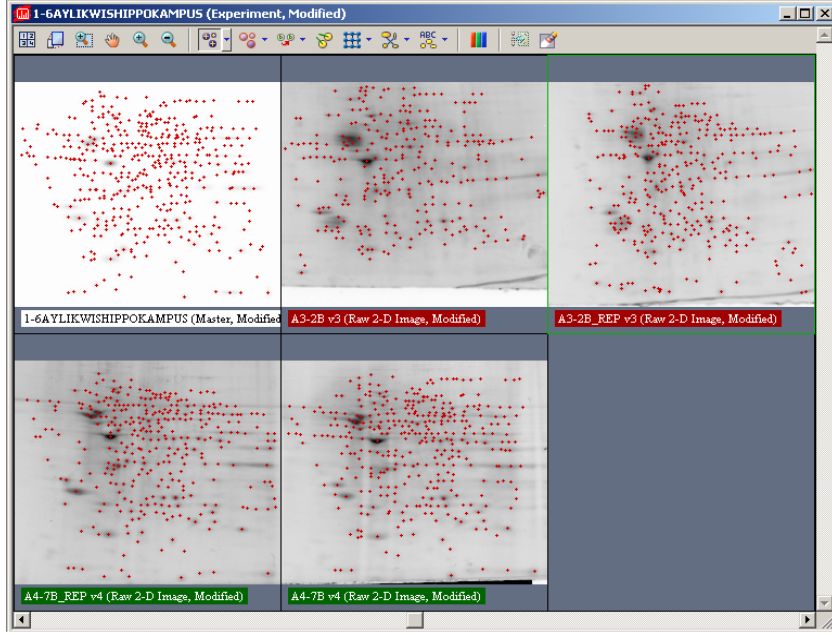
**Şekil 4.69.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

**Çizelge 4.20.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

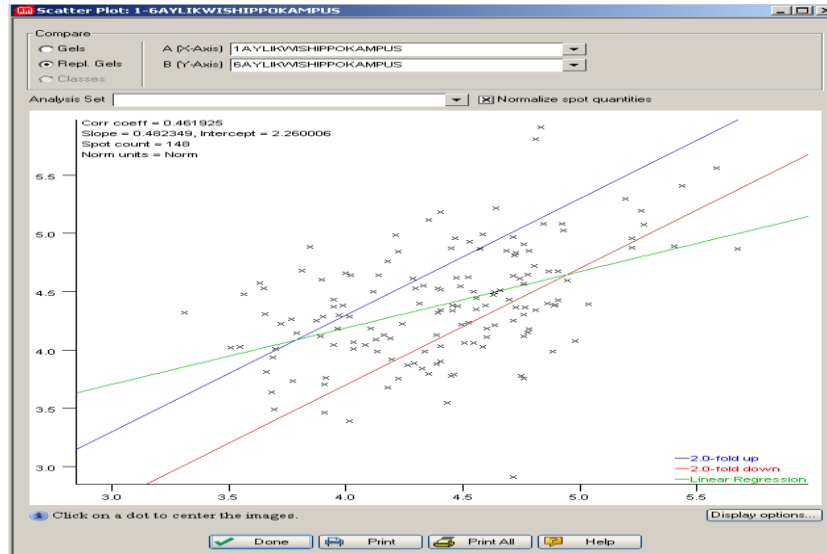
1 aylık Wistar/6 aylık Wistar kortekslerinin PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A3-6A	1 aylık wis sıçan	230	147	83	30	25	103	24
A3-6A_Tekrarı		265	265	0				
A4-6A	6 aylık wis sıçan	225	152	73				
A4-6A_Tekrarı		127	69	58				

#### 4.2.2.1.B. 1 aylık Wistar sıçanın hipokampusu ile 6 aylık Wistar sıçanın hipokampusunun proteomik analizi

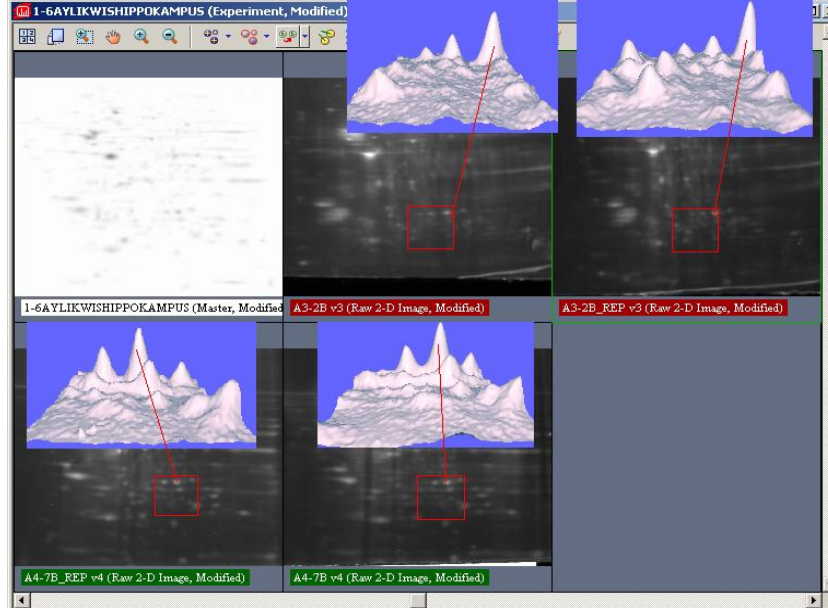




Şekil 4.70. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.71. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

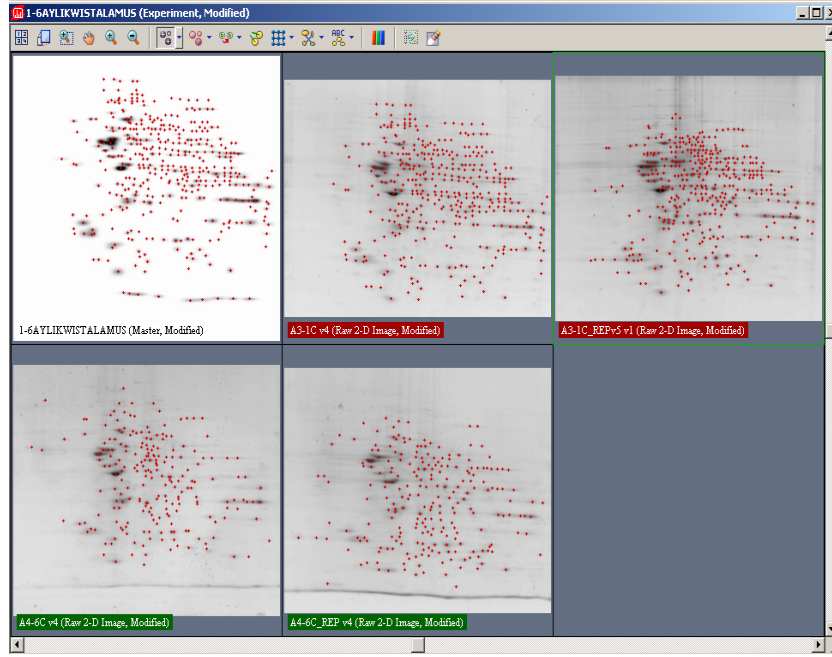


**Şekil 4.72.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

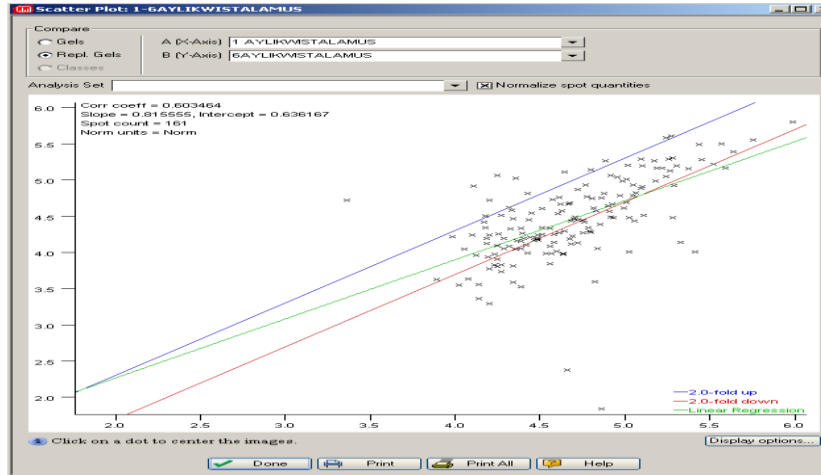
**Çizelge 4.21.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları.

1 aylık Wistar/6 aylık Wistar hipokampuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A2-2B	1 aylık wis sıçan	295	162	133	49	38	72	90
A2-2B_Tekrarı		273	191	82				
A4-7B	6 aylık wis sıçan	367	239	128				
A4-7B_Tekrarı		345	345	0				

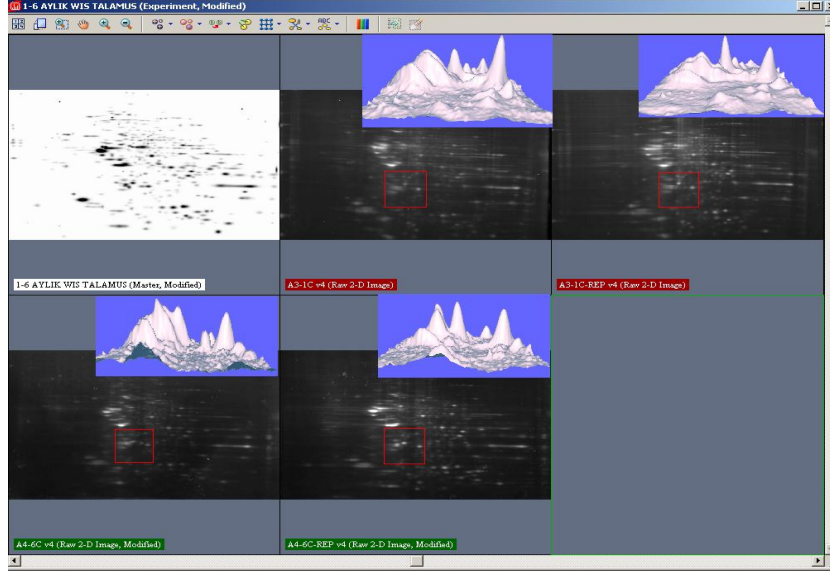
#### 4.2.2.1.C. 1 aylık Wistar sıçanın talamusu ile 6 aylık Wistar sıçanın talamusunu proteomik analizi



Şekil 4.73. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.74. 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



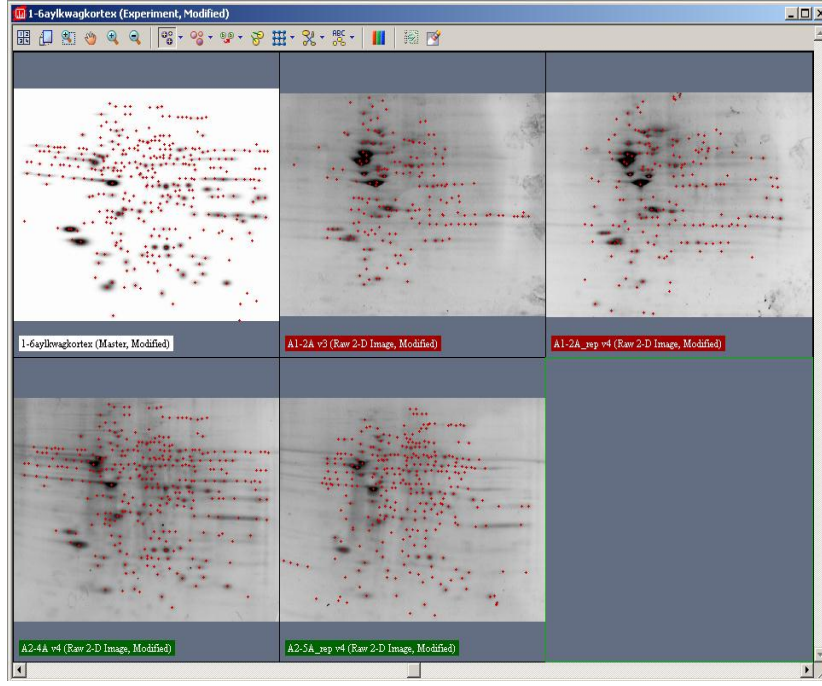
**Şekil 4.75.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

**Çizelge 4.22.** 1 aylık Wistar ırkı sıçanlar ile 6 aylık Wistar ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

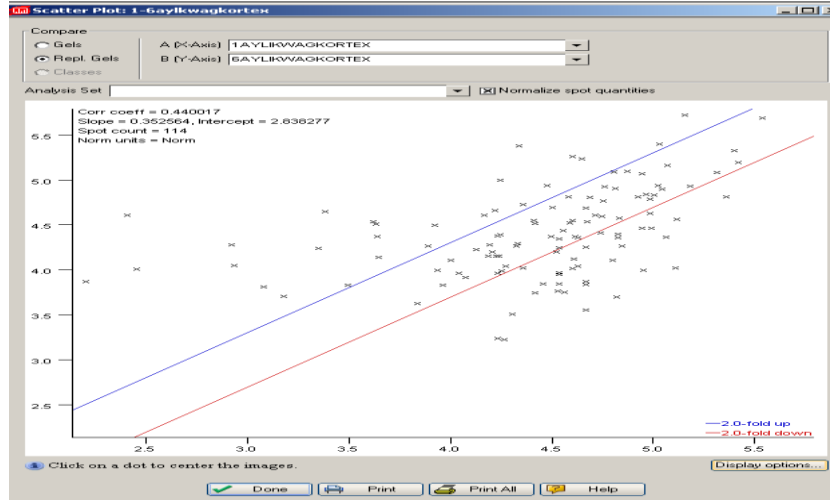
1 aylık Wistar/6 aylık Wistar talamuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A3-1C	1 aylık wis sıçan	404	275	129	29	31	114	105
A3-1C_Tekrarı		441	251	190				
A4-6C	6 aylık wis sıçan	200	157	43				
A4-6C_Tekrarı		228	228	0				

#### 4.2.2.2. Wag/Rij sıçanlarda yaşa bağlı değişimin değerlendirilmesi

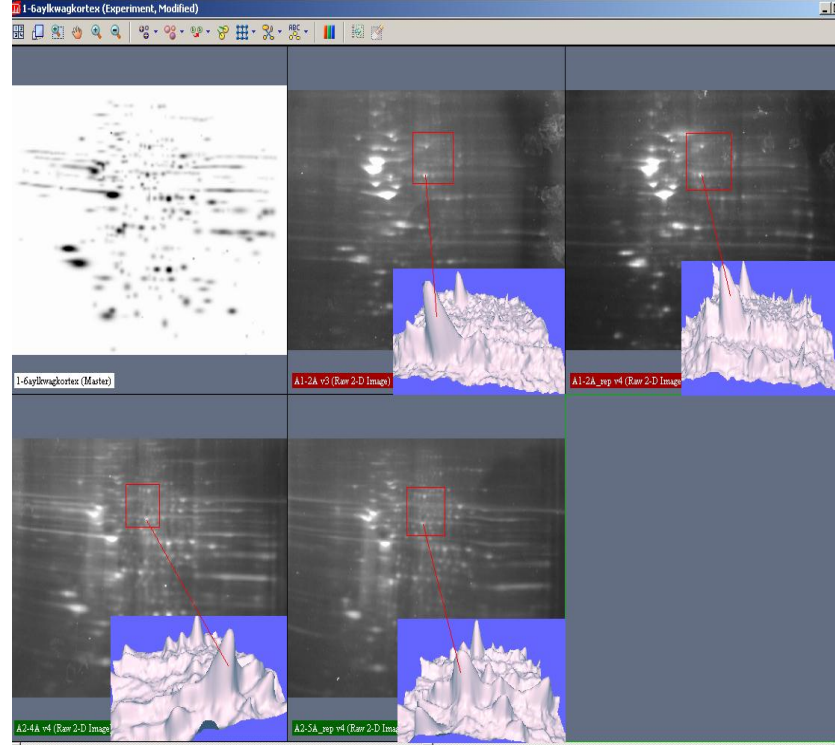
**4.2.2.2.1.A.** 1 aylık Wag/Rij sıçanın korteksi ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın korteksinin proteomik analizi



Şekil 4.76. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.77. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

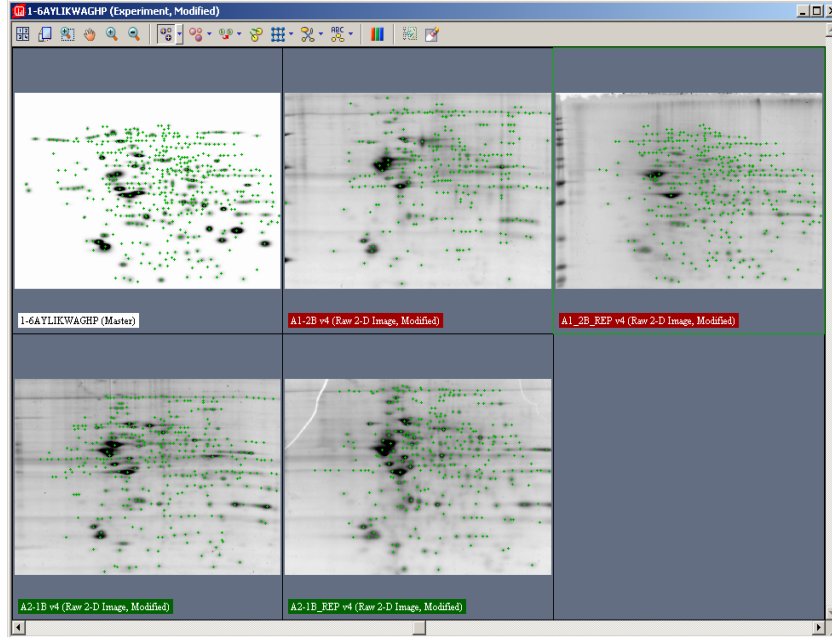


**Şekil 4.78.** 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

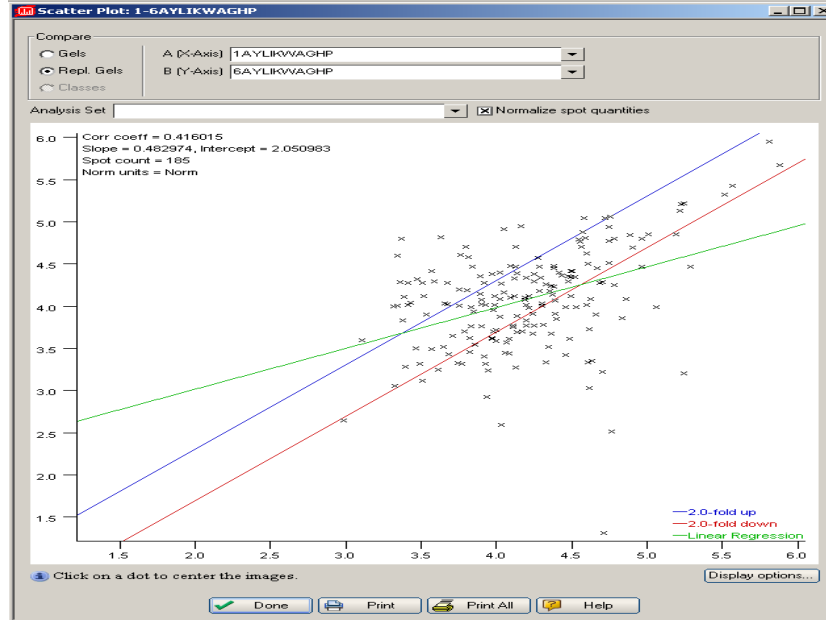
**Çizelge 4.23.** 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların kortekslerinden elde edilen jellerdeki spot sayıları

1 aylık Wag/Rij/6 aylık Wag/Rij kortekslerinin PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A1-2A	1 aylık wag Sıçan	181	75	106	33	26	55	75
A1-2A Tekrarı		185	91	94				
A2-4A	6 aylık wag sıçan	322	322	0	33	26	55	75
A2-4A Tekrarı		303	180	123				

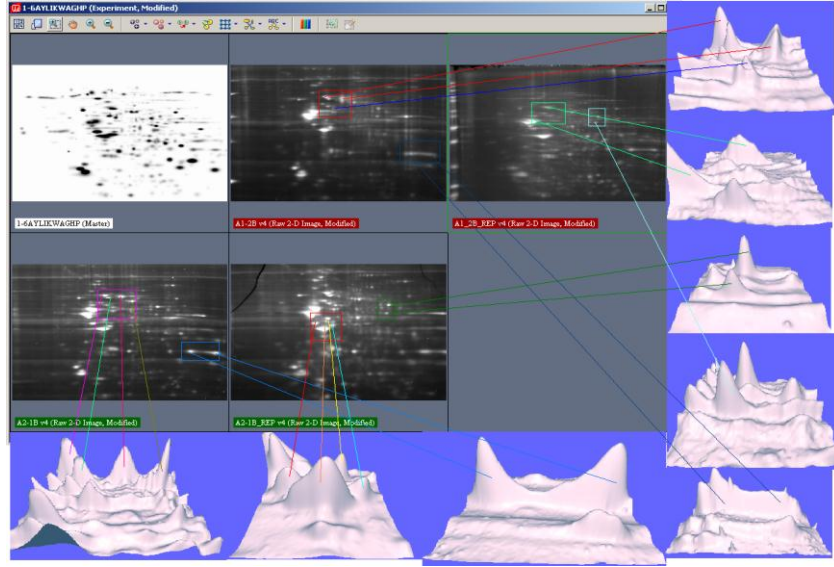
**4.2.2.2.1.B.** 1 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın hipokampusunun proteomik analizi



Şekil 4.79. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.80. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.



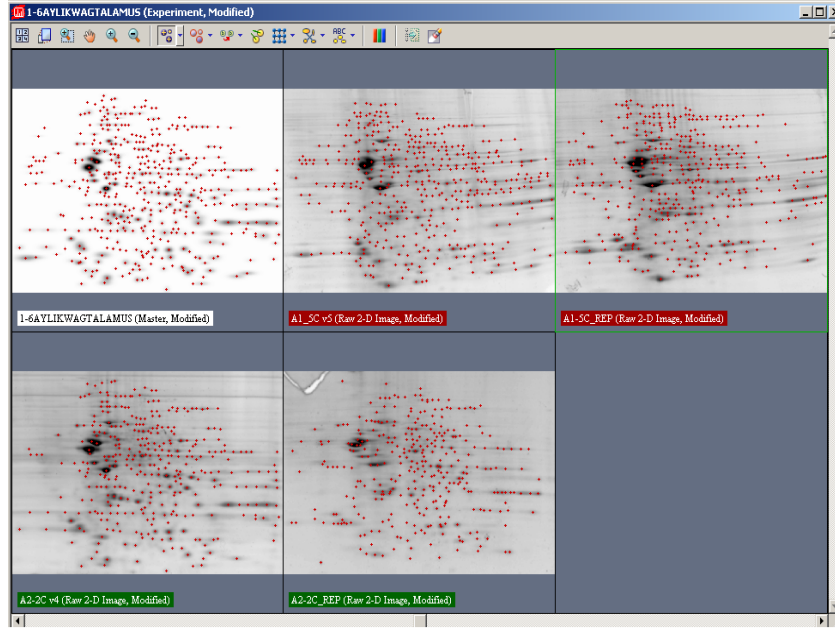
**Şekil 4.81.** 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında ortak bulunan spotların 3D görüntüsü.

**Çizelge 4.24.** 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların hipokampuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları

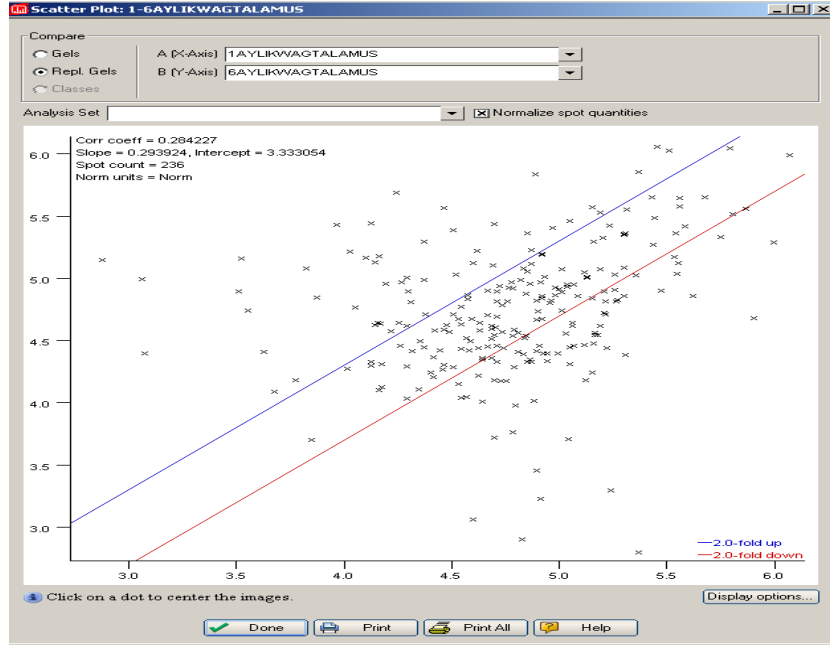
1 aylık Wag/Rij/6 aylık Wag/Rij hipokampuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A1-2B	1 aylık wag sıçan	299	127	172	61	40	84	24
A1-2B_Tekrarı		356	356	0				
A2-1B	6 aylık wag sıçan	357	176	181				
A2-1B_Tekrarı		312	137	175				

#### 4.2.2.2.1.C. 1 aylık Wag/Rij sıçanın talamusu ile 6 aylık Wag/Rij sıçanın talamusunun proteomik analizi

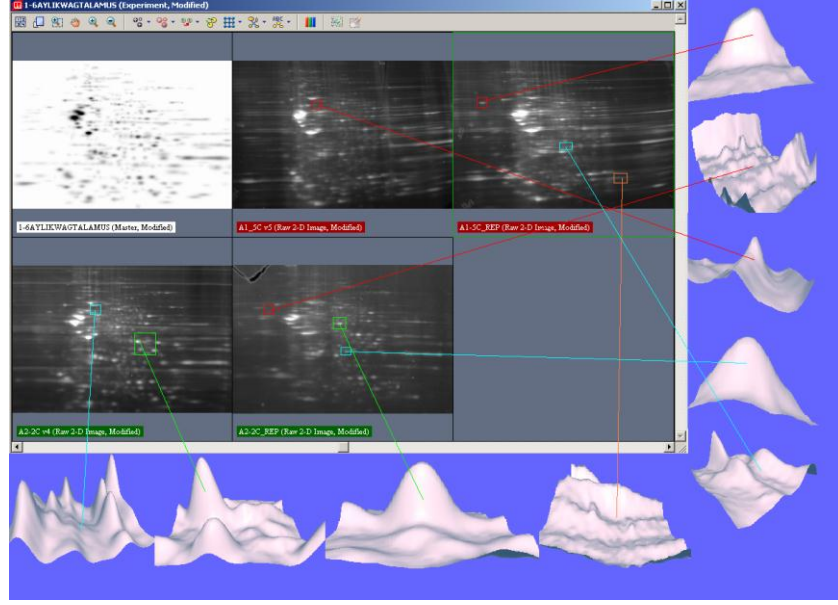




Şekil 4.82. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.83. 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsündeki spotların dağılım grafiği.

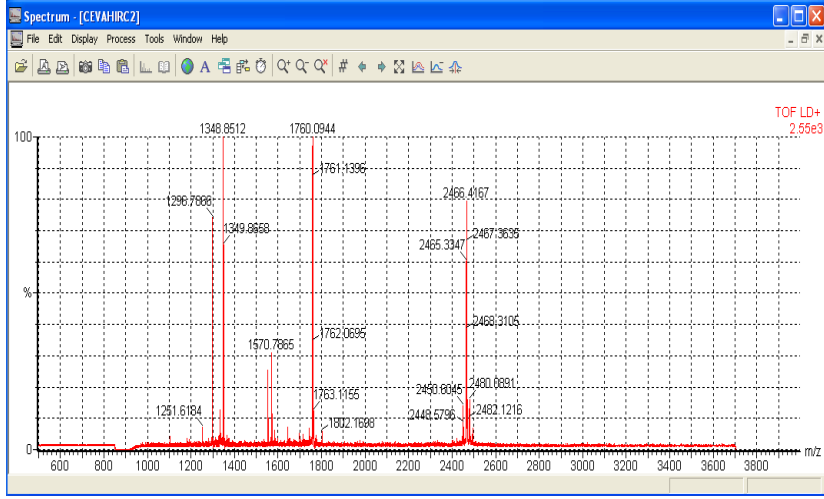


**Şekil 4.84.** 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen 2D jel elektroforezi görüntüsünde denekler arasında bulunan spotların 3D görüntüsü.

**Çizelge 4.25.** 1 aylık WAG/Rij ırkı sıçanlar ile 6 aylık WAG/Rij ırkı sıçanların talamuslarından elde edilen jellerdeki spot sayıları.

1 aylık Wag/Rij/6 aylık Wag/Rij talamuslarının PDQuest jel analizi sonuçları								
Örnek		Kalitatif Analiz			Kantitatif Analiz			
Kodu	Grubu	Toplam spot sayısı	Referans jelde		En az 2 kat artan spot sayısı	En az 2 kat azalan spot sayısı	Ortak spot sayısı	P<0.05 anlamlılıkta değişen spot sayısı
			Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı				
A1-5C	1 aylık wag sıçan	437	286	151	50	70	116	22
A1-5C_Tekrarı		418	235	183				
A2-2C	6 aylık wag sıçan	352	352	0				
A2-2C_Tekrarı		327	176	151				

### 4.3. Proteinlerin tanımlanması



Şekil 4.85. MALDI kütle spektrometresinin kalibrasyonu.

MALDI kütle spektrometresinde tanımlanmak üzere yapılan 2D jellerden seçilen spotlardan; gerek korteks gerekse de talamusda türe ve yaşa bağlı değişim açısından değerlendirildiğinde, protein ekspresyonlarında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Hipokampus örnekleri de aynı spotlar üzerinden çalışılmış fakat seçilen spotlarda benzer şekilde önem kazanan proteinler bulunamamıştır.

Çizelge 4.26. Korteks, hipokampus ve talamusda MALDI kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinler

Protein Kodu	Protein Adı	Teorik pI/pA	Deneysel pI/pA	Veri Tabanı	Cov%	Skor

Q66H45	Tetratricopeptide Repeat Protein 36	5,15/20138	4,9/28	Mascot(kDa)	-	15
Q7TNY7	RAB Effector MYRIP	5,9/95	5,7/85	Aldente(Da)	1	-
Q5MYW3	Full=2-5 Oligoadenylate Synth	7,1/59	6,8/60	Aldente(Da)	1	
A0JPP7	Protein DDI1 Homolog 1	5,76/45421	5,3/42,1	Mascot(kDa)	-	16
P63043	Stathmin-4	35,76/22073	6/35	Mascot(kDa)	-	10
BOBNE2	DNA-Directed Rna Polymerase I, I <sub>1</sub> And I <sub>1</sub> Subunit Rpabc1	5,69/24552	6/35	Mascot(kDa)	-	9
P23457	3-Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase	6,67/37003	6/35	Mascot(kDa)	-	27
Q6AYU0	Uncharacterized Protein C12orfhomolog	8,88/47005	8,88/50	Mascot(kDa)	-	9
Q3L7M0	Glycosyltransferase 6 Domain-Containing Protein 1	9,08/38291	8,88/38	Mascot(kDa)	-	10
O35179	Endophilin-A1	/28588	8,88/38	Mascot(kDa)	-	9
Q5BK22	GTP-Binding Protein 8	9,27/32210	8,88/38	Mascot(kDa)	-	10
Q5M965	Probable Trna(His) Quanylyltransferase	8,44/34827	8,88/38	Mascot(kDa)		9
Q6AXN9	Rib43a-Like With Coiled Coils Protein 2	9,22/37275	8,88/38	Mascot(kDa)		9
Q812B7	Cathepsin Q2	tanımlanmamış	8,88/38	Mascot(kDa)	-	10
Q5M819	Phosphoserine Phosphatase	5,49/24951	4,9/28	Mascot(kDa)	-	11
P17209	Myosin Light Chain 4	4,97/21137	5,2/26	Mascot(kDa)	-	9
Q68A21	Transcriptional Activator Protein Pur Beta	5,35/33266	5,6/45	Mascot(kDa)	-	12
P14668	Annexin A5	4,93/35591	5,6/45	Mascot(kDa)	-	10
Q9QZP1	Survival Of Motor Neuron Protein-Interacting Protein 1	5,37/30421	5,6/45	Mascot(kDa)	-	9
Q9ES39	Nuclear Distribution Protein Nude Homolog 1	5,32/38504	5,6/45	Mascot(kDa)	-	9
Q99MZ8	Lim And Sh3 Domain Protein 1	6,61/29951	5,3/42,1	Mascot(kDa)	-	8

**Çizelge 4.26.** Korteks, hipokampus ve talamusda MALDI kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinler (devam)

Protein	Protein Adı	Teorik	DeneySEL	Veri Tabanı	Cov%	Skor
---------	-------------	--------	----------	-------------	------	------

Kodu		pI/mA	pI/mA			
Q5U2M7	An1_Type Zinc Finger Protein 3	6,44/25065	5,8/26	Mascot(kDa)	-	11
O08697	ADP-Ribosylation Factor Like Protein 2	5,67/20691	5,8/26	Mascot(kDa)	-	9
A1L108	Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 5-Like Protein	6,37/16868	5,6/24	Mascot(kDa)	-	10
Q498E2	Uncharacterized Protein C8orf42 Homolog	5,63/20159	5,6/24	Mascot(kDa)	-	9
Q9EQX9	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 N	6,13/17112	5,6/24	Mascot(kDa)	-	9
Q63524	Transmembrane Emp24 Domain-Containing Protein	5,17/20767	4,9/28	Mascot(kDa)	-	9
Q6AYM2	Tektin-2	5,75/50264	6,2/65	Mascot(kDa)	-	9
P41156	Protein C-Ets-1	5,05/50390	6,2/65	Mascot(kDa)	-	8
Q68FQ0	T-Complex Protein 1 Subunit Epsilon	5,5/59	5,6/58	Aldente(Da)	9	-
Q62879	Ppar Delta Protein	6,9/50	6,9/50	Aldente(Da)	7	
Q99ND3	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta	6,9/50	6,9/50	Aldente(Da)	7	
Q9QWI0	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta	7,20/50	6,9/50	Aldente(Da)	7	
P69060	N-Acylneuraminate Cytidylyltransferase	8,51/48089	7,7/52	Mascot(kDa)	-	17
Q5FVR5	Acyl-Coenzyme A Amino Acid N-Acyltransferase 2	8,64/45980	7,7/52	Mascot(kDa)	-	15
Q5PPP1	Clta Proteim	4,43/23551	5,2/26	Mascot(kDa)	-	13
Q62639	Gtp-Binding Protein Rheb	5,65/20149	5,2/26	Mascot(kDa)	-	14
Q6Q0N2	Protein Fam89a	5,35/18581	6/20	Mascot(kDa)	-	17
B1WC03	Rgd1311066 Protein	5,2/44	5,3/42,1	Aldente	12	-
P58821	Neuron-Specific Vesicular Protein Calcyon	5,77/24702	4,9/28	Mascot(kDa)	-	16
Q99JD2	Tektin-1	5,61/48561	6,2/65	Mascot(kDa)	-	9

**Çizelge 4.27.** Korteks, hipokampus ve talamusda MALDI kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerde bulunan değişiklikler

Protein	Korteks	Hipokampus	Talamus
---------	---------	------------	---------

Kodu	1Wa	1Wi	6Wa	6Wi	1Wa	1Wi	6Wa	6Wi	1Wa	1Wi	6Wa	6Wi
B1WC03	*	*	*	*↓	*	*	*	*	*	*	*	*
P58821	*↑	*	*↑	*	*	*↑	*	*↓	*↓	*	*↑	*↓
Q66H45	*↑	*	*↑	*	*	*↑	*	*↓	*↓	*	*↑	*↓
Q7TNY7	*	yok	↑	yok	yok	*↑	*	*	*↓	*	*↑	*
Q5MYW3	*	yok	*↑	yok	yok	yok	*↑	*	yok	*	yok	*
A0JPP7	*	*	*	*↓	*	*	*	*	*	*	*	*
P63043	*↑	*↓	*↑	*↓	*	*↑	*	*	yok	*	*↓	yok
BOBNE2	yok	yok	*	yok	*	*↑	*	*	yok	*	*↓	yok
P23457	yok	yok	yok	yok	*	*↑	*↓	*↓	*	*↑	*	*↑
Q6AYU0	yok	yok	yok	yok	yok	*	*↑	*↓	*	*	yok	*
Q3L7M0	yok	yok	*	*	*	*↑	*↑	*	*	*	*	*
O35179	yok	yok	*	*	*	*↑	*↑	*	*	*	*	*
Q5BK22	yok	yok	*	*	*	*↑	*↑	*	*	*	*	*
Q5M965	yok	yok	*	*	*	*↑	*↑	*	*	*	*	*
Q6AXN9	yok	yok	*	*	*	*↑	*↑	*	*	*	*	*
Q812B7	yok	yok	*	*	*	*↑	*↑	*	*	*	*	*
Q5M819	*↑	*	*↑	*	*	*↑	*	*↓	*	*↑	*	*
P17209	*↑	*↓	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*↑	*	*
Q68A21	*	*	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*↑	*	*↑
P14668	*	*	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*↑	*	*↑
Q9QZP1	*	*	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*↑	*	*↑
Q9ES39	*	*	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*↑	*	*↑
Q99MZ8	*	*	*	*↓	*	*	*	*	*	*	*	*
Q5U2M7	*	*	*↑	*	*	*	*↑	*↓	*↓	*↑	*	*
O08697	*	*	*↑	*	*	*	*↑	*↓	*↓	*↑	*	*
A1L108	*	yok	*↑	*	*	*↑	*	yok	*	*	yok	yok

**Çizelge 4.27.** Korteks, hipokampus ve talamusda MALDI kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerde bulunan değişiklikler (devam)

Protein	Korteks	Hipokampus	Talamus
---------	---------	------------	---------

Kodu	1Wa	1Wi	6Wa	6Wi	1Wa	1Wi	6Wa	6Wi	1Wa	1Wi	6Wa	6Wi
Q9EQX9	*	yok	*↑	*	*	*↑	*	yok	*	*	yok	yok
Q63524	*	*↓	*	*↓	*	*↑	*	*↓	*	*↑	*	*
Q6AYM 2	*↓	*↑	*↑	*↓	*	*↑	*↑	*↓	*	*	*	*
Q99JD2	*↓	*↑	*↑	*↓	*	*↑	*↑	*↓	*	*	*	*
P41156	*↓	*↑	*↑	*↓	*	*↑	*↑	*↓	*	*	*	*
Q68FQ0	yok	*	*	yok	*	*↑	*↑	*	yok	*	*	*
Q62879	yok	yok	yok	yok	*	*↑	yok	*↑	yok	*	*	*
Q99ND3	yok	yok	yok	yok	*	*↑	yok	*↑	yok	*	*	*
Q9QW10	yok	yok	yok	yok	*	*↑	yok	*↑	yok	*	*	*
P69060	yok	yok	*	yok	*↓	*↑	*	*	*	*	*	*
Q5FVR5	yok	yok	*	yok	*↓	*↑	*	*	*	*	*	*
Q5PPP1	*↑	*↓	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*	*	*
Q62639	*↑	*↓	*↑	*↓	*	*↑	*	*	*	*	*	*
Q6Q0N2	*	*	*	*	*	*	*↑	*↓	*	*	*	*

(1Wa; 1 aylık Wag/Rij sıçan, 1Wi; 1 aylık Wistar sıçan, 6Wa; 6 aylık Wag/Rij sıçan, 6Wi; 6 aylık Wistar sıçan, \*; protein var, \*↑; protein var ve ekspresyonu 2 kat ve daha fazla kat artmış, \*↓ protein var ve ekspresyonu 2 kat ve daha fazla kat azalmış).

#### 4.3.1. Türe bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar

##### 4.3.1.1. Korteks dokusunun değerlendirilmesi

**Çizelge 4.28.** Kortekste türe bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi

PROTEİN İSMİ	1 AYLIK		6 AYLIK	
	Wag/Rij	Wistar	Wag/Rij	Wistar
Myosin Light Chain 4	var↑	var↓	var↑	var↓
Neuron-Specific Vesicular Protein Calcyon	var↑	var	var↑	var
Stathmin-4	var↑	var↓	var↑	var↓
Phosphoserine Phosphatase	var↑	var	var↑	var
CLTA Protein	var↑	var↓	var↑	var↓
GTP-Binding Protein Rheb	var↑	var↓	var↑	var↓
Transmembrane Emp24 Domain- Containing Protein	var	var↓	var	var↓
Tetratricopeptide Repeat Protein 36	var↑	var	var↑	var

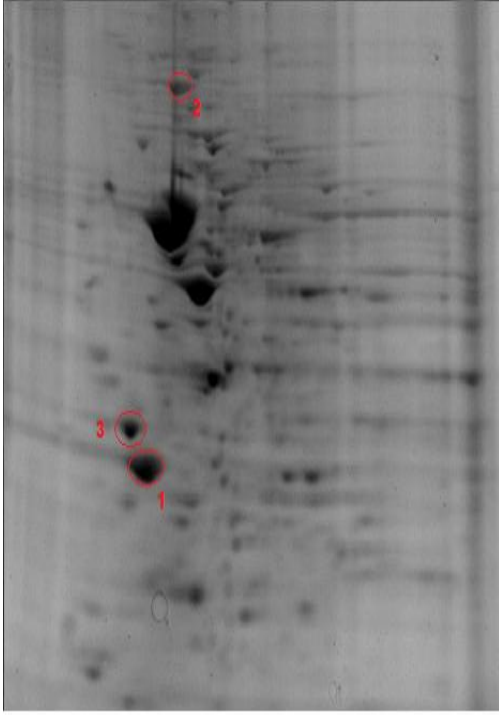
(↑ ekspresyonu 2 kat ve daha fazla kat artmış, ↓; ekspresyonu 2 kat ve daha fazla kat azalmış)

**Çizelge 4.29.** Korteksde türe bağlı değişim gösteren proteinlerin fonksiyonel özellikleri

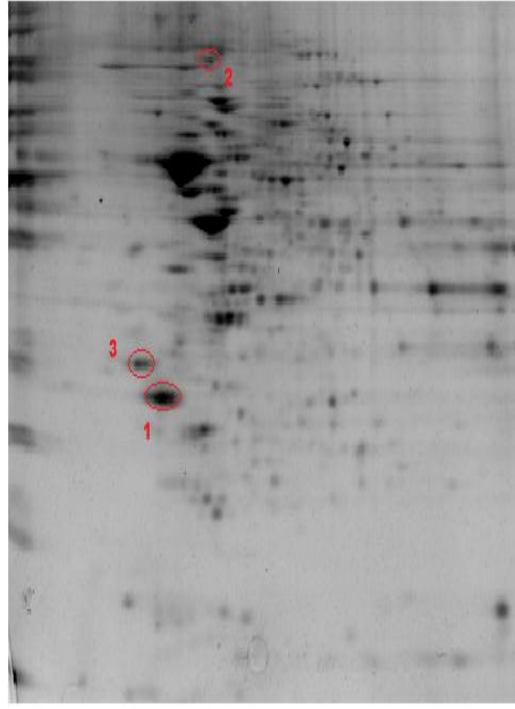
PROTEİN N NO	PROTEİN İSMİ	MOLEKÜLER FONKSİYONU	FONKSİYONU
P17209	Myosin Light	Motor protein, kas	--



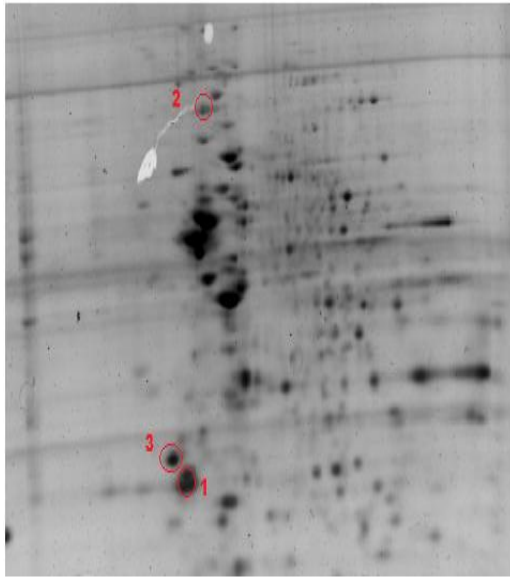
	Chain 4	proteini, miyozin, kalsiyum iyon bağlanması, , motor aktivite	
P58821	Neuron-Specific Vesicular Protein Calcyon	Clathrin hafif zincir bağlanması, dopamin reseptör bağlanması	Clathrin hafif zincir A ile ilişkilidir ve clathrinin kendiliğinden kurulmasını ve kaltrin aracılı endositozisi uyarır.
P63043	Stathmin-4	--	--
Q5M819	Phosphoserine Phosphatase	--	Karbonhidratlardan serin biyosentezindeki son basamağı katalizler. Bir fosforil enzimi ara ürününün oluşumu aracılığıyla reaksiyon mekanizması devam etmektedir.
Q5PPP1	CLTA protein	Peptid bağlanması, protein bağlanması, yapısal molekül aktivitesi	--
Q62639	GTP-Binding Protein Rheb	GDP bağlanması, GTP bağlanması, GTPaz aktivitesi, magnezyum iyon bağlanması, protein bağlanması	S6K1 ve EIF4EBP1'in fosforilasyonunu mTORC1 sinyalinin aktivasyonu sayesinde uyarmaktadır. mTORC1'nin protein kinaz aktivitesini aktive eder. Düşük intrinsik GTPaz aktivitesine sahiptir.
Q63524	Transmembrane Emp24 Domain-Containing Protein	--	Koatomer ile kaplanan tomurcuklanmada ve kaplanmış veziküllerin diğer çeşitlerinde rolü olabilmektedir. Tomurcuklanan vezüküllerin içine toplanan taşıyıcı molekülleri birleştirebilmektedir
Q66H45	Tetratricopeptide Repeat Protein 36	Bağlanma	--



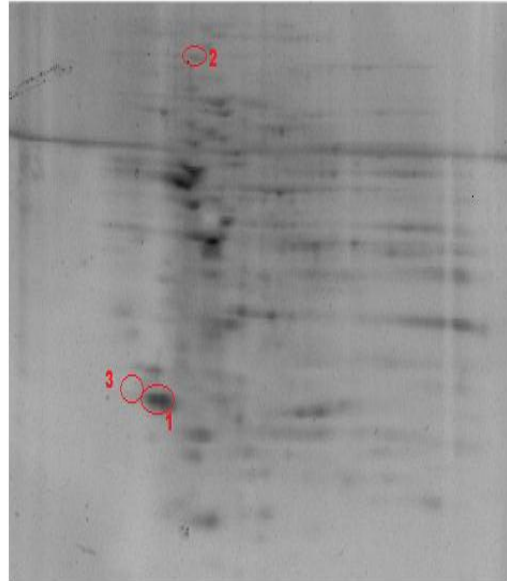
A1-1A\_1 AYLIK WAG KORTEK



A3-2A\_1 AYLIK WMS KORTEK

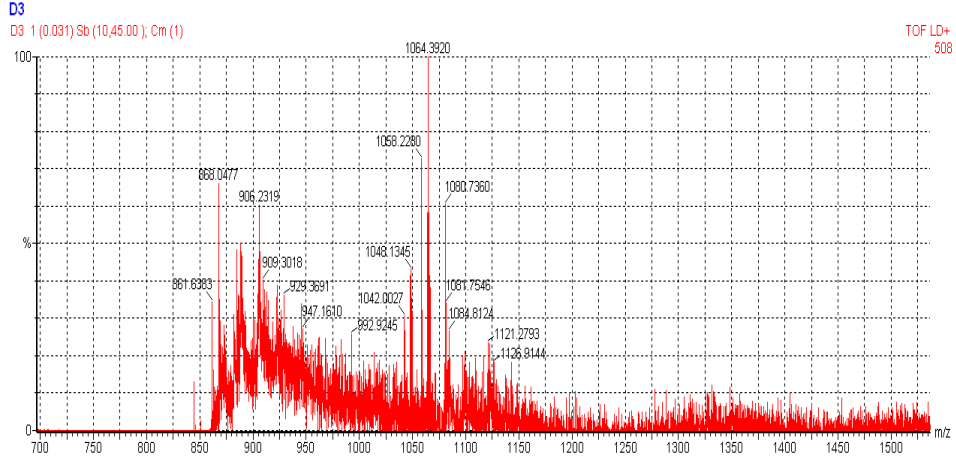


A2-2A\_6 AYLIK WAG KORTEK

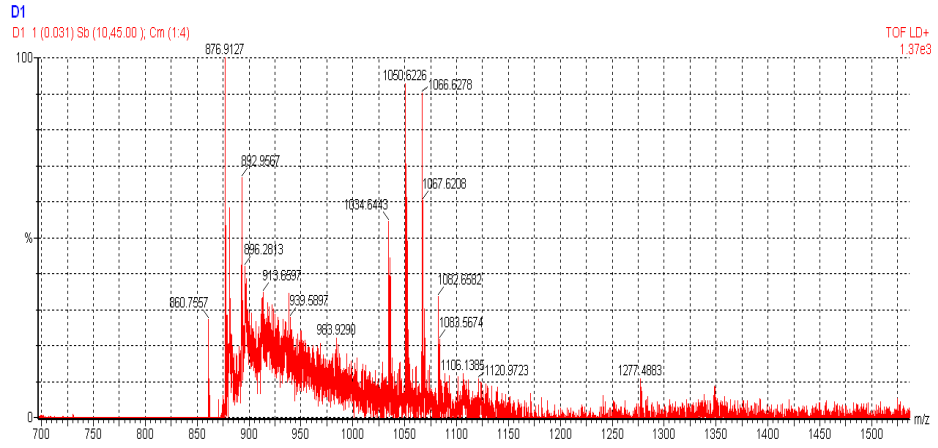


A4-6A\_6 AYLIK WMS KORTEK

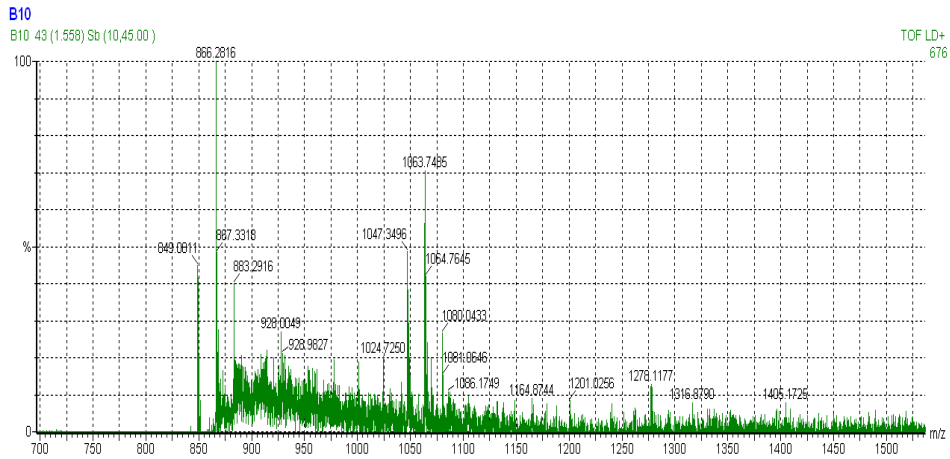
**Şekil 4.86.** Kortekste türe bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1; P17209, P63043, Q5PPP1,Q62639, 2; P58821, Q66H45, 3; Q5M819).



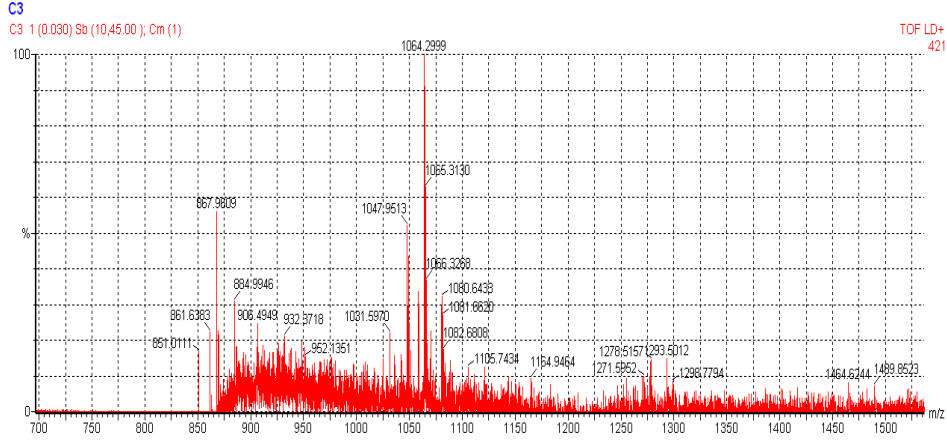
Şekil 4.87. Myosin Light Chain 4'ün spektra görüntüsü (spot numarası:1).



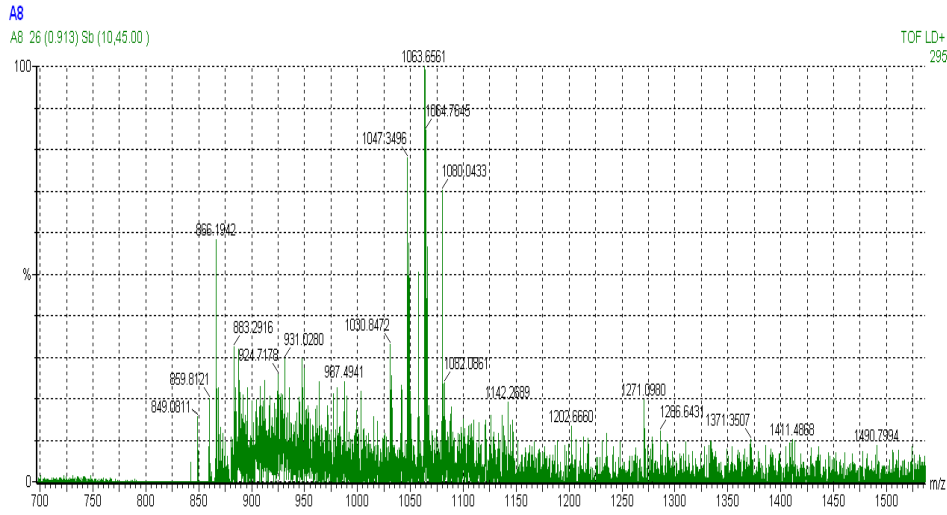
Şekil 4.88. Stathmin-4'ün spektra görüntüsü (spot numarası:1).



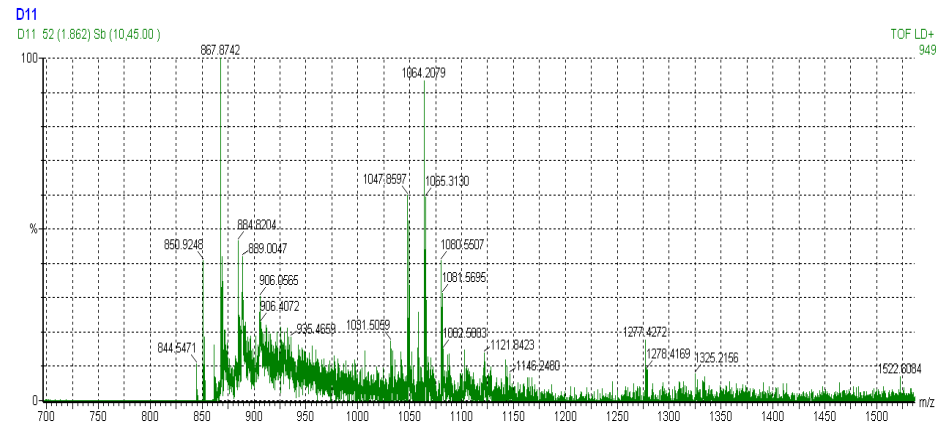
Şekil 4.89. Neuron-Specific Vesicular Protein Calcyon ve Tetratricopeptide Repeat Protein 36'nın spektra görüntüsü (spot numarası:2).



Şekil 4.90. Phosphoserine Phosphatase'in spektra görüntüsü (spot numarası:3).



Şekil 4.91. CLTA protein ve GTP-Binding Protein Rheb'in spektra görüntüsü (spot numarası:1).



Şekil 4.92. Transmembrane Emp24 Domain-Containing Proteinin spektra görüntüsü (spot numarası:3).

#### 4.3.1.2. Talamus dokusunun değerlendirilmesi

**Çizelge 4.30.** Talamusda türe bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi

PROTEİN İSMİ	1 AYLIK		6 AYLIK	
	Wag/Rij	Wistar	Wag/Rij	Wistar
Protein FAM46B	yok	var	yok	var
Annexin A5	var	var↑	var	var↑
3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	var	var↑	var	var↑
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 protein	yok	var	yok	var
Transcriptional Activator Protein Pur Beta	var	var↑	var	var↑
Nuclear Distribution Protein Nude Homolog 1	var	var↑	var	var↑
Survival of motor neuron protein-interacting protein 1	var	var↑	var	var↑

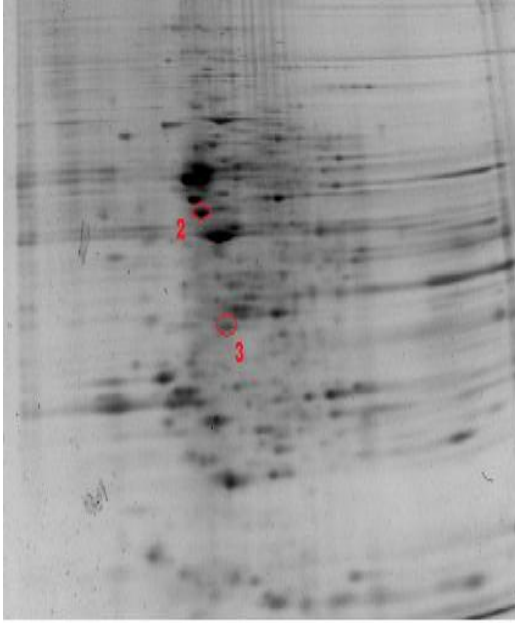
(↑ekspresyonu 2 kat ve daha fazla kat artmış, ↓; ekspresyonu 2 kat ve daha fazla kat azalmış)

**Çizelge 4.31.** Talamusda türe bağlı değişim gösteren proteinlerin fonksiyonel özellikleri

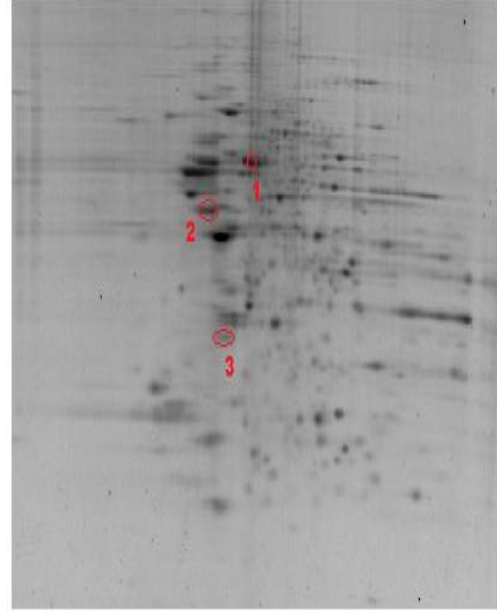
PROTEİN NO	PROTEİNİN İSMİ	MOLEKÜLER FONKSİYONU	FONKSİYONU
B0BNK8	Protein FAM46B	--	--
P14668	Annexin A5	Kalsiyum iyon bağlanması, kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlanması, tirozin kinaz reseptör bağlanması	Bu protein, kan koagülasyon kaskadında tromboplastine özel kompleksin indirek bir inhibitörü gibi davranan, bir antikoagülan proteindir
P23457	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	<u>3-alfa-hidroksisteroid dehidrogenaz (A-özel) aktivitesi</u>	3 alfa hidroksisteroid dehidrogenaz olmasının yanı sıra, enzim çeşitli işlevleri gerçekleştirebilmektedir: quinon redüktaz olarak, aromatik alkol dehidrogenaz olarak, dihidrodiol dehidrogenaz olarak, 9-,11- ve 15-hidroksi prostaglandin dehidrogenaz olarak
Q5MYW3	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 protein	ATP bağlanması, RNA bağlanması, transferaz aktivitesi	---
Q68A21	Transcriptional Activator Protein Pur Beta	Baskılama, mRNA bağlanması, purin-zengin negatif regülâtör element bağlanması, tek telli DNA bağlanması, özel transkripsiyonel baskılama aktivitesi, transkripsiyon faktör bağlanması, translasyon baskılama aktivitesi, nükleik asit bağlanması	MYC geninin üzerinde yerleşen PUR elementinin purinden zengin tek zincir gibi, tek zincirli DNA'da tekrarlayan elementlere bağlanma kapasitesine sahiptir. Miyoblastlarda baskılayıcı olarak ve benzer şekilde fibroblastlardaki gibi, damar düz kası alfa-aktin gen transkripsiyonunun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Purinden zengin negatif düzenleyici elemente bağlanarak kardiyak miyositlerde alfa-MHC ekspresyonunun transkripsiyonel ve translasyonel düzenlenmesine katılmaktadır. Karaciğer galaktin-3 geni transkripsiyonunu bunun promotörüne bağlanarak değiştirmektedir. mRNA'ların bir altkümesinin dendritik taşınmasında rol oynayabilmektedir.

**Çizelge 4.31.** Talamusda türe bağlı değişim gösteren proteinlerin fonksiyonel özellikleri (devam)

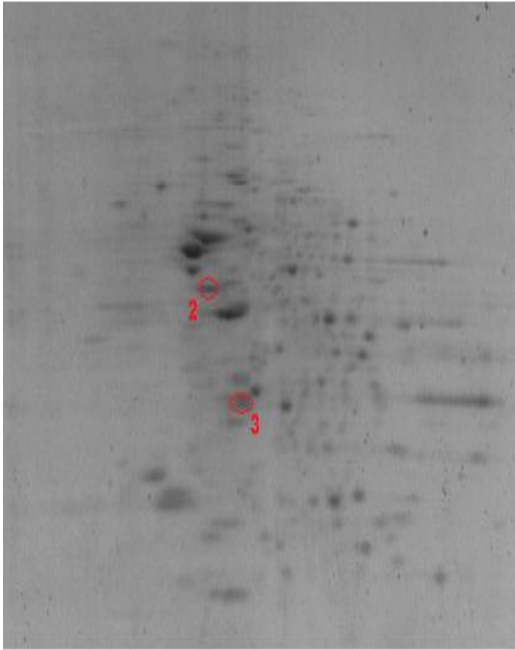
Q9ES39	Nuclear Distribution Protein Nude Homolog 1	Mikrotübül bağlanması	Mitotik için fonksiyonu ve oluşumu ve sentrozomun iki katına çıkması için gerekmektedir. Serebral korteksin gelişmesi için gereklidir. Beynin proliferatif ventriküler zonunun nöronal progenitörlerinin bölünmesi esnasında kortikal nöronal mitotik iğlerin yönlendirilmesini kontrol ederek nöronların üretimini düzenleyebilir. Korteksin tabakalarına dik düzlemde bölünen yönelim, iki çoğalan nöronal <i>progenitör</i> leri ortaya çıkarmakta iken paralel düzlemde bölünen yönelim bir post-mitotik nöronu ve çoğalan bir nöronal progenitörü oluşturmaktadır. Progenitör topluluğun içinde nöronal bir yönelime doğru erken bir kayma nöronların son sayısında genel bir azalma ile ve korteksin daha derin tabakalarında nöron sayısında artış ile sonuçlanabilir.
Q9QZP1	Survival of motor neuron protein-interacting protein1	<i>Cajal</i> cisimciği, sitoplazma, <i>spliceosom</i> kompleksi	SMN kompleks <i>spliceosomal</i> snRNP'de özellikle sitoplazmada önemli bir rol oynamaktadır ve nukleusta pre-mRNA katlanması için gerekmektedir.



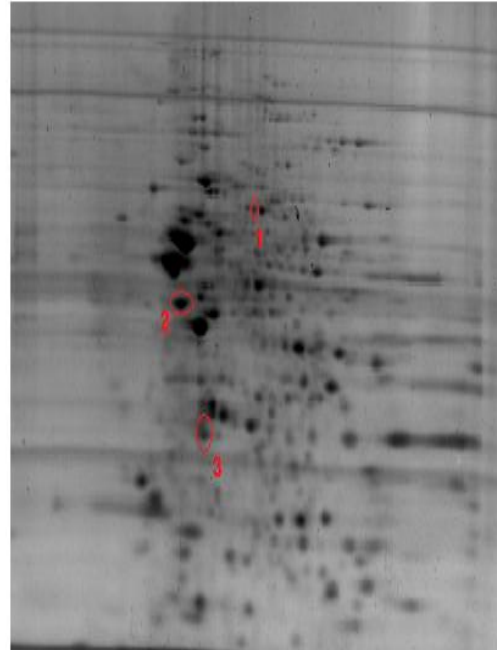
A1-4C\_1 AYLIK WAG TALAMUS



A3-2C\_1 AYLIK WIS TALAMUS



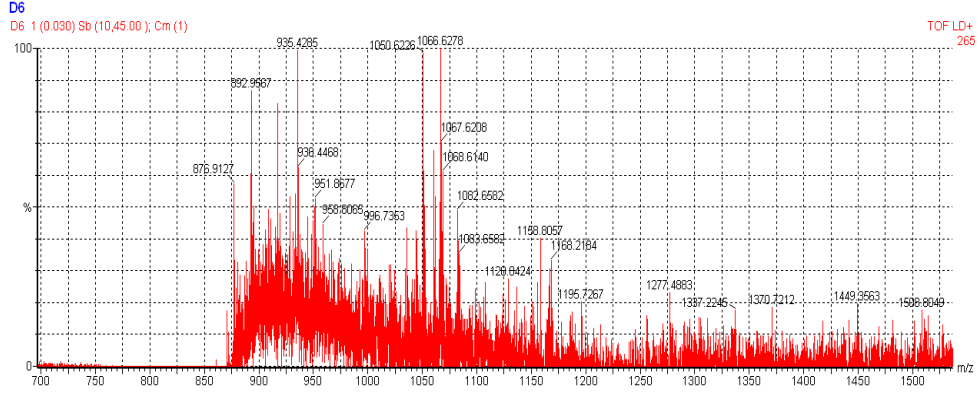
A4-7C\_6 AYLIK WAG TALAMUS



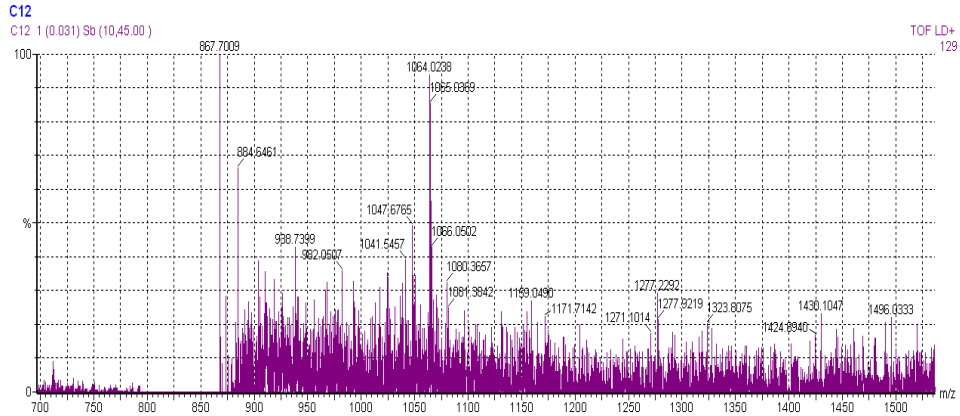
A2-2C\_6 AYLIK WIS TALAMUS

**Şekil 4.93.** Talamusta türe bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1; BOBNK8, Q5MYW3, 2; P144668, Q68A21, Q9ES39, Q9QZP1, 3; P23457).

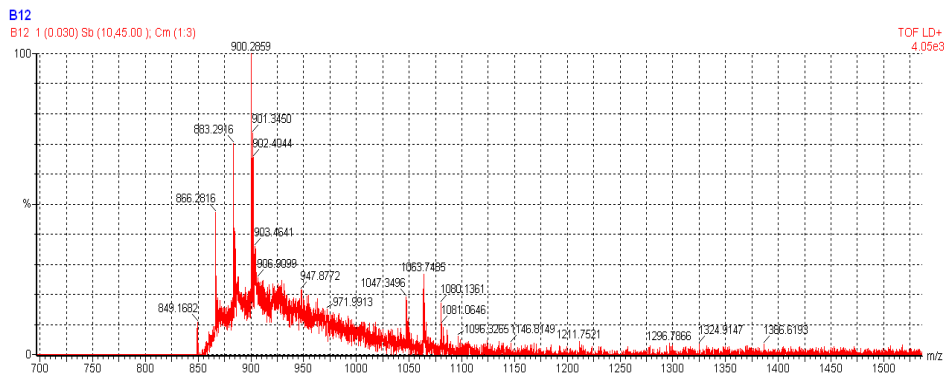




Şekil 4.94. Protein FAM46B ve 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 proteinin spektra görüntüsü (spot numarası:1).



Şekil 4.95. Annexin A5, Transcriptional Activator Protein Pur Beta, Nuclear Distribution Protein Nude Homolog 1 ve Survival of motor neuron protein-interacting protein 1'in spektra görüntüsü (spot numarası:2).



Şekil 4.96. 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase'in spektra görüntüsü (spot numarası: 3).

### 4.3.2. Yaş a bağlı değişimin değerlendirildiği gruplar

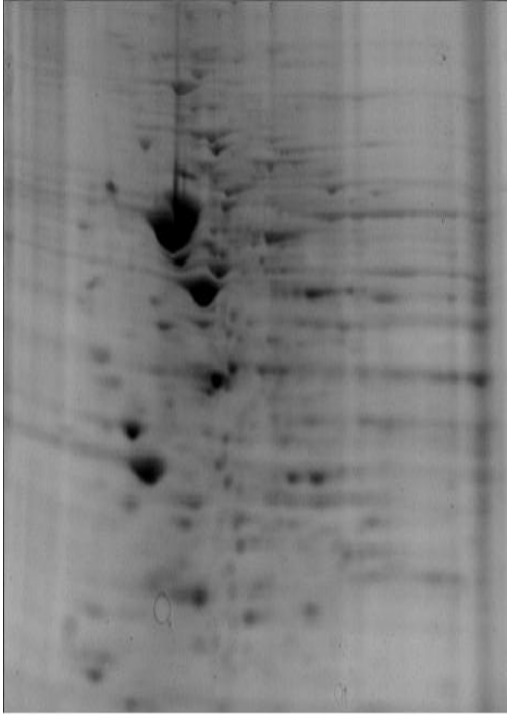
#### 4.3.2.1. Korteks dokusunun değerlendirilmesi

**Çizelge 4.32.** Korteksde yaş a bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi

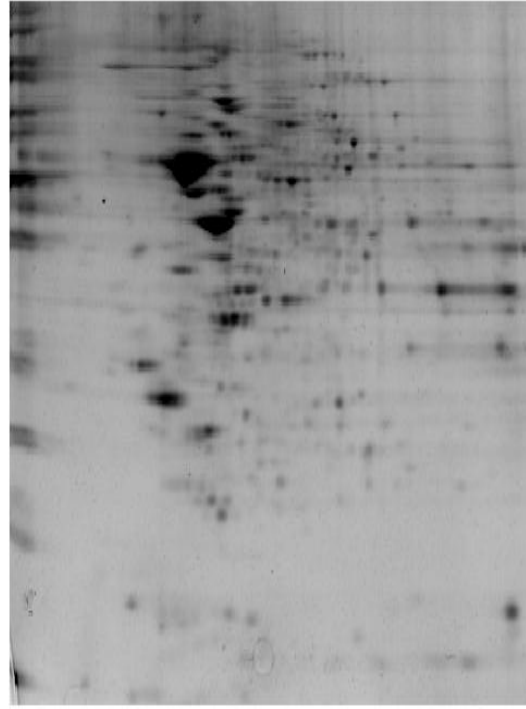
PROTEİN İSMİ	1 AYLIK		6 AYLIK	
	Wag/Rij	Wistar	Wag/Rij	Wistar
Endophilin-A1	yok	yok	var	var
Glycosyltransferase 6 Domain-Containing Protein 1	yok	yok	var	var
GTP-Binding Protein 8	yok	yok	var	var
Probable Trna(His) Quanylyltransferase	yok	yok	var	var
Rib43a-Like With Coiled Coils Protein 2	yok	yok	var	var
Cathepsin Q2	yok	yok	var	var

**Çizelge 4.33.** Korteksde yaşa bağlı değişim gösteren proteinlerin fonksiyonel özellikleri.

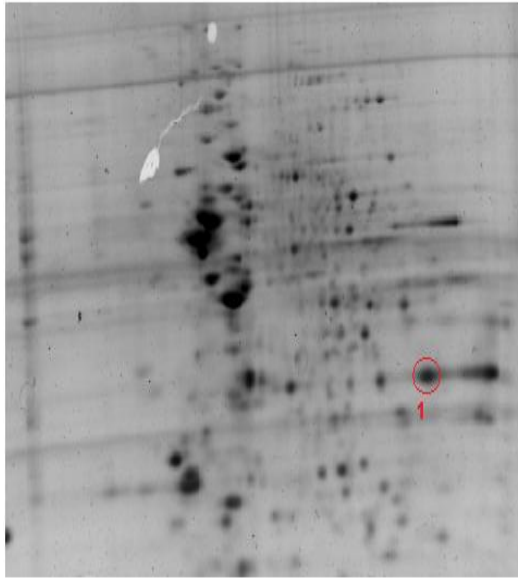
<b>PROTEİN NO</b>	<b>PROTEİN İSMİ</b>	<b>MOLEKÜLER FONKSİYONU</b>	<b>FONKSİYONU</b>
O35179	Endophilin-A1	Lipid bağlanması	Sinaptik vezikül endositozisinde rol oynamaktadır. Yüksek kıvrımlı membranlardaki diğer proteinleri kuvvetlendirebilir.
Q3L7M0	Glycosyltransferase 6 Domain-Containing Protein 1	Glikoziltransferaz, transferaz, hegzosil gruplarının transferi	--
Q5BK22	GTP-Binding Protein 8	GTP bağlanması	--
Q5M965	Probable Trna(His) Quanylylttransferase	Nükleotidil transferaz, transferaz, tRNA guaniltransferaz aktivitesi	Transkripsiyondan ve RNaz P ayrılmasından sonra bir GMP2yi tRNA(His)'in 5' sonuna ekler.
Q6AXN9	RIB43A-like with coiled coils protein 2	--	--
Q812B7	Cathepsin Q2	Sistein tip endopeptidaz aktivitesi,	--



A1-1A\_1 AYLIK WAG KORTEK



A3-2A\_1 AYLIK WIS KORTEK

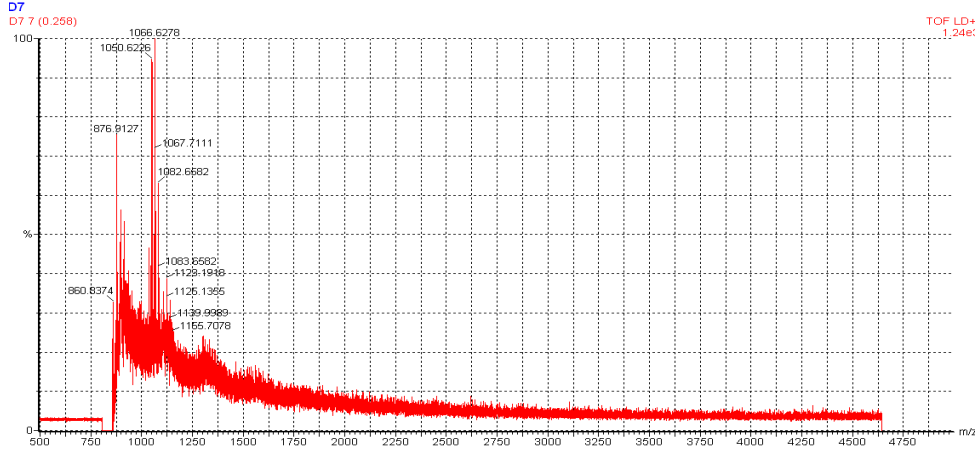


A2-2A\_6 AYLIK WAG KORTEK

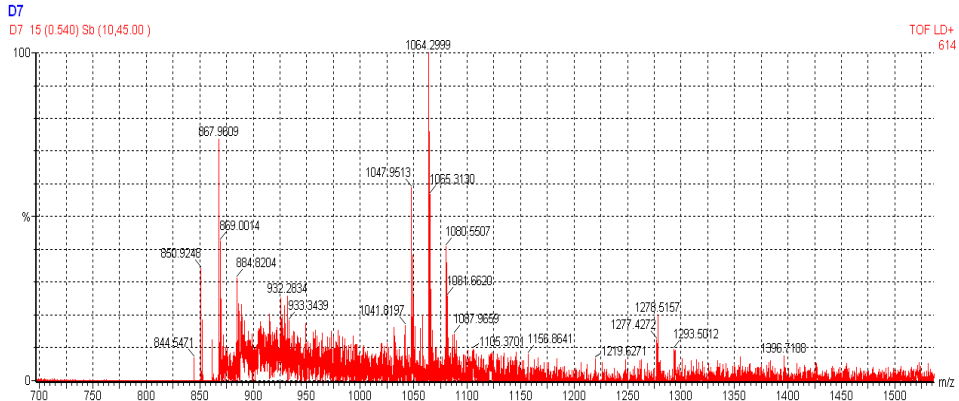


A4-6A\_6 AYLIK WIS KORTEK

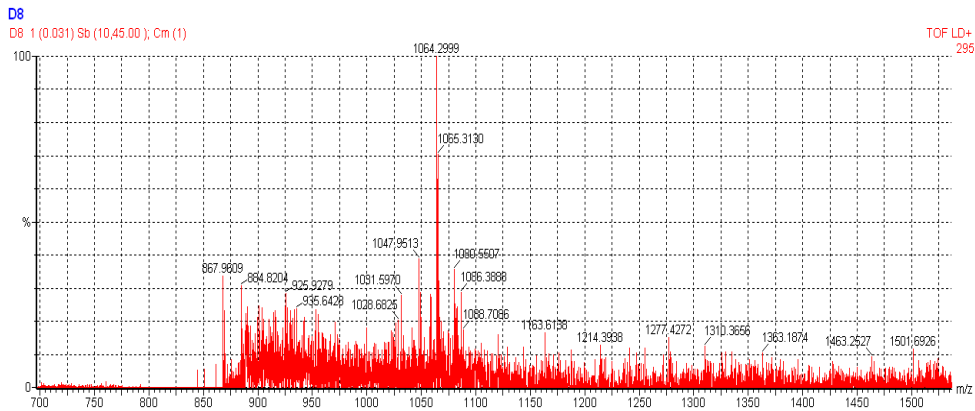
**Şekil 4.97.** Korteksde yaşa bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1; O35179, Q3L7M0, Q5BK22, Q5M965, Q6AXN9, Q812B7).



Şekil 4.98. Endophilin-A1'in spektra görüntüsü (spot numarası:1)



Şekil 4.99. Glycosyltransferase 6 Doman-Containing Protein 1'in spektra görüntüsü (spot numarası:1)



Şekil 4.100. GTP-Binding Protein 8, Probable Trna(His) Quanylyltransferase, Rib43a-Like With Coiled Coils Protein 2, Cathepsin Q2'nin spektra görüntüsü (spot numarası:1)

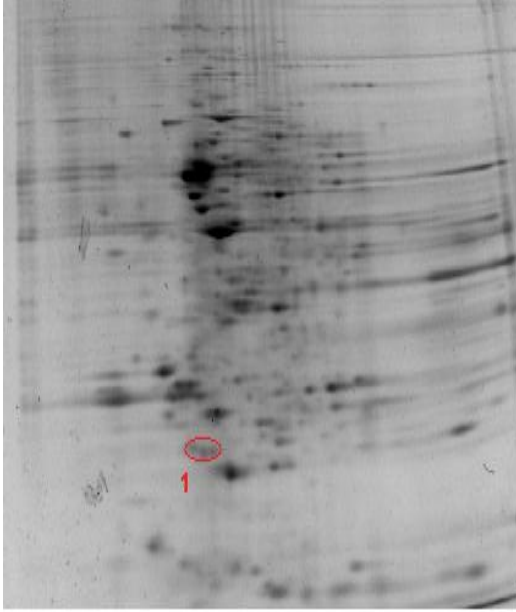
#### 4.3.2.2. Talamus dokusunun değerlendirilmesi

**Çizelge 4.34.** Talamusda yaşı bağlı değişim gösteren proteinlerin listesi

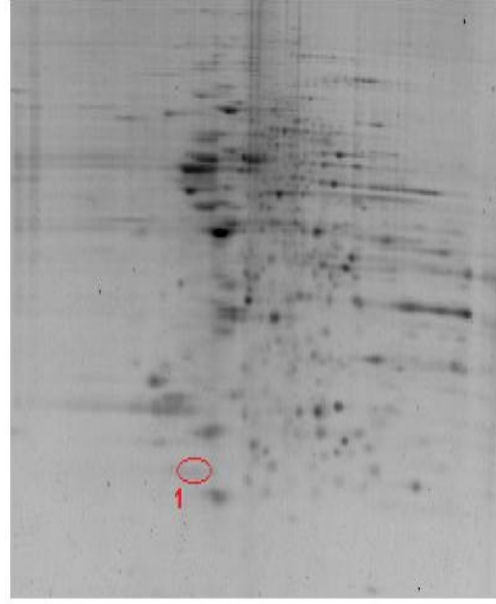
PROTEİN İSMİ	1 AYLIK		6 AYLIK	
	Wag/Rij	Wistar	Wag/Rij	Wistar
Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 5-Like Protein	var	var	yok	yok
Uncharacterized Protein C8orf42 Homolog	var	var	yok	yok
Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 N	var	var	yok	yok

**Çizelge 4.35.** Talamusda yaşa bağlı değişim gösteren proteinlerin fonksiyonel özellikleri

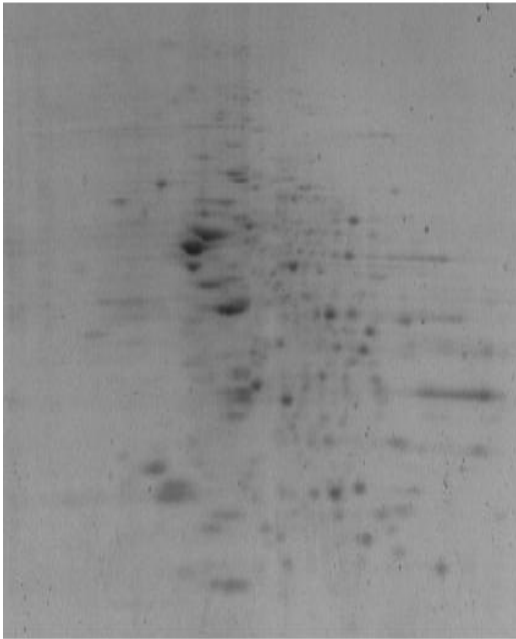
<b>PROTEİN NO</b>	<b>PROTEİN İSMİ</b>	<b>MOLEKÜLER FONKSİYONU</b>	<b>FONKSİYONU</b>
A1L108	Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 5-Like Protein	Aktin bağlanması	Aktin polimerizasyonunun regülasyonunu içeren Arp2/3 kompleksinin bileşeni olarak fonksiyon yapabilir. ve Aktive edici nukleasyon promoting faktör ile birlikte dallı aktin ağının oluşumuna aracılık edebilir.
Q498E2	Uncharacterized Protein C8orf42 Homolog	--	--
Q9EQX9	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 N	Ligaz, ATP bağlanması, Ubiquitin protein ligaz aktivitesi	UBE2V2/UBE2N heterodimeri Lys-63 aracılığıyla bağlanmış olan non-kanonikal poli ubiquitin zincirlerinin sentezini katalizler. Poli-ubiquitinasyonun bu tipi proteozom ile protein yıkımına neden olmamaktadır. Hedef genlerdeki transkripsiyonal aktiviteye aracılık eder. Hücre siklusu ve farklılaşması yoluyla ilerlemenin kontrolünde bir rol oynamaktadır. Hatasız DNA tamir yolunda bir rol oynar ve DNA hasarından sonra hayatta kalan hücrelere katkıda bulunur. DNA tamirini gerektiren genotoksik stres üzerine PCNA'nın poli-ubiquitinasyonu ile ilişkili Lys-63'de, SHPRH veya HLTF, E3 ligazları ile birlikte hareket etmektedir.



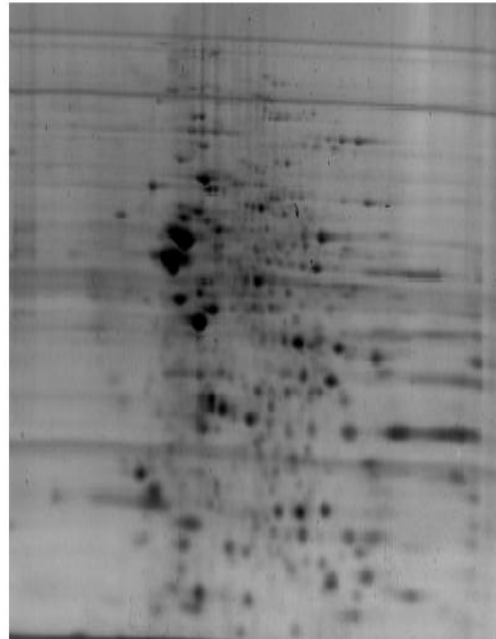
A1-4C\_1 AYLIK WAG TALAMUS



A3-2C\_1 AYLIK WIS TALAMUS



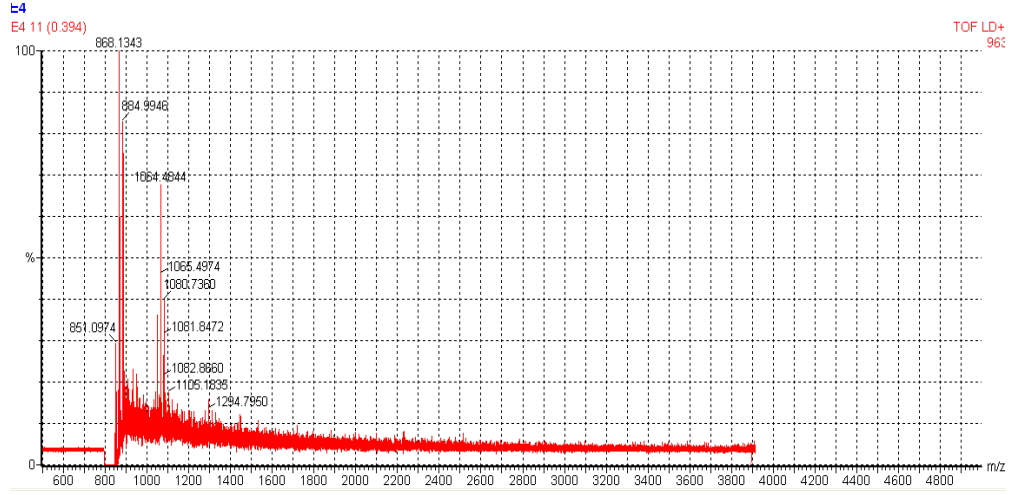
A4-7C\_6 AYLIK WAG TALAMUS



A2-2C\_6 AYLIK WIS TALAMUS

**Şekil 4.101.** Talamusda yaşa bağlı değişim gösteren spotların 2D jel elektroforezi görüntüsü (1; A1L108, Q498E2, Q9EQX9).





**Şekil 4.102.** Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 5-Like Protein, Uncharacterized Protein C8orf42 Homolog, Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 N'nin spektra görüntüsü (spot numarası:1).

## 5. TARTIŞMA

Absans epilepsinin temel özelliklerinden biri olan diken dalga oluşumunun hücrel mekanizmalarına yönelik çalışmalar, bu paroksizmal aktivitenin korteks ve talamus arasındaki karşılıklı eksitator ve inhibitör bağlantılardan kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır. Çalışmalar, moleküler düzeyde bazı iyon kanallarının ve nörotransmitter reseptörlerinin işe karıştığını göstermektedir. Genetik ve hücrel düzeydeki nörokimyasal çalışmaların sonuçları oldukça paraleldir. Epilepsinin farmakolojisi, genetiği ve farklı hayvan modellerinde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde çıkarılabilecek ortak sonuç; absans epilepsinin ortaya çıkmasında, başta voltaj ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  and HCN) ve ligand kapılı (nikotinik asetilkolin ve  $\text{GABA}_A$  reseptörleri) iyon kanallarına ait patolojiler olmak üzere birden fazla mekanizmanın rol oynayabileceğidir. Absans epilepsi oluşumunda, hücre membranında yer alan süreçlere ait en az 30 yıllık bilgi birikimine karşın hücre içi mekanizmalara ilişkin veriler çok yetersizdir. Epilepsilerin kontrolünde daha seçici, daha az yan etkiye sahip ve daha etkin tedavi arayışının devam etmesi, moleküler teknolojilerdeki hızlı ilerleme ile birleşerek hücre içi mekanizmaların araştırılması çabasına hız kazandırmıştır.

Bu çalışmada, absans epilepsinin moleküler düzeyde patolojik mekanizmalarını aydınlatma amacıyla, absans epilepsinin genetik hayvan modellerinden biri olan, WAG/Rij sıçanların frontoparietal korteks, talamus ve hipokampusu içeren beyin bölgelerine proteomik teknolojisini uyguladık. MALDI ile SDS-PAGE tekniğinin birlikte kullanılması hastalığın altında yatan moleküler olaylarla ilişkili olabilecek bazı proteinlere ulaşmamızı sağladı. Absans nöbetlerin henüz ortaya çıkmadığı 1 aylık ve nöbetlerin bireylerin tümünde gözleendiği 6 aylık WAG/Rij sıçanlar, tür ve yaş faktörü dikkate alınarak, Wistar kontrolleriyle karşılaştırıldı. Buna göre frontoparietal korteks örneklerinden seçilen spotlarda, türe bağlı farklılık gösteren, olası 8 (5 spot bölgesinden) ve talamus örneklerinden seçilen spotlarda ise 6 (4 spot bölgesinden) protein tanımlandı. Hipokampusta ise seçilen spotlarda türe bağlı farklılık gözlenmedi. Absans nöbetlerin, talamo-kortikal döngünün anormal nöronal boşalımından kaynaklandığı (van Luijtelaar and Sitnikova, 2006) ve hipokampusun yer aldığı medial temporal yapıların paroksizmal elektriksel aktivite açısından sessiz bölgeler olduğu (Lakaye et al. 2000) düşünüldüğünde bu sonuçlar şaşırtıcı değildir. WAG/Rij sıçanlarda frontal korteks, talamusun spesifik ve

nonspesifik çekirdekleri, retiküler talamik çekirdekler ve hipokampusdan eş zamanlı kayıtların yapıldığı elektrofizyolojik çalışmalar, kortikal EEG'deki anormal deşarjların jeneralize olduğunu; hipokampusun ise bu DDD aktivitesine katılmadığını göstermektedir (Marescaux et al. 1992). Diğer taraftan absans epilepsinin genetik sıçan modellerinde hipokampusda transkripsiyon düzeyinde H-ferritin, peptid düzeyinde endojen opioid peptidler ve fonksiyonel açıdan GABAerjik sistemde ve glukoz kullanımında farklılıkların olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Nehlig et al. 1998, Lakaye et al. 2000). Bizim çalışmamızda hipokampusdan elde edilen jel örneklerinde, grup içi dağılımın diğer bölgelere göre daha değişken olduğu gözlenmektedir. Bu beyin bölgesinde protein dağılımını göstermek adına, sinaptik ya da organel proteomiksin kullanıldığı çalışmaların daha etkin olabileceği düşünülebilir.

Elde ettiğimiz proteinlerin hücresel yerleşimi incelendiğinde, sitoplazmik proteinler olduğu farkedilmektedir. Absans epilepsi ile ilişkili olduğu gösterilmiş proteinler, başlıca hücre zarında yerleşim göstermektedir (Schridde et al. 2006, Li et al. 2006, Sarkisova et al. 2008, Weiergräber et al. 2009, Guo et al. 2009). Proteomik yöntemi, uygulanan prosedüre göre hücrenin farklı bölgelerini hedefleyebilir. Örneğin çoğu nörotransmitter reseptörü, iyon kanalı ve sinaptik vesikülün yer aldığı sinaptik membrana (snaptozom) ya da hücrenin enerji durumuyla ilişkili proteinlerin yer aldığı mitokondri gibi organellere yönelik farklı proteomik prosedürleri mevcuttur (Witzmann FA, 2005, Junker H, 2005). Fakat beyin dokusunda bu çalışmalar sınırlıdır. Diğer taraftan, beyin dokusunda gerçekleştirilen proteomik çalışmalarında elde edilen proteinlerin % 90- 95' inin glia hücrelerine ait olduğu ve membrana bağlı hidrofobik karakter gösteren proteinlerin çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle daha çok sitoplazmik proteinlerin elde edildiği belirtilmektedir (Witzmann FA, 2005).

Türe bağlı olarak değiştiiği gösterilen proteinler, farklı fonksiyonel protein ailelerine ait olmaları nedeniyle, ayrı ayrı değerlendirilecektir.

## FRONTOPARYETAL KORTEKSTE TÜRE BAĞLI FARKLILIK GÖSTEREN PROTEİNLER

### Clathrin Light Chain (Lca) (CLTA) Protein

Clathrin, hücrede endositoz, hücre içi trafik ve mitotik süreçlerde etkin role sahip olan bir proteindir. Clathrinin peptid haritalanması, peptid dizisinin dokular ve türler arasında iyi korunduğunu göstermektedir; her bir ayağında bir ağır ve bir de hafif zincirin bulunduğu, üçlü bir iskelete sahiptir. Üç ağır zincir merkezde birleşerek clathrinin yapısal iskeletini oluşturur. Hafif zincirler, clathrin ağır zincirine bağlanır ve onun trimerizasyonunu düzenleyerek clathrin kafesinin oluşmasını sağlar. Yüksek ökaryotlarda, LCa ve LCB olmak üzere, oldukça benzer bir fonksiyona sahip iki adet hafif zincir izomeri tespit edilmiştir. Hafif zincir dizisi türler arasında % 95-98 oranında benzerlik göstermektedir. Clathrinle kaplı veziküllerin birleşme ve ayrışmaları yaklaşık 30 adaptör ve aksesuar protein tarafından düzenlenmektedir. Endositoz sırasında bu adaptör proteinler, clathrin kafesi ile internal taşıyıcı vezikül arasında aracı molekül olarak etki gösterirler. Adaptör proteinlerin büyük bir kısmı clathrinin ağır zinciri ile etkileşim gösterirken, sadece dört protein hafif zincirle etkileşim gösterir. Bu 4 protein kalmodulin, ısı şok protein 70, Hip 1 (Huntingtin interacting protein 1) ve Hip 1R (Hip 1 ile ilişkili reseptör)' dir (Wilbur et al. 2008).

Clathrin aracılı endositozun hücre için önemi, onun çok sayıda proteinin hücre içine alınmasındaki etkin rolünden kaynaklanmaktadır. Merkezi sinir sisteminde clathrin aracılı endositozun, etkin sinaptik iletim için gerekli olduğu ve öğrenme/ hafıza ile ilişkili pre ve post sinaptik uyum mekanizmalarında esansiyel bir role sahip olduğu belirtilmektedir. Clathrin, besin, iyon pompaları, sinyal reseptörleri gibi temel hücresel süreçlere katılan proteinlerin hücre içine alınmasına aracılık etmektedir.

Clathrin aracılı endositoz, dopaminin, GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptörlerinin ve glutamatin endositozuna katılmaktadır. Absans epilepsinin deneysel modellerinde adı geçen nörotransmitter sistemlere ait farklılıklar bölgesel düzeyde gösterilmiştir. Örneğin, genetik absans epilepsili WAG/Rij sıçanların somatosensoriyel korteksinde GABA<sub>B</sub> reseptör ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Inaba et al. 2009). Diğer taraftan, bir başka genetik absans modeli olan, GAERS ırkı sıçanların kortikal bölgelerinde

glutamaterjik sistem incelenmiş ve glutamat miktarında anlamlı bir değişiklik olmaksızın astrositler tarafından glutamat uptake'nin anlamlı olarak azaldığı, fakat nöronal veziküler glutamat taşıyıcılarının (VGLUT1 ve VGLUT2) ekspresyonlarında artış olduğu bulunmuştur (Touret M. et al., 2007). Bu sonuçlar, epileptik hayvanların korteksinde glutamaterjik iletinin artması şeklinde yorumlanmıştır. Yukarıdaki veriler farklı hayvan modellerinden elde edilmiş olsa da clathrin aracılı endositoz, GABA<sub>B</sub> reseptörleri ve glutamaterjik sistem arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmanın sonuçlarıyla büyük oranda tutarlılık göstermektedir. Bu çalışmada, Vargas ve ark. glutamatın GABA<sub>B</sub> yüzey reseptör miktarını azalttığını ve bu etkisini clathrin ve dynamin-1 aracılı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermişlerdir (Vargas et al. 2008). Clathrin aracılı veziküler transport trafiğindeki artış, epileptik sıçanların korteksinde veziküler glutamat transportundaki artma ve GABA<sub>B</sub> reseptör ekspresyonundaki azalma ile ilişkili olabilir.

### **Neuron-Specific Vesicular Protein, Calcyon**

Calcyon, özellikle beyinde eksprese edilen, pre ve postsinaptik yapıların veziküler bölümlerinde yerleşim gösteren transmembran bir proteindir (Xiao et al. 2006). Nöron spesifik bir protein olarak tanımlanan bu molekül, medial prefrontal korteksde ve hipokampusda bol miktarda eksprese edilmektedir (Kruusmägi et al. 2007).

Calcyon, clathrin hafif zincir proteininin yeni bir partneri olarak bildirilmiştir (Lee et al. 2002, Dickman et al. 2005) ve artan sayıda çalışma calcyonun clathrin aracılı endositozdaki rolünü desteklemektedir. İmmunopresipitasyon çalışmaları, calcyon, hafif zincir ve clathrin adaptor AP2 molekülünün ortak yeleşime sahip olduklarını göstermektedir. Calcyonun, clathrin kafesinin oluşumunu anlamlı bir şekilde arttırdığı ve clathrin hafif zinciri ile direkt etkileşerek clathrin aracılı endositozu uyardığı bildirilmiştir. Calcyon knockout fareler clathrin aracılı transferrin uptake'inde anlamlı bir yetersizlik göstermektedir (Xiao et al. 2006). Elektron mikroskopi incelemeleri, calcyonun dendritik dikenler ve akson sonlanmalarındaki veziküllerde lokalize olduğunu göstermektedir. Bu iki bölge etkin sinaptik ileti için clathrin aracılı endositozun kritik önem taşıdığı yerlerdir (Lezcano et al. 2000, Xiao et al. 2006).

Calcyon hala göreceli olarak çok iyi karakterize edilmemiş bir proteindir. İlk zamanlarda calcyonun dopamin 1 (D1) reseptörlerine direkt bağlandığı bildirilmiştir. Fakat

sonraki çalışmalarda D1 reseptörlerinin transportunun calcyon içeren veziküller aracılığıyla gerçekleştiğini; calcyon ile D1 reseptörleri arasındaki ilişkinin, clathrin aracılı olduğu gösterilmiştir (Zelenin et al. 2002, Kruusmägi et al. 2007).

Calcyon ile bazı nöropsikiyatrik bozukluklar arasında bağlantı olduğu bulunmuştur. Şizofreni hastalarından postmortem elde edilen talamus ve prefrontal korteks örneklerinde calcyonun upregüle olduğu gösterilmiştir (Bennett 1998, Lidow et al. 1998, Copolov and Crook, 2000, Koh et al. 2003, Trantham-Davidson et al. 2008). Calcyon geninde polimorfizm dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ile de ilişkili bulunmuştur. Davidson et al. ön beyinlerinde calcyon ekspresyonunun arttığı transgenik farelerin davranışsal özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, bu proteinin aşırı ekspresyonunun hiperaktiviteye, araştırmacı aktivitede artışa ve anksiyete düzeyinde bir azalmaya neden olduğunu gösterdiler (Trantham-Davidson et al. 2008). Son zamanda yapılan geniş genom çalışmaları calcyon geni ile DEHB arasında bir bağlantının olduğunu açığa çıkarmıştır. (Fisher 2002; Luo et al. 2004).

Calcyon ile epilepsi arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, ilginç olarak, absans epilepsili çocuklarda yapılan komorbidite çalışmaları bu çocuklarda en yaygın görülen nöropsikiyatrik bozukluğun DEHB olduğunu göstermektedir (Kaufmann et al. 2009, Parisi et al. 2009, Cascella et al. 2008). Ayrıca, epilepsi ile şizofreni ve şizofreni benzeri psikoz arasında güçlü bir bağlantı olduğu ileri sürülmüş, iki durumun ortak genetik veya çevresel nedenleri paylaşabileceği düşüncesi yakın zamanda tartışılmaya başlanılmıştır (Barnes and Paolicchi, 2008). Üstelik jeneralize nöbetlerin olduğu epilepsili hastalarda psikotik semptomların daha sık gözlemlendiği bildirilmiştir (Bruton et al. 1994).

Absans epilepsi ile ilişkili olduğu gösterilen iki nöropsikiyatrik tablo dopaminerjik sistemde bozukluk ile karakterizedir. Diğer taraftan absans epilepsinin genetik modellerinde dopaminerjik sistemin özellikleri çalışılmıştır. Dopaminerjik sistemi etkileyen ajanların absans nöbetleri etkilediği bilinmektedir; sistemik ya da bölgesel uygulanan D1 ve D2 reseptör agonistleri DDD aktivitesini baskımlarken, dopamin antagonistleri DDD aktivitesini arttırmaktadır (Marescaux et al. 1992). Deransart et al. yetişkin GAERS sıçanların beyin kesitlerinde *nucleus accumbens*' in çekirdek bölgesinde dopamin 3 reseptörünün mRNA ifadesinde artış saptamışlar ve bu değişikliğin absans nöbetler açısından altta yatan bir faktör olmaktan çok adaptasyon yanıtı olabileceğini ileri

sürmüşlerdir (Deransart et al. 2001). Bir şizofreni modeli olarak sunulan APO-SUS sıçanların (Ellenbroek et al. 1995) EEG kayıtlarında WAG/Rij sıçanlarda olduğu gibi DDD aktivitesi kaydedilmektedir ve açık alan ve apomorfinle oluşturulan lokomotor aktivite yanıtları açısından WAG/Rij sıçanlarla benzerlik göstermektedir (de Bruin et al. 2000). APO-SUS sıçanlarda *mesolimbik dopaminerjik* sistemle *mesostriyal dopaminerjik* sistem arasındaki dengenin mezolimbik sistem lehine kaydığı, bu hayvanlarda gözlenen belirtilerin iki sistem arasındaki dengesizlikten kaynaklanabileceği iddia edilmektedir (de Bruin et al. 2000). Birioukova et al. WAG/Rij sıçanların beyin bölgelerinde D1 ve D2 reseptör yoğunluğunu, epileptik olmayan ACI sıçanlarla karşılaştırmışlar ve WAG/Rij sıçanların nukleus accumbens'in core bölgesinde D1 yoğunluğunda azalma, dorsal striatumda (dorsal kaudat putamen) D1 ve D2 reseptörlerinde azalma, hipokampusun CA3 bölgesinde D2 reseptörlerinde azalmaya karşın, frontal ve pariyetal korteksde D2 reseptör yoğunluğunda artış saptamışlardır (Birioukova et al. 2005).

Calcyonun, dopaminerjik sistem dışında glutamaterjik sistemle de etkileşimi söz konusudur. Özellikle,  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isokzolepropionik asid (AMPA) reseptörlerinin içselleştirilmesinde rolü gösterilmiştir. Calcyon gen delesyonunun, farelerde AMPA reseptörlerinin agonisti ile uyarılmış endositozu inhibe ettiği açıklanmıştır. Hipokampus dilimlerindeki analizler, bazal iletimin bu delesyondan etkilenmediğini gösterirken, kültür ortamında hipokampal nöronların, *patchclamp* çalışmalarında ve calcyon geninin devre dışı bırakıldığı CA1 dilimlerinde, uzun süreli depresyonun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, biyokimyasal, immünolojik ve elektrofizyolojik analizlerin kullanıldığı çalışmalarla calcyonun, sinaptik AMPA reseptörlerinin aktivite bağımlı olarak hareketinin düzenlenmesinde özel bir role sahip olma olasılığının yüksek olduğu ifade edilmektedir (Davidson et al. 2009).

Absans epilepsinin mutant hayvan modellerinden biri olan stargazer farelerin, retiküler talamik çekirdekleri ve serebellumdaki AMPA reseptörlerinin ekspresyonu belirgin derecede azalmıştır (Menuz and Nicoll, 2008).

### **Phosphoserin Phosphatase**

Memeli hücrelerinde L-serin, 3 enzimatik basamaklı fosforilasyon yolağı aracılığı ile sentez edilmektedir. Birinci basamakta, glikolizisten elde edilen 3-fosfogliserat, 3-fosfogliserat dehidrogenaz ile fosfohidroksipiruvata metebolize edilir. İkinci basamakta

fosfohidroksipiruvat, B6 vitamini bağımlı bir enzim olan fosfoserin aminotransferaz aracılığı ile L-fosfoserin olarak da bilinen L-serin-O-fosfata dönüştürülür. Sonrasında L-serin-O-fosfat serin hidroksimetiltransferaz enzimi ile glisine metabolize olacak olan veya serin *racemase* ile D-serine izomerize olacak olan L-serini oluşturmak için fosfoserin fosfotaz ile defosforile edilir (Antflick et al. 2009).

L-serinin nöronlar için gerekli bir büyüme faktörü, D-serinin ise glutamat kapılı iyon kanallarının NMDA alt tipinin ko-agonisti olduğu gösterilmiştir (Savoca et al. 1995, Furuya et al. 2000, Shleper et al. 2005, Antflick et al. 2009). D-serinin beyin gelişiminde özel bir fonksiyonunun olduğunu önerilmektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalar, D-serin düzeylerinin farklı gelişim dönemlerindeki kemirgen ve insan beyinde belirgin olarak yükseldiğini göstermektedir (Hashimoto et al. 1993, 1995, Schell et al. 1997; Fuchs et al. 2006). Serin biyosentezi iki enzim bozukluğunda zarar görmektedir: 3-fosfogliserat dehidrogenaz eksikliği ve 3-fosfoserin fosfotaz eksikliği (Jaeken, 2002). Serin eksikliği bozuklukları, nörometabolik hastalıkların yeni bir grubunu oluşturmakta ve L-serin biyosentezindeki defektlerin sonucunda meydana gelmektedir. L-serin biyosentezi çeşitli hücrel reaksiyonlarda; özellikle de beyinde, D-serin ve glisin nörotransmitterleri, fosfolipidler ve nükleotidler gibi önemli metabolitlerin öncülleri olarak rol oynamaktadır. Bu bozukluklardan etkilenen hastalar doğumsal mikroensefali, nöbetler, psikomotor gerilik, polinöropatiyi içeren majör nörolojik semptomları göstermektedir (de Koning and Klomp, 2004).

Glisin gibi D-serin de, nöromodülatör olarak NMDA reseptörüne bağlanarak fonksiyon göstermektedir. NMDA reseptör nörotransmisyonunun önemli olduğu hipokampal CA1 bölgesinde, glia hücrelerinin sitozolik matriksinde D-serinin yüksek yoğunlukta bulunduğu gösterilmiştir (Schell et al. 1997). Diğer taraftan D-serin NMDA reseptörleriyle olan ilişkisi nedeniyle, fizyolojik olduğu kadar bazı patolojik durumlara da aracılık etmektedir. D-serinin, hipokampal ve kortikal beyin dilimlerinde, NMDA reseptörünün neden olduğu nöronal ölüme baskın bir ko-agonist olarak rol oynadığı bulunmuştur (Shleper et al. 2005, Kartvelishvily et al. 2006). Endojen D-serin salınımindaki artış, nörolojik hastalıklarda eksitotoksitite ile hipokampus ve serebral kortekste, nöronal hasara katkıda bulunmaktadır (Liu et al. 2009). D-serin üretimindeki anormal artışın, NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonu ve eksitotoksik mekanizmalar aracılığıyla, korteks ve hipokampus bölgelerinde GABAerjik nöronların dejeneratif ölümünü indükleyebileceği ve kronik epilepside tekrarlayan nöbet gelişmesine ve epilepsinin erken patogeneze katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Liu et al. 2009).



Absans epilepsi ile D-serin ve glisin arasındaki ilişki GAERS sıçanlarda ve GHB ile uyarılan absans nöbetlerde çalışılmıştır.

GAERS'lerin hipokampal bölgelerinde, mikrodializ yöntemiyle ekstrasellüler amino asit düzeyleri ölçülmüş ve GABA<sub>B</sub> agonisti olan baklofen ile absans nöbetlerin şiddetlenmesini takiben glisin düzeylerinin geçici olarak arttığı gösterilmiştir (Richards et al. 2000).

GHB ile indüklenen jenerelaze absans nöbetlerde, glisin antagonisti olan HA-966'nın DDD deşarjlarını baskıladığı gösterilmiştir. Fakat bu baskılama NMDA ya da MK801' in etkisi dikkate alındığında daha zayıf bulunmuştur (Banerjee and [Snead, 1992](#)). Diğer yandan, glisinin modülatör bölgesinin agonisti olan D-serinin intraserebroventriküler ya da intratalamik uygulamalarının DDD üzerine etkili olmadığı görülmüştür (Koerner C et al, 1996).

### **Tetratricopeptide Repeat Protein 36**

Tetratrikopeptid repeat proteinin (TPR), çok çeşitli proteinlerden tanımlanmış olan dejenere olmuş 34 aminoasit dizisidir. TPR'ler farklı biyolojik fonksiyonları olan ve protein protein etkileşimine aracılık ettiği bilinen 25' in üzerinde proteinde bulunmaktadır (Das et al. 1998). TPR motifleri bakteriden insana kadar geniş bir aralıktaki çeşitli organizmalarda tanımlanmıştır. TPR içeren proteinler hücre siklusu regülasyonu, transkripsiyonel kontrol, mitokondriyal ve peroksizomal protein taşınımı, nörogenezis ve protein katlanması gibi çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkilidir (D'Andrea and Regan, 2003). TPR içeren proteinler; anafazı destekleyen kompleks altbirimleri cdc16, cdc23,cdc 27, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz altbirimi p67-phox, hsp90-bağlayıcı immunofilinler, transkripsiyon faktörleri, protein kinaz R protein kinaz inhibitörü, önemli peroksizomal ve mitokondriyal proteinleridir (Das et al. 1998).

TPR Down protein ekspresyonunun Down sendromlu fetusların beyinlerinde anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (D'Andrea and Regan, 2003).

Isı şok proteinleri (Hsp) yapıcı ve indüklenebilir ısı şok proteinlerinden oluşan protein ailesidir. Stres koşulları altında katlanmamış/denatüre olmuş proteinlerin konsantrasyonlarının artması ile uğraşan hücrenin yeteneğini arttırması ile hücrel iyileşmeye yardımcı olmak amacıyla HSP ekspresyonu geçici olarak artmaktadır (Yang et al. 2008). Hop [ Hsp 70/Hsp90-düzenleyen protein], sitozolik şaperonlar Hsp 90 ve Hsp70

ile multi şaperon kompleksinde bir kofaktör olarak tanımlanmıştır. Hop 3 TPR bölgesinden oluşmaktadır. Birincisi (TPR1) Hsp70'e bağlanırken, ikincisi (TPR2A) Hsp90'a bağlanmaktadır fakat üçüncüsünün (TPR2B) fonksiyonu bilinmemektedir (Gaiser et al. 2009).

İnme ve nöbetler tarafından hasarlanan beyin bölgeleri yüksek oranda Hsp72 ekspresyonu gösterirler. Kainik asitle indüklenmiş nöbetlerden dolayı hasar gören alanlarda indüklenen Hsp70, nöronal hasarın biyokimyasal bir belirteçidir ve apoptotik hücre ölümünden etkilenmektedir (Jeon et al. 2009). Artmış Hsp70 ekspresyonunun, apoptotik sürece neden olan p53 ile etkileşime girerek apoptotik süreci engelleyebildiği belirtilmektedir (Yang et al. 2008). Hsp70 immunopozitif hücrelerin kainik asit enjeksiyonunu takiben ipsilateral dentat girusda gözlendiği de bildirilmiştir (Miltiados et al. 2009). Pilocarpinle indüklenen status epileptikus takiben de Hsp27 ve Hsp70'in belirgin bir indüksiyonunun olduğu belirlenmişken, Hsp40, Hsp90, Hsp110 ve Hsp70'in esas olan ekspresyon düzeylerinde çok az değişiklik bulunmuştur (Lively and Brown, 2008).

Hipokampus ve entorinal korteksde kainik asitle indüklenen nöbetlerden 10 gün sonra bile Hsp27 düzeyinde belirgin bir şekilde artışın gözlendiği ve Hsp27'nin mRNA düzeyindeki belirgin bir artışın hipokampusda nöbetlerden 1-2 gün sonra da devam ettiği bildirilmektedir. Kainik asitle indüklenmiş nöbeti olan sıçanların entorinal korteks, priform korteks ve hipokampuslarında hem glial hücrelerde hem de nöronlarda yoğun Hsp70 boyanmasının olduğu immunohistokimyasal olarak da gözlenmiştir (Kato et al. 1999).

Kainik asitle muameleden sonra hipokampusda aşırı p53 immunoreaktivitesinin eşliğinde Hsp70 düzeyinde anlamlı bir artışın olduğu bildirilmiştir. Nöbetlerin neden olduğu beyin hasarı artmış Hsp70 ekspresyonu ile karakterize olmasına rağmen, epilepsideki nörodejenerasyondaki rolü hala belirsizdir. Hsp70 ekspresyonunun epileptogenezisin başlangıcında korunmasız olan nöronlarda indüklenmesinin çok mümkün olabileceği ve daha sonraki evrelerde bunun belirlenmesindeki başarısızlığın esasen nöronal hasarın artmış miktarından dolayı olabileceği öne sürülmüştür (Yang et al. 2008).

## **Transmembrane EMP24 Domain- Containing Protein**

P24A, p24 ailesinin önemli bir üyesidir (Luo et al. 2007). Mantarlarda, P24 ailesinin üyeleri olan EMP24 ve Erv25P, endoplazmik retikulumdan seçilen proteinlerin golgi aparatına etkili transportu için gerekli heteromerik kompleks formlarıdır. P24 proteinleri endoplazmik retikulum ve golgi kompartmanları arasında mekik hareketinden sorumludur. Çünkü endoplazmik retikulum ve golgi membranlarına ilave olarak, COPII ve COPI vezikülleri ikisinde de bulunur. P24 ailesinin birden fazla üyesi vardır. Örneğin mantarlarda, EMP24, ERV25 ve ERP1-ERP6 olmak üzere 8 tane p24 proteini tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesinin eksikliği, endoplazmik retikulumdan golgiye büyümeyi durdurmaya spesifik protein (GasIp)'nin transportunu geciktirir. EMP24 kompleksinin direkt olarak GasIp'in endoplazmik retikulumdan kaynaklanan veziküllere etkin bir şekilde paketlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla emp24 kompleksinin endoplazmik retikulumdan golgiye transportu için bir kargo reseptörü olarak fonksiyon gösterdiği ifade edilmiştir (Muñiz et al 2000).

Vezikül proteinlerinin p24 ailesinin kargo seçiminde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. p24 proteinlerinin endoplazmik retikulum veziküllerinin transportundaki rolüne ilişkin hipotezler ileri sürülmüştür. Bu hipotezlerden biri de, clathrin kaplı veziküller ile etkileşimi aracılığıyla vezikülün, endoplazmik retikulumdan ayrılmasıdır (Kaiser, 2000).

Cop I ve Cop II kaplı veziküller golgi ve endoplazmik retikulum arasındaki yollarda kullanılırken, clathrin kaplı veziküller endositik ve plazma membranı ile lizozom ya da transgolgi ağı arasındaki dolaşımda bulunur. Cop II bütün organizmalar için esansiyel kabul edilir ve biyosentetik yollarda kullanılır. Golgiden endoplazmik retikuluma transferde ise Cop I kullanılır. Cop I ve clathrin-AP kaplı veziküller transport arasında güçlü bir benzerlik vardır. Bu da, her iki transport sisteminin ortak bir orjine dayandığı görüşünü desteklemektedir fakat bu iki yolak arasında başta hücre içi yerleşimler olmak üzere net bir farklılık da bulunmaktadır (McMahon and Mills, 2004).

#### **Stathmin 4 (STMN4)**

Stathmin ailesi vertebralılarda yüksek düzeyde korunmuş fosfoproteinleri içermektedir ve en çok sinir sisteminde olmak üzere farklı organların gelişimi ve işlevsel düzenlenişine katılırlar. Bu protein ailesi, yapısal ve işlevsel benzerlik gösteren 4 üyeden oluşmaktadır: Stathmin1(STMN1), süperior servikal ganglion 10 (SCG10 veya STMN2),

SCG10 benzeri protein (SCLIP veya STMN3) ve stathmin benzeri protein (RB3 veya STMN4) (Charbaut et al. 2001, Beilharz et al. 1998, Curmi et al. 1999). Bütün stathminler tubuline bağlanma ve mikrotubulleri depolimerize etme yeteneğine sahiptir (Charbaut et al., 2001). Bununla birlikte, bu proteinler arasında oluşturdukları kompleksin stabilitesi ve tubulinle etkileşim kinetikleri açısından farklılıklar mevcuttur: RB3- güçlü stabilite ve yavaş kinetik özelliği, SCG10, SCLIP ve STMN1- orta düzeyde stabilite ve kinetik ve RB3'(RB3' ün splice varyantı)- zayıf stabilite hızlı kinetik özelliği gösterir. Mikrotübüllerin stathmin bağımlı- destabilizasyonu açıklamak üzere 2 model önerilmiştir: 1) Tubulin dimerlerini onların birleşmesini önleyerek ayırma ya da 2) mikrotübül yıkımını koruyan GTP cap' ları uzaklaştırarak mikrotübül uçlarında mikrotübül yıkımını uyarmak (Nakao C, 2004). Stathmin1 tüm organizmada yaygın olarak bulunurken, stathmin ile birlikte diğer üyeler, nöronal dokuda fazla eksprese olmaktadır. SCG10 ve RB3 proteinlerinin nöron dışı dokularda eksprese olduğu bildirilmiştir, ancak bu ekspresyon düzeyi nöronal ekspresyonla karşılaştırıldığında minimal düzeydedir (Burzynski et al. 2009). Hücre içi yerleşimleri incelendiğinde ise stathminin sitozolik, stathmin benzeri proteinlerin ise başlıca nöron hücrelerinin gövdelerinde bulunan golgi kompleks ve veziküllerin üzerinde, nöronal uzantılar boyunca, büyüme konularının merkezlerinde yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (Charbaut E, 2005).

Stathmin ailesi proteinlerin hücre içi hedefleri durumunda olan mikrotübüller, sinir sisteminin olgunlaşması ve gelişmesinde kritik öneme sahiptir. Farklılaşmış nöronlardaki mikrotübüller ise hücre iskeletin yapısal bileşeni olarak işlev görürler ve hücre içi transport mekanizmalarında rol oynarlar (Dent and Gertler, 2003). Nörit büyümesi nöronal hücre iskeletinin sürekli yeniden yapılanması ile gerçekleştirilmektedir. Nöritlerin ana hücre iskelet bileşeni olan mikrotübül dinamiklerinin, akson büyümesinde, yönlenmesinde ve dallanmasında anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir (Morii et al. 2006a).

Stathmin, farklı hücre tiplerinde farklılaşmayı ve çoğalmayı düzenleyen sayısız hücre dışı uyarana cevap olarak fosforile edilir. Kültürde gelişen kortikal nöronlarda, stathmin ve SCG10 ekspresyonunun, nörit büyüme aşamasında yüksek düzeylerde olduğu fakat sinaps oluşumundan sonra düzeylerinin güçlü bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (Di Paolo et al. 1997; Grenningloh et al. 2004). Stathmin olfaktor sistemde de olfaktor reseptör nöronlarının aksonlarında fazlaca eksprese olmaktadır (Grenningloh et al. 2004). RB3 ve SCLIP transkriptleri yetişkin sıçanda olduğu gibi yenidoğan dönemdeki sıçan beyinde de aynı miktarda bulunmuş ve sinir sisteminin olgun hücrelerinin fonksiyonlarına katılabileceği önerilmiştir (Ozon et al. 1997, 1998). RB3 mRNA' sı hipokampusta yüksek,

kortekste ise orta düzeyde tespit edilmiştir. Stathmin ve RB3 korpus kallosumdaki glial hücrelerde, talamik hücrelerin birçoğunda tespit edilmiştir.

Nöronda mikrotübül dinamiklerindeki değişim, nöronal farklılaşma ve sinaptik plastisitede ortaya çıkan yapısal değişikliklerin yaşamsal bir bileşenidir (Ratushnyak et al. 1997; Beilharz et al. 1998). Beilharz et al. RB3 mRNA' nın uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) ve maksimal elektrokonvulsiv nöbet sonrası sıçan beyinde dentat granül nöronlarında 30 dk ile 1 saat arasında uyarıldığını ve en az 3-8 saatlik dönem içinde yüksek düzeyde kaldığını göstermişlerdir. Bu veriler, RB3' ün, spesifik nöronal yolaklardaki aktivasyon sonucu gelişen nöronal plastisiteye katkısının olabileceğini göstermektedir. RB3' ün aktive olmuş ve farklılaşan nörolardaki fonksiyonu bilinmemektedir. Fakat stathmin ve SCG10'un güçlü aminoasit dizi benzerliği nedeniyle mikrotübül dinamiklerine katılarak etki etme olasılığının olduğu ileri sürülmektedir. RB3'e spesifik indüksiyon SCG10'da görülmemiştir. Bu 2 genin farklı rollerinin olduğunu, bu bulgu düşündürmektedir.

Nöronal aktiviteye bağlı RB3' ün uyarılmasının Ca<sup>2+</sup>/ kalmudulin bağımlı kinaz II (CaMKII) aracılığıyla gerçekleşmesi olasıdır. Mikrotübüller, dendritlerin ve nöronal aktiviteye bağlı dendritik biçimlenmenin temel yapısal bileşenleridir. Nöronal aktiviteye bağlı dendritik biçimlenme kısmen CaMKII' ye bağımlı biçimde mikrotübül stabilitesinin modülasyonu aracılığıyla gelişir. Mikrotübülü destabilize eden aktiviteler, stathminin fosforilasyonu ile baskılanır ve CaMKII stathmini fosforilize eder (Cassimeris, 2002; Grenningloh et al. 2004; Wittmann et al. 2004; Ohkawa et al. 2007). Dendritik çıkıntılarda depolarizasyonuna yanıt olarak CaMKII salınımı, başlıca NMDA reseptörleri ve L-tip voltaj duyarlı kalsiyum kanalları tarafından aktive edilir. CaMKII aktivasyonunun glutamat salınımı tarafından indüklenen LTP sırasında belirgin bir şekilde uyarılan dendritik çıkıntı ile sınırlı olduğu gösterilmiştir (Lee et al. 2009). CaMKII sinyalinin kanal ve yüksek derecede yerleşim özgünlüğü, CaMKII sinyalinin uyarıya spesifik spasyotemporal paternini ortaya çıkartır.

Tipik absans epilepsinin beyinde yapısal bir bozukluk olmamasından dolayı fonksiyonel bir hastalık olduğu inancı yaygındır. Fakat az sayıdaki morfolojik çalışmalarda çocukluk çağı absans epilepsisinde mikrodizgenesisin varlığı gösterilmiştir. Neokorteks ve frontal lobun subkortikal beyaz cevherinde distrofik nöronların sayısında artış bulunmuştur (Meencke, 1989). Absans epilepsinin hayvan modellerinde kortikal dokunun hücresel yapısı nerdeyse hiç dikkate alınmamıştır. Fakat 2002 yılında Meeren' in fokal teoriyi öne sürmesinden sonra, WAG/Rij sıçanların neokorteksinin anterior bölgelerinde hücre yapısı

değerlendirilmiştir. Karpova et al. golgi boyama tekniğininin kullanıldığı çalışmalarında frontal bölge, paryetal korteksi ön planda tutarak niteliksel ve niceliksel morfolometrik analiz ile hücre kompozisyonu ve dendritik ağacın geometrisini değerlendirdiler (Karpova et al. 2005). Yüzeysel kortikal tabakalardaki (1 ila 3 arasında) piramidal hücrelerin dağılımında bir bozukluk saptadılar. Yüzeysel piramidal hücrelerin apikal dendritlerinin sıklıkla iki dala ayrıldığını, miktarlarının azaldığını ve paralelliklerini kaybettiklerini buldular. Dendritlere ait bu yapısal bozuklukların epileptik zonda sınırlı olduğu görülmüştür. Türler arası (ACI ve WAG/Rij sıçanlarda) nöronların uzunluğunda niceliksel farklılıklar bulunmuştur. Nöron uzunluğuna ait farklılık türler arasında bulunurken, fokal ve kontrol bölgelerindeki farklılık ise başlıca dendritik dallanmalar açısından bulunmuştur.

### **Ubiquitin- conjugating enzyme E2 N**

Ubiquitin, oldukça korunmuş 76 aminoasidlik küçük bir polipeptiddir. Ubiquitin proteozom sistemi hücre içindeki proteinlerin yıkımında ana lizozom dışı sistemdir. Ubiquitinasyon sürecinde ubiquitin, peptid bağları aracılığıyla hedef proteinlerdeki lizin kalıntılarına kovalent olarak bağlanır. Ubiquitinasyon çok aşamalı bir süreçtir. 3 çeşit enzim ubiquitinasyon için gerekmektedir. E1 (ubiquitin aktive edici enzim), E2 (ubiquitin konjuge edici enzim), E3 (ubiquitin ligaz). İkinci basamakta 22 olarak bilinen E2 enzimlerinin birinde sistein kalıntıları için aktive edilmiş ubiquitin transferi olmaktadır (Wooten and Geetha, 2006). Ubiquitin konjuge edici enzimleri, ubiquitin bağımlı proteolizis sürecine aracılık eden yapısal bir protein ailesine aittir. Bu ailenin 17 üyesi tanımlanmıştır (Jiang et al. 2008).

Son yıllarda, farklı deneysel yaklaşımlar sinir sistemi ve nörohomeostazisin gelişiminde ubiquitin ile ilişkili süreçlerin rolü üzerine odaklanmaktadır. Ubiquitin/proteosom sisteminin sinaptogenezde, nörotransmitter reseptör fonksiyonunda ve nöromusküler kavşakların oluşumunda çok önemli bir role sahip olduğu ifade edilmektedir (Mayer, 2003). Ubiquitin aracılı proteolizis nöronal gelişimde ve postmitotik nöronların hayatta kalmasında rol oynamaktadır. Ubiquitin düzeylerinin nöronal gelişme esnasında serebellumun purkinje hücrelerinde, hipokampus ve korteksdeki erken postnatal nöronların dendritik bölmelerinde yüksek olduğu gösterilmiştir. Artmış protein ubiquitinasyonunun özellikle nöronal oluşum ve yenilenme süreci esnasında önemli gibi gözüktüğü belirtilmiştir. Ubiquitinize olmuş proteinlerin nörit gelişiminin pozitif düzenleyicisi olarak davranabilmelerinin de mümkün olabileceği ifade edilmiştir

(Klimaschewski, 2003). Ubiquitinasyonun *in vivo* beyin gelişimi ve *in vitro* sıçan feokromositoma hücrelerinin nöronal farklılaşması esnasında arttığı bildirilmiştir (Kavakebi et al. 2005).

Ubiquitin proteozom sisteminin sinaptogenez ve nörotransmitter reseptör fonksiyonlarında önemli rolü olduğu kesindir. İnhibitör GABA<sub>A</sub> reseptörleri,  $\alpha$ -1 glisin reseptörleri,  $\beta$ -2 adrenerjik reseptörler, opioid reseptörleri, eksitatör metabotropik glutamat reseptörlerinin ubiquitin proteozom sistemi tarafından düzenlendiği belirtilmektedir (Mayer, 2003).

Ubiquitin proteozom sisteminin hücre için genel anlamı biyolojik olarak kullanışsız proteinlerin örneğin mutant, hatalı katlanmış, hasarlı terminal olarak modifiye edilmiş ya da aşırı birikmiş proteinlerin parçalanmasıdır (Lehman, 2009).

Birçok organizma için E1 geni bir tanedir. Ökaryotik hücrelerde birden fazla miktarda E2 bulunmaktadır. Ubiquitin proteozom sisteminde E3'e ait mutasyonlar ile ilgili mutasyonlar şiddetli bir nörolojik bozukluk olan Angelman sendromunda tespit edilmiştir. Angelman sendromu dirençli epilepsi ve psikomotor gerilik ile karakterize nörojenetik bir bozukluktur (Yang and Yu, 2003). Bu sendromda farklı nöbet tiplerinin ortaya çıktığı görülmüştür. Atipik absanslar ve miyoklonik nöbetler belirgindir. Nonkonvulziv status epileptikus yaygındır (Pelc et al. 2008).

Epitelyal sodyum kanallarının ubiquitinasyon aracılığıyla düzenlendiği tespit edilmiştir. Diğer yaygın olarak çalışılan bir bozukluk Liddle sendromudur. Bu bozuklukta da E3 mutasyonu saptanmıştır. Hücre yüzeyinde epitelyal sodyum kanallarının ekspresyonu ve aktivasyonunda artış gözlenmiştir. Bu da epitelyal sodyum kanallarının ubiquitin sistemi tarafından regüle edildiğini göstermektedir (Yang and Yu, 2003).

Ubiquitin proteozom sistemi hücrenin akibetini belirleyen modülatör olarak tanımlanmaktadır. Ubiquitin hücrenin akibetinin belirlenmesinde rol oynayan birçok sinyal yolağının fonksiyonuna katılmaktadır. Hücre ölümündeki protein aracılarının ekspresyonunu kontrol eden P53, NF-Kb ve HIF-1 $\alpha$  gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyebilir. Ubiquitin proteozom sistemi fonksiyonundaki aşırılığın ise, Parkinson bozukluğu ve iskemi gibi bazı nöropatolojilerde rol oynadığı gösterilmiştir (Thompson et al. 2008).

### **Actin-Related Protein 2/3 Complex**

Actin-Related Protein 2/3 Complex (Arp 2/3 kompleks) aktinin polimerizasyonuna neden olur ve bir hücre membranında nükleasyon oluşturuvcu faktörlerin (NPF) lokalize olduğu yüzeylere yakın monomerler ekleyerek dallanmış aktin ağlarının birleşmesine katkıdır. NPF'lerle kaplı yüzeylere aktin monomerlerinin eklenmesinin ardından, membran deformasyonuna neden olur. Aktin üzerindeki mutasyonların clathrin mutasyonlarında gözlenenlerden daha güçlü internelizasyon defektlerine neden olduğu ifade edilmektedir (Payne et al. 1987, Kübler and Riezman, 1993).

Aktin polimerizasyonunun erken endozomlardaki rolü çok iyi olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, sonuçlar aktin ve miyozinin endositoz boyunca önemini memelilerde göstermektedir (Durrbach et al. 1996)

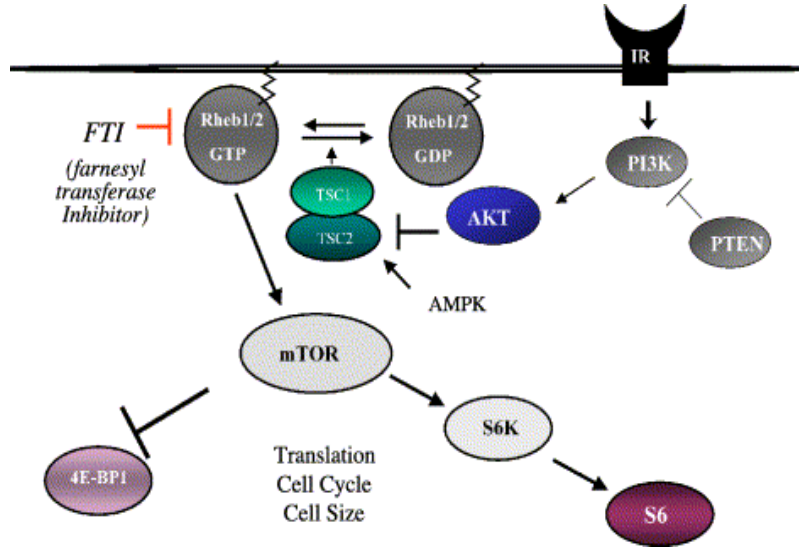
Eksitator sinapsların postsinaptik sonlanmaları aktinden zengin dendritik çıkıntılar içermektedir. Arp 2/3 kompleksinin, hücre içinde ortak yerleşim gösteren Wiskott-Aldrich sendrom proteini (N-WASP) aracılığıyla aktivasyonu dendritik çıkıntı ve sinapsların biçimlenmesini düzenler. N-WASP'ın endojen ekspresyonunun ortadan kaldırılmasının ya da proteinde Arp 2/3 kompleksine bağlanan ve onu aktive eden C-terminal VCA bölgesinde oluşturulmuş delesyonun dramatik olarak eksitator sinapsların ve çıkıntılarının azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Arp3 'ün ekspresyonundaki azalma spin ve sinaps biçimlenmesini bozar. Dolayısıyla N-WASP'ın ve ardından Arp 2/3 kompleksinin aktivasyonu diken ve sinapsların düzenlenmesinde önemli moleküler sinyaller gibi görünmektedir. Aktinin Arp2/3 aracılı dallanması, dendritik diken uçlarının genişlemesindeki ve olgunlaşmasındaki mekanizmalardan biri olabilir (Wegner et al. 2008).

Dirençli temporal lop epilepsili hastaların temporal loplarında N-WASP ekspresyonunda ve onun downstream efektörü olan Arp2/3'ün ekspresyonunda belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Adı geçen çalışmanın yazarları, N-WASP ve Arp2/3 yolunun, Alzheimer, Parkinson ve multipl skleroz gibi diğer sinaptik yapılanma bozukluklarının olduğu hastalıklarda da rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (Xiao et al. 2008).

## **GTP-Binding Protein Rheb**



Rheb (beyinde fazla bulunan Ras homoloğu), mantardan insana kadar türler arasında iyi korunmuş bir GTPaz'dır. Rheb ailesi, G proteinlerin Ras üst ailesi içinde yeni bulunan tek ailedir. Ras proteinleri, hücre içinde bazı biyokimyasal reaksiyonları düzenleyerek; vesikül transportu, hücre polaritesi, sitoskelet bütünlüğü, aktin monofilamentlerinin iskeleti ve in vitroda NADPH oksidaz aktivitesinin yer aldığı hücre içi süreçlere katılırlar. Son zamanlarda Ras proteinlerinin, birçok dokuda büyüme faktörüyle uyarılan, insulin/TOR/S6K adı verilen bir sinyal yolağı içinde yer aldığı gösterilmiştir ve Rheb' in, beyinde bu sinyal yolağındaki kritik önemi dikkatleri çekmektedir (Li et al. 2004, Manning and Cantley, 2003, Kwiatkowski, 2003). Rheb' in İnsülin/TOR/S6K yolağındaki rolü memeli hücrelerinde doku kültüründe ve *drosophila*'da araştırılmıştır (Saucedo et al. 2003, Stocker et al. 2003, Tabancay AP et al. 2003, Tee et al. 2003, Garami et al. 2003). Rheb' in insulin/TOR yolağındaki katılımının genel şeması aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Şekil 4.103): Rheb mTOR'un upstream, Akt'ın ise downstream molekülü olarak görev görür. IGF ya da insülin tarafından insülin sinyalinin başlatılması, Akt'ın aktivasyonuna yol açan PI3K'yı artırır. Akt daha sonra TSC2'yi fosforile eder ve Rheb'in, TSC1-2 tarafından sağlanan, negatif regülasyonunu inhibe eder (TSC1/2 kompleksi Rheb için GAP olarak işlev görür). GTP'ye bağlı Rheb'in birikmesine yol açar ve GTP bağlı Rheb mTOR'un aktivasyonuna yol açar (Aspuria and Tamanoi, 2004).



**Şekil 4.103.** Memeli hücrelerindeki Rheb insülin/mTOR/S6K sinyal yolu.

Bu sinyal yolağının serum aktivasyonu boyunca hücre yüzeyinde insülin ve IGF-1 kendi reseptörleri tarafından alınır. Bu PI3K daha sonra Akt'ı fosforile edecek olan PI3K'nın aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive olan Akt, TSC2'yi fosforile eder ve TSC1 ve TSC2'nin mTOR'u negatif olarak düzenleyecek TSC1 ve TSC2'nin mTOR üzerindeki negatif etkisini inhibe eder. TSC1 ve TSC2'nin inhibisyonu Rheb in aktivasyonuna yol açar. Aktive olan Rheb mTOR un aktivasyonuna yol açar. En az 2 downstream olayda ki bunlar P70S6K'nın aktivasyonu ve S6'nın fosforilizasyonu, diğer yolda 4E-BP1'in fosforilizasyonudur. Aminoasitler gibi besinler bu sinyal yolağını aktive ederler (Aspuria and Tamanoi, 2004).

mTOR, memeliler arasında yapısal olarak iyi korunmuş serin treonin protein kinazdır. mTOR, çoğu hücre büyümesi, hayatta kalması ve homeostazis ile ilişkili bazı hücre fonksiyonlarına katılır (Sarbassov et al. 2005, Sandsmark et al. 2007, Aspuria and Tamanoi, 2004, Sato et al. 2008). mTOR'un aktivitesini düzenleyen upstream sinyallerin bir kısmı besin ve enerji durumu, büyüme faktörleri ve stresi içerir.

mTOR yolağının epileptogenezdeki önemi epilepsinin en yaygın genetik nedenlerinden biri olan tüberoskleroz kompleksi (TSK) ile en iyi yansıtılmaktadır. TSK'nın fare modelinde mTOR inhibitörleri epilepsi gelişimini ve epileptogenezle ilişkili altta yatan beyin anormalliklerini engellerler. Artan sayıda bulgu mTOR'un diğer nedenlere bağlı gelişen epileptogenezde de katıldığını desteklemektedir. Bunlar arasında fokal kortikal displazi, kazanılmış beyin hasarları (status epileptikus ya da travmatik beyin hasarını takip eden hayvan modellerinde olduğu gibi), kafa travmaları bulunmaktadır. Böylece mTOR inhibisyonu farklı epilepsi tiplerinin (genetik ve kazanılmış epilepsiler) anti-epileptojenik tedavisinde potansiyel ajan olarak görülmektedir. TSK, epilepside mTOR

katılımının araştırılması için ve mTOR inhibitörlerinin antiepileptojenik potansiyelini test etmek için model bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. (Wong M, 2009).

TSK, otozomal dominant geçişli bir hastalık olup TSK1 ve TSK2 genlerinden birinde mutasyon ve ilgili proteinlerin (sırasıyla hamartin ve tuberin) yapılamaması söz konusudur. Bu hastalarda, bazı organlar (beyin, deri, göz, böbrek, kalp ve akciğerler) selim karakterli tümör ya da hamartoma oluşumu ile karakterizedir. TSK ile ilişkili lezyonların çoğu minimal düzeyde semptomatik olmasına rağmen, TSK'da nörolojik tutulum yaygındır ve genellikle epilepsi, kognitif bozukluk ve otizm şeklinde kendini göstermektedir. Epilepsi TSK'lı bireylerin %80-90'ını etkilemektedir (Holmes et 2007). İnsülin/mTOR/S6K yolağını farklı aşamalarda inhibe eden ajanların kanserin yanı sıra epilepside kullanımı araştırılmaktadır (Tamanai et al. 2001, Brunner et al. 2003).

## **TALAMUSTA TÜRE BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN İZLENDİĞİ PROTEİNLER**

### **3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase**

Beyin ve sinir sisteminde sentezlenen steroidlere nörosteroid denmektedir. Nörosteroidlerin etkileri klasik steroid hormon nuklear reseptör aracılı değildir. Nörosteroidler etkilerini iyon kapılı nörotransmitter reseptörler gibi veya diğer nörotransmitter reseptörlerin direk/indirek düzenlenmesi gibi başka mekanizmalar ile yapmaktadırlar (Mellon and Griffin, 2002). GABA<sub>A</sub> reseptörünün fonksiyonunu düzenleyen nörosteroidler merkezi sinir sisteminde nöronlar ve glial hücrelerde sentezlenebilmektedir (Biagini et al. 2009). Nörosteroidler GABA<sub>A</sub> ve NMDA gibi ligand kapılı iyon kanallarını modüle ederek merkezi sinir sisteminin uyarılabilirliğini hızlıca değiştirebilmektedirler. GABA<sub>A</sub> ligand kapılı klor kanallarının aktive olması hızlı sinaptik inhibisyonla ilişkilidir. GABA<sub>A</sub> reseptörüne 3 $\alpha$ 'sı çıkarılmış nörosteroidin bağlanması ya inhibisyonla ya da GABA'nın inhibitör etkilerinin potansiyelizasyonu ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla nöroaktif steroidlerin antikonvulsif, anestezik, anksiyolitik etkileri GABA<sub>A</sub> reseptörünü pozitif olarak düzenleme yetenekleri ile ilişkilidir (Stoffel-Wagner, 2003).

Bir nörosteroid olan allopregnanolon (ALLO) GABA reseptörleri üzerine güçlü pozitif allosterik düzenleyici etkiye sahiptir ve GABA<sub>A</sub> reseptörünün affinitesini

arttırmaktadır, klor iletimini de arttırmaktadır ve sonuç olarak anksiyolitik ve anestetik özelliklere sahip olmaktadır (Penning et al. 2003, Agís-Balboa et al. 2007). ALLO, beyinde, progesteronu 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona çeviren 5 $\alpha$ -redüktaz tip 1 ve 5 $\alpha$ -dihidroprogesteronu ALLO'ya çeviren 3 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 $\alpha$ -HSD) olmak üzere iki enzimin ardışık etkisi ile progesterondan sentezlenmektedir (Agís-Balboa et al. 2007). 3 $\alpha$ -HSD memelilerin çeşitli dokularında eksprese olmaktadır (Mitev et al. 2003). 3 $\alpha$ -HSD'ler karaciğerde steroid hormonlarını inaktive eder, prostatta 5 $\alpha$ -dihidrotestosteronun (5 $\alpha$ -DHT) düzeyini düzenler, merkezi sinir sisteminde de 5 $\alpha$ -DHT'yi nörosteroid formu olan ve GABA<sub>A</sub> reseptörünün allosterik efektörü olan allopregnanolona dönüştürmede görev yapmaktadır (Penning et al. 2003). 5 $\alpha$ -redüktaz tip 1 enzimi ve 3 $\alpha$ -HSD; vesiküler glutamat taşıyıcısı 2'nin (VGLUT2) ekspresyonu ile karakterize olan esas çıkıcı glutamaterjik nöronlarda, korteksde, hipokampusda, amigdalada, talamusda ve olfaktör bulbusda kolokalizdir ve glial hücreler özellikle de astrositlerde geniş olarak dağılmaktadır (Tsuruo, 2005). Ancak GABA<sub>A</sub>erjik internöronlarda eksprese olmamaktadır. Kortikal, hipokampal, talamik veya amigdaloid glutamaterjik esas nöronlarda sentezlenen ALLO, otokrin/parakrin mekanizmalar veya ALLO'nun lateral membran difüzyonu aracılığı gibi GABA<sub>A</sub> reseptör bölgelerine ulaşmasını sağlayan bir mekanizma ile GABA<sub>A</sub> reseptörlerinde GABA'nın etkisini düzenleyebileceği belirtilmektedir (Agís-Balboa et al. 2007).

ALLO'nun kateminal epilepsi gibi menstrüel döngü ile ilişkili bozuklukların patofizyolojisinde rolünün olduğuna dair pek çok kanıt bulunmaktadır (Reddy and Rogawski, 2000, Reddy et al. 2001; Reddy and Rogawski MA, 2002). Progesteron yoksunluğunun; nöbet duyarlılığını arttırdığı, benzodiazepin ters agonisti veya pikrotoksin ile indüklenen nöbetin eşliğini düşürdüğü ve nöbet benzeri aktivitenin süre ve şiddetini arttığı bildirilmektedir (Smith et al. 2007).

Sıçanlarda neonatal dönemde kolesterol sentezinin inhibisyonu ile oluşturulan atipik absans modelinde, GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin modülasyonunda benzodiazepin ve Zn<sup>+2</sup> modülasyonunda anormalliklerin olduğu öne sürülmüştür. Atipik absans nöbetlerde, GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin gama2 alt biriminin ekspresyonunun azalmış olmasının talamokortikal DDD'nin üretiminde önemli olabileceği bildirilmiştir. Atipik absans modeli dışında, GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin gama 2 alt birimindeki mutasyonun, jeneralize epilepsi sendromlarında benzodiazepin modülasyonunu değiştirebilmesi ile uyumlu olduğu söylenmektedir (Wu et al. 2004). Diğer taraftan, ALLO'nun intrahipokampal uyulanmasının GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin gamma 2 alt unitesinin ekspresyonunu arttırdığı

gösterilmiştir (Nin et al. 2008). Bu sonuçlar bizim de bulgularımızla uyumludur; WAG/Rij sıçanlarda daha düşük düzeyde eksprese olan 3 alfa HSD, olasılıkla ALLO'nun azalması ile sonuçlanmış olabilir.

## **FULL=2'-5' OLİGOADENYLATE SYNTH**

FULL=2'-5' OLİGOADENYLATE SYNTH (2'-5' OAS) memelilerde doğal bağışıklığın önemli bir komponentidir (Perelygin et al. 2006). Bu enzimler interferonların antiviral etkilerinde rol oynayan ve apoptozis ve hücreSEL büyümeYi kontrol eden interferonla uyarılan protein ailesinin üyesidir (Eskildsen et al. 2002). 2'-5' OAS enzimlerinin interferon aracılı aktivasyonu ATP'den 2'-5' bağlı oligadenylates (2'-5'As)'in sentezi ile sonuçlanır. Sonrasında 2'-5'As'lar aktif formuna dimerize olan latent RNaz L'ye bağlanır. Aktive olan RNaz L, viral ve hücreSEL RNA'ları degrade ederek hücredeki protein sentezini ve viral büyümeYi baskılar. Dahası 2'-5' OAS'lar hücre büyümesinin kontrolüne ve apoptozise katılır. Çalışmalar RNaz L ile 2'-5'As'ın tümör gelişiminde rol oynadığını göstermiştir (Carpten et al. 2002; Eskildsen et al. 2003). 2'-5' sentazlar inaktif enzim olarak üretilirler. Özellikle çift sarmallı RNA'nın varlığında aktive olurlar (Hartmann et al. 1998).

İnterferon/OAS/RNaz yolağı viral enfeksiyonlara karşı temel konak defans mekanizlarından biridir. Bu yolak aynı zamanda hücre bölünmesine, farklılaşmasına ve BCL2 ailesi proteinlerle direkt etkileşerek ya da hücreSEL mRNA kararlılığını düzenleyerek apoptozisin düzenlenişine katılır. İnterferon/OAS/RNaz yolağındaki patolojik değişikliklerin sistemik lupus eritromatozis ve tümör gelişimi ile ilişkisi gösterilmiştir (Yan et al. 2005, Ye et al. 2007, Feng et al. 2006).

## **NUCLEAR DISTRIBUTION PROTEIN nudE HOMOLOG 1 (NUDEL)**

NudE veya NudEL, LIS1/dynein/dyneectin yolağının bileşenlerinden biridir. Adını, aspergilluslarda bu proteini kodlayan gen mutasyonunun, hücre içi çekirdek yerleşimini bozması nedeniyle almıştır (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001). LIS1, bunu eksprese eden organizmaların yaşamı için esansiyeldir. Mutasyona uğramış aleller açısından homozigot drosophlia ve fare embriyoları larva dönemindeyken ya da implantasyonu takiben ölmektedirler. Heterozigot fareler ise beyin yapı ve fonksiyonlarında ağır defektler gösterirler. Dahası LIS1 düzeylerindeki azalmaya doza

bağımlı yanıtlar oluşmaktadır. LIS1'in yarı dozajı sadece nöronal migrasyonu hafif derecede etkilerken ve yetişkinde korteksdeki tabaka organizasyonu normal görünürken biraz daha azalmadaki şiddetlenme hipokampal ve kortikal organizasyonu engeller. LIS1 dynein ve mikrotubul fonksiyonları, ortak genetik yolakta yer almaktadır. Buna rağmen bu etkileşimin doğası ve hücrel sonuçları belirsizdir. İlk çalışmalar dyneinin sitoskelet komponentlerin ve organellerin bir kısmının intrasellüler transportunun düzenlenişinde rol aldığını göstermektedir. Bu fonksiyonla uyumlu bir şekilde LIS1'in aşırı ekspresyonu mikrotubul yapısında bozulmayla sonuçlanır. LIS1 mikrotubul ağıyla dyneinin aktivitesini dinamik olarak düzenleyerek mikrotubul yapısını etkileyebilir. Dynein nöronal mikrotubul yapısının ve polaritesinin düzenlenişinde anahtar bir role sahiptir. Bu hücrel transporttaki rollerine ek olarak mikrotubul bazlı motor proteinler mitotik içciklerin esansiyel komponentleridir. Dolayısıyla LIS1'in aşırı ekspresyonu mitotik süreçte karışır. Son zamanlarda LIS1/dynein/dynein yolağının yeni bir üyesi belirlenmiştir. Bu yeni üye NUDE'dir. Evrimsel çalışmalar LIS1'in NUDE, NUDEL ve mNUDE veya rNUDE ile etkileştiğini göstermektedir. Bu moleküller belirgin olarak sentrozomda LIS1 ile birlikte yerleşim gösterirler. 2 NUDE homologu olan mNUDE ve NUDEL yüksek derecede dizi benzerliği gösterirken, bazı özellikleri ile farklılaşırlar. mNUDE sitoplazmik dyneinin hafif zinciri ile etkileşim gösterirken, NUDEL primer olarak ağır zincirle etkileşim gösterir (Reiner, 2000)

LIS1 yolağının epilepsiyle ilişkili olabileceğine dair ilginç bir çalışma William et al. tarafından C. Elegans adı verilen solucanlarda gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar, içinde NUDE ve NUDEL' in homologlarının da yer aldığı, LIS1 yolağının bileşenlerinin miktarını azalttıklarında bu canlıların PTZ' nin konvulsiyon oluşturucu etkisine duyarlılığın arttığını göstermişlerdir. LIS1 yolağının etkinliğindeki azalma aynı zamanda GABAerjik vezikül trafiğinde bozulmaya yol açmıştır (William et al. 2004).

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonuçları bütün olarak gözden geçirildiğinde üzerinde durulması gereken birkaç konuyu sıralamak uygun olacaktır.

Çalışmada, epileptik hayvanlarda gözlenen DDD aktivitesinin şiddeti ile ilişkilendirilebilecek bir protein tespit edilememiştir. Absans epilepsili sıçanlarda DDD aktivitesi yaklaşık 3. ayda ortaya çıkmakta ve yaşla birlikte süre ve şiddeti giderek artmaktadır. Nöbet şiddeti ve süresi açısından bireysel farklılıklar gözlenmektedir. Yaş faktörünün dışında, özellikle dişilerde hayvanların bulunduğu döngüsel dönem nöbet şiddetini etkileyen faktörler içinde yer alır. Bu çalışmada kullanılan aynı yaş döneminde (6 aylık) erkek sıçanların arasında DDD süre ve sayıları açısından belirgin bir farklılık bulunmamıştır. Yaş ve hormonal döngüden bağımsız olarak DDD aktivitesinin şiddeti ile ilişkilendirilebilecek proteinlerin incelenmesi için DDD aktivitesi açısından farklılık gösteren daha fazla deneğin kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer taraftan, absans epilepside nöbet sıklığının hastalığın seyriyle anlamlı bir ilişkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (Sinclair and Unwala, 2007).

Protein ekspresyonu düzeyinde, türler arasında anlamlı farklılıkların korteks ve talamusta tespit edilmiş olması, absans nöbetlere yol açan patolojinin anatomik bileşeninin talamokortikal döngü olduğu düşüncesini desteklemektedir. Bizim çalışmamızda hipokampus bireysel farklılıkların en fazla görüldüğü bölge özelliğindedir. Fakat bu çalışmada seçilen spotlarda tanımlanan proteinlerin stoplazmik proteinler olduğu gerçeğini de dikkate almak gerekmektedir. Tanımlanan proteinler hücre içi farklı fonksiyonel yolların bileşenleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla özelde absans genelde epilepsi için bu yolları bütün olarak değerlendirmek ve yollar arası bağlantıları araştırmak gerekmektedir. Türsel farklılık gösteren proteinler içinde vesiküler transport sistemine ait proteinler dikkati çekmektedir. Özellikle clathrin aracılı vesiküler transportun bu hayvanlarda değişmiş olduğu söylenebilir. CLTA, Calcyon, Actin-Related Protein 2/3 Complex proteinleri clathrin aracılı vesiküler transport mekanizmalarında yer alan proteinlerdir. Clathrin aracılı endositoz ile çok sayıda molekülün taşındığı bilinmektedir. Bu proteinlerin, özellikle GABA, AMPA ve dopamin reseptörleri ve glutamatin vesiküler transportunda rolleri incelenmiştir. Adı geçen reseptörler absans epilepsili hayvan modellerinde kortikal ve talamik bölgelerde sunulumları kontrol gruplarına göre farklı olan moleküllerdir. Bu çalışmada elde edilen örnekler üzerinde bu reseptörlere ait proteinler seçilen spotlar içinde tanımlanmamıştır. Tanımlanan proteinlerin ise hücre içi yerleşim gösterdiği görülmektedir. Dolayısıyla aynı jel örneklerinde hücre membranı proteinleri ile ilişki kurulamamıştır. Snaptozom proteomik gibi prosedürlerin uygulandığı ilave çalışmalarla hücre membranındaki protein dağılımlarına ulaşılabilir. Tanımlanan proteinlerin fonksiyonel açıdan değerlendirilmesine devam edildiğinde ikinci sırada hücre iskeleti ve özellikle dendritik diken biçimlenmesinde rol oynayabilecek proteinler yer almaktadır. Stathmin 4, Rheb, Arp 2/3 complex proteinleri nörit gelişimi ve dendrit dallanması gibi yapısal süreçleri etkilemektedir. Bu farklılıklar WAG/Rij sıçanların somatosensoryel korteksinde tespit edilmiş olan dendritlere ait yapısal değişiklikler ile ilişkili olabilir. Tanımlanan proteinleri içinde kolesterol sentez yolağına ait bir enzim olan 3 $\alpha$ -HSD enzimi önemlidir. Absans epilepsi ile steroid hormonların etkileşimi iyi bilinmektedir. Yine kronik atipik absans modeli olarak kabul gören deneysel modelde

kolesterol sentez inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu veriler bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Tanımlanan proteinlerin bir kısmı absans epilepsi dışında diğer epilepsi şekilleri, epilepsi dışındaki nöropatolojiler ve hatta kanser gibi tamamen farklı sayılabilecek klinik durumlarla ilişkili bulunmuştur. Bu görünüm, her ne kadar kadar bulunan proteinlerin fonksiyonel spektrumunun geniş olmasından kaynaklanabilse de, açığa çıkan tabloyu dikkate almak gerekmektedir. Özellikle farklı epileptik bozukluklar arasındaki ortak mekanizmaları aydınlatmak ve epilepsi ile komorbidite gösteren hastalıklarda, her iki bozukluğa yatkınlık oluşturup bu patolojilerde paylaşılan yolları tespit etmenin önemi ortaya çıkmaktadır. ILEA' nın da belirttiği gibi epilepsi, hastalığın klinik görünümü olan nöbetlerden daha fazlasıdır. Son olarak, proteomik yöntemiyle elde ettiğimiz verilerin fonksiyonel ve Western Blot, PCR, immünohistokimya gibi diğer moleküler yöntemlerinde katkısıyla pekiştirilmesi gerekmektedir. Epileptogenez, spontan nöbetlerin ortaya çıkışına yol açan faktörlerin moleküler kaskad ve hücrel değişiklikleri tetiklediği bir süreçtir. Bu moleküler ve hücrel değişikliklerin aydınlatılması, epilepsinin tedavisinde yeni ve alternatif hedef moleküllerin ortaya çıkmasına yol açacaktır. Bugün için epilepsinin tedavisi sadece nöbetlerin baskılanmasına yöneliktir. Fakat nedene yönelik ve hastalığı ortadan kaldıracak tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutacak çalışmalar devam etmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abu-Farha, M., Elisma, F., Zhou, H., Tian, R., Zhou, H., Asmer, M.S., Figeys, D. (2009) Proteomics: from technology developments to biological applications. *Anal Chem*, 81(12):4585-99.
- Alexander, G.M., Godwin, D.W. (2006). Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res*, 71, pp. 1–22.
- Altay, E.E., Bilir, E. (1999) Demans ve epilepsi. *DEMANS DİZİSİ*;4:116-128.
- Antflick, J.E., Vetiska, S., Baizer, J.S., Yao, Y., Baker, G.B., Hampson, D.R. (2009). L-Serine-O-phosphate in the central nervous system. *Brain Res.*;1300:1-13.
- Aroniadou-Anderjaska, V., Fritsch, B., Qashu, F., Braga, M.F. (2008) Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res.*, 78(2-3):102-16.
- Aspuria, P.J., Tamanoi, F. (2004) The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal.*;16(10):1105-12.
- Bairoch, A., Boeckmann, B. (1994) The SWISS-PROT protein sequence data bank: current status. *Nucleic Acids Res*, 22(17):3578-80.
- Banerjee, P.K., Snead, O.C.3rd. (1992) Involvement of excitatory amino acid mechanisms in gamma-hydroxybutyrate model of generalized absence seizures in rats. *Neuropharmacology.*;31(10):1009-19.
- Barnes, G.N., Paolicchi, J.M. (2008) Neuropsychiatric comorbidities in childhood absence epilepsy. *Nat Clin Pract Neurol.*;4(12):650-1.
- Beilharz, E.J., Zhukovsky, E., Lanahan, A.A., Worley, P.F., Nikolich, K., Goodman, L.J. (1998) Neuronal activity induction of the stathmin-like gene RB3 in the rat hippocampus: possible role in neuronal plasticity. *J Neurosci.*;18(23):9780-9.
- Bennett, M.R. (1998). Monoaminergic synapses and schizophrenia: 45 years of neuroleptics. *J Psychopharmacol.*;12: 289-304.
- Berkovic, S.F., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Petrou, S. (2006) Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci*, 29(7):391-7.
- Bertram, E.H. (2009) Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav*, 14 Suppl 1:32-7.
- Biberoğlu, G. (2003) Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *T Klin J Med Sci*, 23:491-498.
- Birioukova, L.M., Midzyanovskaya, I.S., Lensu, S., Tuomisto, L., Van Luijtelaaar, G. (2005). Distribution of D1-like and D2-like dopamine receptors in the brain of genetic epileptic WAG/Rij rats. *Epilepsy Res*;63(2-3):89-96.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 4(6):1633-49.

- Brea, D., Cristobo, I., Sobrino, T., Rodríguez-González, R., Mosquera, E., Moldes, O., Castillo, J. (2007) Application of proteomics to neurological diseases. *Neurologia*, 22(3):170-9.
- Broicher, T., Kanyshkova, T., Meuth, P., Pape, H.C., Budde, T. (2008) Correlation of T-channel coding gene expression, IT, and the low threshold Ca<sup>2+</sup> spike in the thalamus of a rat model of absence epilepsy. *Mol Cell Neurosci*, 39(3):384-99.
- Brunner, T.B., Hahn, S.M., Gupta, A.K., Muschel, R.J., McKenna, W.G., Bernhard, E.J. (2003) Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Res.*;63(18):5656-68.
- Bruton, C.J., Stevens, J.R., Frith, C.D. Epilepsy, psychosis, and schizophrenia: clinical and neuropathologic correlations. *Neurology*. 1994 Jan;44(1):34-42.
- Burzynski, G.M., Delalande, J.M., Shepherd, I. (2009) Characterization of spatial and temporal expression pattern of SCG10 during zebrafish development. *Gene Expr Patterns.*;9(4):231-7.
- Cascella, N.G., Schretlen, D.J., Sawa, A. (2009). Schizophrenia and epilepsy: is there a shared susceptibility? *Neurosci Res.*;63(4):227-35.
- Cassimeris, L. (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 18-24
- Charbaut, E., Chauvin, S., Enslin, H., Zamaroczy, S., Sobel, A. (2005) Two separate motifs cooperate to target stathmin-related proteins to the Golgi complex. *J Cell Sci.*;118(Pt 10):2313-23.
- Charbaut, E., Curmi, P.A., Ozon, S., Lachkar, S., Redeker, V., Sobel, A. (2001) Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *J Biol Chem.*;276(19):16146-54.
- Choo, Y.S., Zhang, Z. (2009) Detection of protein ubiquitination. *J Vis Exp.*(30).
- Coenen, A.M., Van Luijckelaar, E.L. (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet.*;33(6):635-55.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy., (1989). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*: 30, 389–399.
- Copolov, D., Crook, J. (2000). Biological markers and schizophrenia. *Aust. N. Z. J. Psychiatry.*;34(suppl):S108-S112.
- Craig, L.A., Hong, N.S., Kopp, J., McDonald, R.J. (2008) Reduced cholinergic status in hippocampus produces spatial memory deficits when combined with kainic acid induced seizures. *Hippocampus*, 18(11):1112-21.
- Curmi, P.A., Gavet, O., Charbaut, E., Ozon, S., Lachkar-Colmerauer, S., Manceau, V., Siavoshian, S., Maucuer, A., Sobel, A. (1999). Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct. Funct.* 24, 345–357.
- D'Andrea, L.D., Regan, L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci.*;28(12):655-62.

- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, C. (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol*, 55(1):27-57.
- Das, A.K., Cohen, P.T.W., Barford, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions *The EMBO Journal*;17(5):1192 – 1199.
- Davidson, H.T., Xiao, J., Dai, R., Bergson, C. (2009). Calcyon is necessary for activity-dependent AMPA receptor internalization and LTD in CA1 neurons of hippocampus. *Eur J Neurosci.*;29(1):42-54.
- De Bruin, N.M.W.J., Van Luijtelaar, E.L.J.M., Jansen, S.J., Cools, A.R., Ellenbroek, B.A. (2000). Dopamine characteristics in different rat genotypes: the relation to absence epilepsy *Neuroscience Research*;38:165–173.
- De Koning, T.J., Klomp, L.W. (2004) Serine-deficiency syndromes. *Curr Opin Neurol.*;17(2):197-204.
- Dent, E.W., Gertler, F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron.*;40(2):209-27.
- Deransart, C., Landwehrmeyer, G.B., Feuerstein, T.J., Lucking, C.H. (2001) Up-regulation of D3 dopaminergic receptor mRNA in the core of the nucleus accumbens accompanies the development of seizures in a genetic model of absence-epilepsy in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*; 94:166–177.
- Di Paolo, G., Lutjens, R., Pellier, V., Stimpson, S.A., Beuchat, M.H., Catsicas, S., Grenningloh, G. (1997). Targeting of SCG10 to the area of the Golgi complex is mediated by its NH2-terminal region. *J Biol Chem.*;272(8):5175-82.
- Dibbens, L.M., Harkin, L.A., Richards, M., Hodgson, B.L., Clarke, A.L., Petrou, S., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Mulley, J.C. (2009) The role of neuronal GABA(A) receptor subunit mutations in idiopathic generalized epilepsies. *Neurosci Lett*, 453(3):162-5.
- Dickman, D.K., Horne, J.A., Meinertzhagen, I.A., Schwarz, T.L. (2005) A slowed classical pathway rather than kiss-and-run mediates endocytosis at synapses lacking synaptojanin and endophilin. *Cell.*;123(3):521-33.
- Dumont, D., Noben, J.P., Verhaert, P., Stinissen, P., Robben, J. (2006) Gel-free analysis of the human brain proteome: application of liquid chromatography and mass spectrometry on biopsy and autopsy samples. *Proteomics*, 6(18):4967-77.
- Durrbach, A., Louvard, D., Coudrier, E. (1996) Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci.*;109 ( Pt 2):457-65.
- Ellenbroek, B.A., Geyer, M.A., Cools, A.R. (1995). The Behavior of APO-SUS Rats in animal models with construct validity for schizophrenia *J Neuroscience*;15(11):7604- 7611.
- Engel, J. JR., Pedley, T.A. (2008) Chapter:20, Epilepsy: a comprehensive textbook. Second Edition. Volume 1, 217-219. Lipincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business.

Eun, J.P., Choi, H.Y., Kwak, Y.G. (2004) Proteomic analysis of human cerebral cortex in epileptic patients. *Exp Mol Med.* 36(2):185-91.

Ferrer-Alcón, M., Arteta, D., Guerrero, M.J., Fernandez-Orth, D., Simón, L., Martínez, A. (2009) The use of gene array technology and proteomics in the search of new targets of diseases for therapeutics. *Toxicol Lett*, 186(1):45-51.

Fisher, S.E., Francks, C., McCracken, J.T., McGough, J.J., Marlow, A.J., MacPhie, I.L., Newbury, D.F., Crawford, L.R., Palmer, C.G., Woodward, J.A., Del'Homme, M., Cantwell, D.P., Nelson, S.F., Monaco, A.P., Smalley, S.L. (2002) A genomewide scan for loci involved in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 70: 1183–1196.

Fong, G.C.Y., Shah, P.U., Gee, M.N., Serratos, J.M., Castroviejo, I.P., Khan, S., Ravat, S.H., Mani, J., Huang, Y., Zhao, H.Z., Medina, M.T., Treiman, L.J., Pineda, G., Delgado-Escueta, A.V. (1998). Childhood absence epilepsy with tonic– clonic seizures and electroencephalogram 3–4 Hz spike and multispikes-slow wave complexes: Linkage to chromosome 8q24. *Am. J. Hum. Genet*, 63:1117–1129.

Francese, S., Dani, F.R., Traldi, P., Mastrobuoni, G., Pieraccini, G., Moneti, G. (2009) MALDI mass spectrometry imaging, from its origins up to today: the state of the art. *Comb Chem High Throughput Screen*,12(2):156-74.

Fuchs, S.A., Dorland, L., De Sain-van der Velden, M.G., Hendriks, M., Klomp, L.W., Berger, R., De Koning, T.J. (2006). D-serine in the developing human central nervous system. *Ann Neurol.*;60(4):476-80.

Furuya, S., Tabata, T., Mitoma, J., Yamada, K., Yamasaki, M., Makino, A., Yamamoto, T., Watanabe, M., Kano, M., Hirabayashi, Y. (2000) L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;97(21):11528-33.

Gaiser, A.M., Brandt, F., Richter, K. (2009). The non-canonical Hop protein from *Caenorhabditis elegans* exerts essential functions and forms binary complexes with either Hsc70 or Hsp90. *J Mol Biol.*;391(3):621-34.

Garami, A., Zwartkruis, F.J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S.C., Hafen, E., Bos, J.L., Thomas, G. (2003) Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell.*;11(6):1457-66.

Govorun, V.M., Archakov, A.I. (2002) Proteomic technologies in modern biomedical science. *Biochemistry (Mosc)*, 67(10):1109-23.

Greene, N.D., Bamidele, A., Choy, M., De Castro, S.C., Wait, R., Leung, K.Y., Begum, S., Gadian, D.G., Scott, R.C., Lythgoe, M.F. (2007) Proteome changes associated with hippocampal MRI abnormalities in the lithium pilocarpine-induced model of convulsive status epilepticus. *Proteomics*,7(8):1336-44.

Grenningloh, G., Soehrman, S., Bondallaz, P., Ruchti, E., Cadas, H. (2004). Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J Neurobiol.* 58(1):60-9.

Guerrera, I.C., Kleiner, O. (2005) Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep*, 25(1-2):71-93.

Guo, F., Sun, F., Yu, J.L., Wang, Q.H., Tu, D.Y., Mao, X.Y., Liu, R., Wu, K.C., Xie, N., Hao, L.Y., Cai, J.Q. (2009). Abnormal expressions of glutamate transporters and metabotropic glutamate receptor 1 in the spontaneously epileptic rat hippocampus. *Brain Res Bull.*

Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R. 3rd. (2008) Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*, 12(5):483-90.

Hashimoto, A., Kumashiro, S., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Mito, T., Takashima, S., Doi, N., Mizutani, Y., Yamazaki, T. (1993). Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J Neurochem*; 61:348–351.

Hashimoto, A., Oka, T., Nishikawa, T. (1995). Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci*;7: 1657–1663.

He, Q.Y., Chiu, J.F. (2003 ) Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J Cell Biochem*, 89(5):868-86.

He, S., Wang, Q., He, J., Pu, H., Yang, W., Ji, J. (2006) Proteomic analysis and comparison of the biopsy and autopsy specimen of human brain temporal lobe. *Proteomics*, 6(18):4987-96.

Hoffmann, J., Schmidt, T.L., Heckel, A., Brutschy, B. (2009) Probing the limits of liquid droplet laser desorption mass spectrometry in the analysis of oligonucleotides and nucleic acids. *Rapid Commun Mass Spectrom.*23(14):2176-80.

Holmes, G.L., Stafstrom, C.E., and the Tuberous Sclerosis Study Group. (2007) Tuberous Sclerosis Complex and epilepsy: recent developments and future challenges. *Epilepsia* 48:617–630.

Inaba, Y., D'Antuono, M., Bertazzoni, G., Biagini, G., Avoli, M. (2009). Diminished presynaptic GABA(B) receptor function in the neocortex of a genetic model of absence epilepsy. *Neurosignals.*;17(2):121-31.

Ishige, K., Ito, Y., Fukuda, H. (1998) Pharmacological profiles of absence seizure-induced increases in CRE- and AP-1 DNA-binding activities in gamma-butyrolactone-treated mice. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 18(4):117-22.

Jaeken, J. (2002). Genetic disorders of gamma-aminobutyric acid, glycine, and serine as causes of epilepsy. *J Child Neurol*; 17(Suppl 3): 3S84-3S87.

Jensen, O.N.(2004) Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry.

Jeon, B.T., Lee, D.H., Kim, K.H., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., Roh, G.S. (2009). Ketogenic diet attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death by decreasing AMPK/ACC pathway activity and HSP70. *Neurosci Lett.*;453(1):49-53.

Jiang, L., Huang, C.G., Lu, Y.C., Luo, C., Hu, G.H., Liu, H.M., Chen, J.X., Han, H.X. (2008). Expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 in astrocytic tumors. *Brain Res.*;1201:161-6.

Jiang, W., Du, B., Chi, Z., Ma, L., Wang, S., Zhang, X., Wu, W., Wang, X., Xu, G., Guo, C. (2007) Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics. *J Neurosci Res*, 85(14):3160-70.

- Jonsson, A.P. (2001) Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell Mol Life Sci.* 58(7):868-84.
- Jouvenceau, A., Billard, J.M., Lamour, Y., Dutar, P. (1996) Persistence of CA1 hippocampal LTP after selective cholinergic deafferentation in rats. *Neuroreport*, 7:948–952.
- Jouvenceau, A., Billard, J.M., Lamour, Y., Dutar, P. (1997) Potentiation of glutamatergic EPSP's in rat CA1 hippocampal neurons after selective cholinergic denervation by 192 IgG-saporin. *Synapse*, 26:292–300.
- Junker, H., Späte, K., Suofu, Y., Walther, R., Schwarz, G., Kammer, W., Nordheim, A., Walker, L.C., Runge, U., Kessler, C., Popa-Wagner, A. (2005) Proteomic identification of the involvement of the mitochondrial rieske protein in epilepsy. *Epilepsia*, 46(3):339-43.
- Junker, H., Späte, K., Suofu, Y., Walther, R., Schwarz, G., Kammer, W., Nordheim, A., Walker, L.C., Runge, U., Kessler, C., Popa-Wagner, A. (2005). Proteomic identification of the involvement of the mitochondrial rieske protein in epilepsy. *Epilepsia*.;46(3):339-43.
- Kaiser, C. (2000) Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;97(8):3783-5.
- Kang, J.Q., Macdonald, R.L. (2009) Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med.*, 15(9):430-8.
- Karpova, A.V., Bikbaev, A.F., Coenen, A.M., Van Luijtelaar, G. (2005) Morphometric Golgi study of cortical locations in WAG/Rij rats: the cortical focus theory. *Neurosci Res.*;51(2):119-28.
- Kartvelishvily, E., Shleper, M., Balan, L., Dumin, E., Wolosker, H. (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem.*;281(20):14151-62.
- Kato, K., Katoh-Semba, R., Takeuchi, I.K., Ito, H., Kamei, K. (1999). Responses of heat shock proteins hsp27, alphaB-crystallin, and hsp70 in rat brain after kainic acid-induced seizure activity. *J Neurochem.*;73(1):229-36.
- Kaufmann, R., Goldberg-Stern, H., Shuper, A. (2009) Attention-deficit disorders and epilepsy in childhood: incidence, causative relations and treatment possibilities. *J Child Neurol.*;24(6):727-33.
- Kavakebi, P., Hausott, B., Tomasino, A., Ingorokva, S., Klimaschewski, L. (2005). The N-end rule ubiquitin-conjugating enzyme, HR6B, is up-regulated by nerve growth factor and required for neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.*;29(4):559-68.
- Khan, Z., Carey, J., Park, H.J., Lehar, M., Lasker, D., Jinnah H.A. (2004) Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant. *Neuroscience* 127, 785–796.
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.J., Kim, S.S., McEnery, M.W., Shin H. S. (2001). Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking  $\alpha 1G$  T-type  $Ca^{2+}$  channels. *Neuron*. 31, 35–45.
- Klimaschewski, L. (2003). Ubiquitin-dependent proteolysis in neurons. *News Physiol Sci.*;18:29-33.

- Koerner, C., Danober, L., Boehrer, A., Marescaux, C., Vergnes, M. (1996) Thalamic NMDA transmission in a genetic model of absence epilepsy in rats. *Epilepsy Res.*;25(1):11-9.
- Koh, P.O., Bergson, C., Undie, A.S., Goldman-Rakic, P.S., Lidow, M.S. (2003) Up-regulation of the D1 dopamine receptor-interacting protein, calcyon, in patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.*;60(3):311-9.
- Kostopoulos, G.K. (2000) Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clin. Neurophysiol.*: 111(Suppl. 2), S27–S38.
- Kruusmägi, M., Zelenin, S., Brismar, H., Scott, L. (2007) Intracellular dynamics of calcyon, a neuron-specific vesicular protein. *Neuroreport.*;18(15):1547-51.
- Kumar, C., Mann, M. (2009) Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS Lett*, 583(11):1703-12.
- Kübler, E., Riezman, H. (1993) Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.*;12(7):2855-62.
- Kwiatkowski, D.J. (2003) Rhebbing up mTOR: new insights on TSC1 and TSC2, and the pathogenesis of tuberous sclerosis. *Cancer Biol Ther.*;2(5):471-6.
- Lakaye, B., De Borman, B., Minet, A., Arckens, L., Vergnes, M., Marescaux, C., Grisar, T. (2000) Increased expression of mRNA encoding ferritin heavy chain in brain structures of a rat model of absence epilepsy. *Exp Neurol.*;162(1):112-20.
- Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M. (2001) Neuronal migration. *Mech Dev.*;105(1-2):47-56.
- Lau, A.T., He, Q.Y., Chiu, J.F. (2003) Proteomic technology and its biomedical applications. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 35(11):965-75.
- Lee, S.H., Liu, L., Wang, Y.T., Sheng, M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron.*;36(4):661-74.
- Lee, S.J., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M., Yasuda, R. (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature.*;458(7236):299-304.
- Lehman, N.L. (2009) The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol.*;118(3):329-47.
- Lewis, J.K., Wei, J., Siuzdak, G. (2000). Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.) pp. 5880–5894.
- Lezcano, N., Mrzljak, L., Eubanks, S., Levenson, R., Goldman-Rakic, P., Bergson, C. (2000) Dual signaling regulated by calcyon, a D1 dopamine receptor interacting protein. *Science.*;287(5458):1660-4.
- Li, H., Kraus, A., Wu, J., Huguenard, J.R., Fisher, R.S. (2006) Selective changes in thalamic and cortical GABAA receptor subunits in a model of acquired absence epilepsy in the rat. *Neuropharmacology.*;51(1):121-8.

- Li, Y., Corradetti, M.N., Inoki, K., Guan, K.L. (2004) TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci.*;29(1):32-8.
- Lidow, M.S., Williams, G.V., Goldman-Rakic, P.S. (1998). The cerebral cortex: a case for a common site of action of antipsychotics. *Trends Pharmacol Sci.*;19:136-140.
- Liu, X.Y., Wen, F., Yang, J.L., Chen, L.J., Wei, Y.Q. (2009) A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy. *Mass Spectrom Rev.*
- Liu, X.Y., Yang, J.L., Chen, L.J., Zhang, Y., Yang, M.L., Wu, Y.Y., Li, F.Q., Tang, M.H., Liang, S.F., Wei, Y.Q. (2008) Comparative proteomics and correlated signaling network of rat hippocampus in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Proteomics.*;8(3):582-603.
- Liu, Y.H., Wang, L., Wei, L.C., Huang, Y.G., Chen, L.W. (2009). Up-regulation of D-serine might induce GABAergic neuronal degeneration in the cerebral cortex and hippocampus in the mouse pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res.*;34(7):1209-18.
- Lively, S., Brown, I.R. (2008) Extracellular matrix protein SC1/hevin in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Neurochem.*;107(5):1335-46.
- Locke, D., Bian, S., Li, H., Harris, A.L. (2009) Posttranslational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry. *Biochem J.*
- Lubec, G., Afjehi-Sadat, L., Yang, J.W., John, J.P. (2005) Searching for hypothetical proteins: theory and practice based upon original data and literature. *Prog Neurobiol*, 77(1-2):90-127.
- Luo, W., Wang, Y., Reiser, G. (2007) p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. *J Biol Chem.*;282(41):30246-55.
- Luo, X., Kranzler, H., Lappalainen, J., Rosenheck, R., Charney, D., Zuo, L., Erdos, J., Van Kammen, D.P., Gelernter, J. (2004). CALCYON gene variation, schizophrenia, and cocaine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*;125B(1):25-30.
- Mann, M., Jensen, O.N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 21(3):255-61.
- Manning, B.D., Cantley, L.C. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci.* Nov;28(11):573-6.
- Manning, J.P., Richards, D.A., Bowery, N.G. (2003) Pharmacology of absence epilepsy. *Trends Pharmacol Sci*, 24(10):542-9.
- Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A. (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl*; 35:37-69.
- Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A. (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl.*;35:37-69.
- Mauri, P., Scigelova, M. (2009) Multidimensional protein identification technology for clinical proteomic analysis. *Clin Chem Lab Med*, 47(6):636-46.



- Mayer, R.J. (2003) From neurodegeneration to neurohomeostasis: the role of ubiquitin. *Drug News Perspect.*;16(2):103-8.
- McMahon, H.T., Mills, I.G. (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol.*;16(4):379-91.
- Meencke, H.J. (1989) Pathology of childhood epilepsies. *Cleve Clin J Med.*;56 Suppl Pt 1:S111-20; discussion S121-3.
- Meldrum, B.S., Rogawski, M.A. (2007) Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics.* 4(1):18-61.
- Menuz, K., Nicoll, R.A. (2008) Loss of inhibitory neuron AMPA receptors contributes to ataxia and epilepsy in stargazer mice. *J Neurosci.*;15;28(42):10599-603.
- Miltiadous, P., Stamatakis, A., Stylianopoulou, F. (2009). Neuroprotective Effects of IGF-I Following Kainic Acid-Induced Hippocampal Degeneration in the Rat. *Cell Mol Neurobiol.*
- Moldrich, R.X., Chapman, A.G., De Sarro, G., Meldrum, B.S. (2003). Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *Eur J Pharmacol.*;476(1-2):3-16.
- Morii, H., Shiraishi-Yamaguchi, Y., Mori, N. (2006a) SCG10, a microtubule destabilizing factor, stimulates the neurite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons. *J Neurobiol.*;66(10):1101-14.
- Muñiz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., Riezman, H. (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol.*;6;148(5):925-30.
- Nakao, C., Itoh, T.J., Hotani, H., Mori, N. (2004) Modulation of the stathmin-like microtubule destabilizing activity of RB3, a neuron-specific member of the SCG10 family, by its N-terminal domain. *J Biol Chem.*;279(22):23014-21..
- Nehlig, A., Vergnes, M., Boyet, S., Marescaux, C. (1998). Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS. *Epilepsy Res.*;32(1-2):206-12.
- Ohkawa, N., Fujitani, K., Tokunaga, E., Furuya, S., Inokuchi, K. (2007). The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells. *J Cell Sci.*;120(Pt 8):1447-56.
- Olsen, J.V., Ong, S.E., Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics*, 3(6):608-14.
- Ong, S.E., Mann, M. (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*, 1(5):252-62.
- Ozon, S., Byk, T., Sobel, A. (1998) SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J Neurochem.*;70(6):2386-96.
- Ozon, S., Maucuer, A., Sobel, A. (1997) The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur J Biochem.*;248(3):794-806.

- Parisi, P., Moavero, R., Verrotti, A., Curatolo, P. (2009) Attention deficit hyperactivity disorder in children with epilepsy. *Brain Dev.*
- Payne, G.S., Hasson, T.B., Hasson, M.S., Schekman, R. (1987) Genetic and biochemical characterization of clathrin-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*;7(11):3888-98.
- Pelc, K., Boyd, S.G., Cheron, G., Dan, B. (2008) Epilepsy in Angelman syndrome. *Seizure.*;17(3):211-7.
- Petcu, E.B., Dunoiu, C., Ioana, M., Pirici, D., Mogoantă, L., Popa-Wagner, A. (2007) Modified variant of the Rieske iron-sulfur protein in the hippocampus of kindled rats and human epileptic patients. *Rom J Morphol Embryol*, 48(1):17-24.
- Porter, J.T., Nieves, D. (2004) Presynaptic GABAB receptors modulate thalamic excitation of inhibitory and excitatory neurons in the mouse barrel cortex. *J. Neurophysiol.* 92, 2762–2770.
- Rampitsch, C., Bykova, N.V. (2009) Methods for functional proteomic analyses. *Methods Mol Biol*, 513:93-110.
- Ratushnyak, A.S., Zapara, T.A., Zharkikh, A.A., Ratushnyak, O.A. (1997) Effects of changes in dynamic equilibrium in microtubule and microfilament systems on the plastic responses of neurons. *Neurosci Behav Physiol* 27:353-35
- Reiner, O. (2000) LIS1. let's interact sometimes. (part 1). *Neuron.*;28(3):633-6.
- Renier, W.O., Coenen, A.M.L. (2000). Human absence epilepsy: the WAG/Rij rat as a model. *Neurosci. Res. Comm.* 26(3): 181-191.
- Reyzer, M.L., Caprioli, R.M. (2005) MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery. *J Proteome Res*, 4(4):1138-42.
- Richards, D.A., Morrone, L.A., Bowery, N.G. (2000) Hippocampal extracellular amino acids and EEG spectral analysis in a genetic rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology.*;39(12):2433-41.
- Ritzén, A., Mathiesen, J.M., Thomsen, C. (2005) Molecular pharmacology and therapeutic prospects of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 97(4):202-13.
- Roshan-Milani, S., Ferrigan, L., Khoshnood, M.J., Davies, C.H., Cobb, S.R. (2003) Regulation of epileptiform activity in hippocampus by nicotinic acetylcholine receptor activation. *Epilepsy Res*, 56(1):51-65.
- Ryu MJ, Lee, C., Kim, J., Shin, H.S., Yu, M.H. (2008) Proteomic analysis of stargazer mutant mouse neuronal proteins involved in absence seizure. *J Neurochem.* 104(5):1260-70.
- Ryu, M.J., Kim, D., Kang, U.B., Kim, J., Shin, H.S., Lee, C., Yu, M.H. (2007) Proteomic analysis of gamma-butyrolactone-treated mouse thalamus reveals dysregulated proteins upon absence seizure. *J Neurochem*, 102(3):646-56.
- Sánchez-Carpintero Abad, R., Sanmartí Vilaplana, F.X., Serratosa Fernández, J.M. (2007) Genetic causes of epilepsy. *Neurologist*, 13(6 Suppl 1):S47-51.

- Sandsmark, D.K., Pelletier, C., Weber, J.D., Gutmann, D.H. (2007) Mammalian target of rapamycin: master regulator of cell growth in the nervous system. *Histol Histopathol* 22:895–903.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17:596–603.
- Sarkisova, K.Y., Kulikov, M.A., Midzyanovskaya, I.S., Folomkina, A.A. (2008) Dopamine-dependent nature of depression-like behavior in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol.*;38(2):119-28.
- Sato, T., Umetsu, A., Tamanoi, F. (2008) Characterization of the Rheb-mTOR signaling pathway in mammalian cells: constitutive active mutants of Rheb and mTOR. *Methods Enzymol.*;438:307-20.
- Saucedo, L.J., Gao, X., Chiarelli, D.A., Li, L., Pan, D., Edgar, B.A. (2003) Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol.*;5(6):566-71.
- Sauer, S. (2006) Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta*, 363(1-2):95-105.
- Sauer, S. (2007). The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry. *J Biochem Biophys Methods.*;70(2):311-8.
- Savoca, R., Ziegler, U., Sonderegger, P. (1995) Effects of L-serine on neurons in vitro. *J Neurosci Methods.*;61(1-2):159-67.
- Schell, M.J., Brady, R.O.Jr., Molliver, M.E., Snyder, S.H. (1997). D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci*;17: 1604–1615.
- Schridde, U., Strauss, U., Bräuer, A.U., Van Luijtelaaar, G. (2006) Environmental manipulations early in development alter seizure activity, Ih and HCN1 protein expression later in life. *Eur J Neurosci.*;23(12):3346-58.
- Seino, M. (2006) Classification criteria of epileptic seizures and syndromes. *Epilepsy Res.* ;70 Suppl 1:S27-33.
- Shi, M., Caudle, W.M., Zhang, J. (2009) Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiol Dis*, 35(2):157-64.
- Shleper, M., Kartvelishvily, E., Wolosker, H. (2005) D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci.*;25(41):9413-7.
- Sinclair D.B., Unwala H.(2007) Absence epilepsy in childhood: electroencephalography (EEG) does not predict outcome. *J Child Neurol.*;22(7):799-802.
- Sitnikova, E., Van Luijtelaaar, G. (2006) Cortical and thalamic coherence during spike-wave seizures in WAG/Rij rats. *Epilepsy Res.*;71(2-3):159-80.
- Sitnikova, E., Van Luijtelaaar, G. (2007) Electroencephalographic characterization of spike-wave discharges in cortex and thalamus in WAG/Rij rats. *Epilepsia*. 48(12):2296-311.

- Stafstrom, C.E. (2006) Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(8):983-1004.
- Stafstrom, C.E. (2009) Severe epilepsy syndromes of early childhood: the link between genetics and pathophysiology with a focus on SCN1A mutations. *J Child Neurol.*, 24(8 Suppl):15S-23S.
- Stocker, H., Radimerski, T., Schindelholz, B., Wittwer, F., Belawat, P., Daram, P., Breuer, S., Thomas, G., Hafen, E. (2003) Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.*;5(6):559-65.
- Sugimoto, Y., Morita, R., Amano, K., Fong, C.Y., Shah, P.U., Castroviejo, I.P., Khan, S., Delgado-Escueta, A.V., Yamakawa, K. (2000) Childhood absence epilepsy in 8q24: refinement of candidate region and construction of physical map. *Genomics*, 68(3):264-72.
- Tabancay, A.P.Jr., Gau, C.L., Machado, I.M., Uhlmann, E.J., Gutmann, D.H., Guo, L., Tamanoi, F. (2003) Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *J Biol Chem.*;278(41):39921-30.
- Tamanoi, F., Gau, C.L., Jiang, C., Edamatsu, H., Kato-Stankiewicz, J. (2001) Protein farnesylation in mammalian cells: effects of farnesyltransferase inhibitors on cancer cells. *Cell Mol Life Sci.*;58(11):1636-49.
- Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., Blenis, J. (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol.*;13(15):1259-68.
- Teichgräber, L.A., Lehmann, T.N., Meencke, H.J., Weiss, T., Nitsch, R., Deisz, R.A.(2009) Impaired function of GABA(B) receptors in tissues from pharmacoresistant epilepsy patients. *Epilepsia*, 50(7):1697–1716.
- Thompson, S.J., Loftus, L.T., Ashley, M.D., Meller, R. (2008) Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol.*;8(1):90-5.
- Thongboonkerd, V. (2007) Practical points in urinary proteomics. *J. Proteome Res.* 6,3881–3890.
- Touret, M., Parrot, S., Denoroy, L., Belin, M.F., Didier-Bazes, M. (2007). Glutamatergic alterations in the cortex of genetic absence epilepsy rats. *BMC Neurosci.*;8:69.
- Trantham-Davidson, H., Vazdarjanova, A., Dai, R., Terry, A., Bergson, C. (2008) Up-regulation of calcyon results in locomotor hyperactivity and reduced anxiety in mice. *Behav Brain Res.*;189(2):244-9.
- Van Luijckelaar, G., Sitnikova, E. (2006) Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci Biobehav Rev.*;30(7):983-1003.
- Vargas, K.J., Terunuma, M., Tello, J.A., Pangalos, M.N., Moss, S.J., Couve, A. (2008) The availability of surface GABA B receptors is independent of gamma-aminobutyric acid but controlled by glutamate in central neurons. *J Biol Chem.*; 283(36):24641-8.
- Wallace, R. (2002) Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. *Lancet Neurol*, 1(4):212.

- Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M., Webb, D.J. (2008). N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem.*;283(23):15912-20.
- Weiergräber, M., Stephani, U., Köhling, R. (2009). Voltage-gated Calcium Channels in the Etiopathogenesis and Treatment of Absence Epilepsy. *Brain Res Rev.*
- Wilbur, J.D., Chen, C.Y., Manalo, V., Hwang, P.K., Fletterick, R.J., Brodsky, F.M. (2008) Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J Biol Chem.*;283(47):32870-9.
- Williams, S.N., Locke, C.J., Braden, A.L., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A. (2004). Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet.*;13(18):2043-59.
- Wiśniewski, J.R. (2008) Mass spectrometry-based proteomics: principles, perspectives, and challenges. *Arch Pathol Lab Med*, 132(10):1566-9.
- Wittmann, T., Bokoch, G.M., Waterman-Storer, C.M. (2004). Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. *J. Biol. Chem.* 279, 6196-6203
- Witzmann, F.A., Arnold, R.J., Bai, F., Hrcirova, P., Kimpel, M.W., Mechref, Y.S., McBride, W.J., Novotny, M.V., Pedrick, N.M., Ringham, H.N., Simon, J.R. (2005). A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics.*;5(8):2177-201.
- Wong, M. (2009) Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition as a potential antiepileptogenic therapy: From tuberous sclerosis to common acquired epilepsies. *Epilepsia.*
- Wooten, M.W., Geetha, T. (2006). The role of ubiquitin in neurotrophin receptor signalling and sorting. *Biochem Soc Trans.*;34(Pt 5):757-60.
- Xiao, F., Chen, D., Lu, Y., Xiao, Z., Guan, L.F., Yuan, J., Wang, L., Xi, Z.Q., Wang, X.F. (2009). Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with idiopathic temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*;1255:180-9.
- Xiao, F., Wang, X.F., Li, J.M., Xi, Z.Q., Lu, Y., Wang, L., Zeng, Y., Guan, L.F., Yuan, J. (2008) Overexpression of N-WASP in the brain of human epilepsy. *Brain Res.* 3;1233:168-75.
- Xiao, J., Dai, R., Negyessy, L., Bergson, C. (2006). Calcyon, a novel partner of clathrin light chain, stimulates clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem.*;281(22):15182-93.
- Yan, W., Chen, S.S. (2005) Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 4(1):27-38.
- Yang, J.W., Czech, T., Felizardo, M., Baumgartner, C., Lubec, G. (2006) Aberrant expression of cytoskeleton proteins in hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Amino Acids.* 30(4):477-93.
- Yang, J.W., Czech, T., Gelpi, E., Lubec, G. (2005) Extravasation of plasma proteins can confound interpretation of proteomic studies of brain: a lesson from apo A-I in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res*, 139(2):348-56.

Yang, T., Hsu, C., Liao, W., Chuang, J.S. (2008) Heat shock protein 70 expression in epilepsy suggests stress rather than protection. *Acta Neuropathol.*;115(2):219-30.

Yang, Y., Yu, X. (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.*;17(8):790-9.

Zelenin, S., Aperia, A., Diaz Heijtz, R. (2002) Calcyon in the rat brain: cloning of cDNA and expression of mRNA. *J Comp Neurol*; 446:37–45.

Zhang, J. (2007) Proteomics of human cerebrospinal fluid—the good, the bad, and the ugly. *Proteomics Clin. Appl.* 1, 805–819.

Zimmerman, G., Njunting, M., Ivens, S., Tolner, E.A., Behrens, C.J., Gross, M., Soreq, H., Heinemann, U., Friedman, A.(2008) Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci*, 27(4):965-75.

Zupec-Kania, B.A., Spellman, E. (2009) An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy. *Nutr Clin Pract*, 23(6):589-96.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Ad Soyad Gönül Bambal  
Adres Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.  
41380 Umuttepe/Kocaeli  
Telefon 0262 3037334  
Fax 0262 3037510  
E-posta gonulbambal@gmail.com  
Doğum Tarihi 06.07.1979  
Görevi Araştırma Görevlisi  
Yabancı Dil İngilizce

## **EĞİTİM**

Doktora 2006-2010 Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.  
Yüksek Lisans 2003-2006 Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.  
Lisans 1997-2002 İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik  
Bilimler Bölümü

## **İŞ DENEYİMİ**

2005-2010 Araştırma Görevlisi, Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim  
Dalı  
2009- 2009 Araştırma Görevlisi (görevlendirme), Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji  
Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı, Proteom Bilim Bölümü  
2009-2010 Öğrenci Temsilcisi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
2007-2008 Öğrenci Temsilcisi Yardımcısı, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## **ARAŞTIRMADA BAŞLICA İLGİ ALANLARI**

Epilepsi, deneysel epilepsi modelleri, proteomiks