

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRODEJENERATİF MEKANİZMALARIN MİTOKONDRİYAL  
DİSFONKSİYON HÜCRE MODELLERİNDE PROTEOMİK  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Betül BAYKAL

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

KOCAELİ  
2011



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRODEJENERATİF MEKANİZMALARIN MİTOKONDRİYAL  
DİSFONKSİYON HÜCRE MODELLERİNDE PROTEOMİK  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Betül BAYKAL

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

Danışman: Doç. Dr. Murat KASAP (Dr. Ahmet Tarık BAYKAL)

KOCAELİ  
2011

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

**Tez Adı: Nörodejeneratif mekanizmaların mitokondriyal disfonksiyon hücre modellerinde proteomik yöntemlerle araştırılması**

Tez yazarı: Betül BAYKAL

Tez savunma tarihi: 30 Haziran 2011

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Murat KASAP

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

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

**ONAY**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2011

Prof. Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

## 1.ÖZET

### **Nörodejeneratif Mekanizmaların Mitokondriyal Disfonksiyon Hücre Modellerinde Proteomik Yöntemlerle Araştırılması**

**Amaç:** Sıvı kromatografisi ve ardışık kütle spektrometresi ile peptit temelli diferansiyel proteomik yöntem kullanılarak nörodejeneratif hastalıklara ait mekanizmaları aydınlatmaya çalışmak.

**Yöntem:** SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, elektron taşıma zincirlerindeki 5 adet kompleksin her birine özgü nörotoksinler (MPTP, 3-NP, Soydum azit, Antimisin A ve Oligomisin) ile etkileştirilip, LC-MS<sup>E</sup> temelli bottom-up etiketsiz diferansiyel proteomik yöntemi ile protein ifade farklılıkları analiz edildi. Protein ekstraksiyonu sonrasında elde edilen triptik peptitler, ters fazda nano akış sıvı kromatografisi ile ayrıştırıldı. Kütle spektrometresinde gerçekleştirilen MS deneyi ile peptitler kantitatif olarak ölçüldü ve ardından gerçekleştirilen MS/MS deneyleriyle peptitler parçalanarak amino asit dizileri tanımlandı.

**Bulgular:** 380 adet protein yüksek güvenilirlikte tanımlandı ve mutlak miktarları ölçüldü. Tanımlanan proteinler, biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücrel yerleşimlerine göre sınıflandırılarak, her hücre modeline özgü, enerji metabolizmasında, stres cevabında ve regülasyonlarda değişim olduğu gözlemlendi.

**Sonuç:** Nörotoksine maruz bırakılan SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, *in-vitro* mitokondriyal disfonksiyon modeli olarak uygundur. LC-MS/MS, protein ekspresyon değişimlerini göstermek ve nörodejeneratif mekanizmaların anlaşılabilmesi için başvurulacak güçlü bir yöntemdir. Mitokondriyal disfonksiyon, ETS'nin bloke edilmesiyle başlamış olsa da farklı kompleks inhibisyonları sonucunda gruplar arasında farklılık gözlemlenmiştir. Miktar bakımından değişimlerini gördüğümüz; alfa-enolaz, gama-enolaz, gliseraldehit-3fosfat dehidrogenaz, 14-3-3 proteinleri, profilin-1, açıl-CoA dehidrogenaz, DJ-1, malat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, uzama faktörü proteinleri ve hücre iskeleti proteinleri nörodejenerasyonla bağlantılı olabilir ve biyobelirteç olarak değerlendirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** nanoUPLC-ESI-qTOF, Shotgun proteomik, Nörodejenerasyon

## 2. ABSTRACT

### **Differential Protein Expression Analysis of Mitochondrial Dysfunction Cell Models to Understand Neurodegenerative Mechanisms**

**Aim:** Understand neurodegenerative mechanisms with a method based on liquid chromatography and mass spectrometry, a bottom-up label free differential proteomics.

**Method:** LC-MS<sup>E</sup> based bottom-up, label-free differential proteomics expression analysis was applied to electron transport complex specific neurotoxin (MPTP, 3-NP, Azide, Antimycin A and Oligomycin) induced neuroblastoma cells to determine protein expression differences. The generated tryptic peptides were fractionated by nano chromatography and amino acid sequences for the identification and absolute quantification was achieved by the MS and MS/MS experiments.

**Results:** 380 protein identifications were achieved and absolute amounts were quantified. Automated classification of identified proteins based on biological processes, molecular function and cellular compartmentation showed that there were cell model specific alterations in pathways related to energy metabolism, stress response, regulation, and some others.

**Conclusions:** Neurotoxin treated SH-SY5Y neuroblastoma cells are viable *in-vitro* mitochondrial dysfunction models to study neurodegeneration. LC-MS/MS is a powerful method to quantify protein expression changes and can help understand pathways involved in neurodegenerative mechanisms. Although mitochondrial dysfunction generated by inhibiting ETC, different ETC complex inhibitions cause a differentiation between groups. Alpha-enolase, gamma enolase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 14-3-3 proteins, acyl-CoA dehydrogenase, DJ-1, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, elongation factors and cytoskeletal proteins showed alterations that we think that may be involved in neurodegeneration. These proteins also can be considered as biomarkers.

**Key Words:** nanoUPLC-ESI-qTOF, Shotgun proteomics, Neurodegeneration

## TEŞEKKÜR VE İTHAF

Bu tezi, ömrüm boyunca sevgisini derinden hissettirmiş, her konuda desteğini ve yardımını benden esirgememiş ve bir ömür boyu yanımda olacağını bildiğim, abim  
Dr. Ahmet Tarık Baykal'a ithaf ediyorum.

Kocaeli Üniversitesi ve TÜBİTAK ortak yüksek lisans programını oluőturmada emeği bulunan ve bize bu programda yer alma fırsatı tanıyan tüm yetkililere,  
Yardımları ve içtenliği için tez danışmanım Doç. Dr. Murat Kasap'a,  
Sevgi, hoşgörü ve desteklerinden dolayı aileme,  
Hayatımı varlıklarıyla güzelleőtiren dostlarıma,  
Eğitimim için vaktini ayıran tüm hocalarıma,  
Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR VE İTHAF	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	2
1.2. Hipotezler	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nörodejenerasyon, Nörodejeneratif Hastalıklar ve Mitokondriyal Disfonksiyon	4
2.1.1. Alzheimer Hastalığı ve Mitokondriyal Disfonksiyon	6
2.1.1.1. Alzheimer Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon Modeli: Soydum Azit	7
2.1.2. Parkinson Hastalığı ve Mitokondriyal Disfonksiyon	8
2.1.2.1. Parkinson Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon Modeli: MPTP	9
2.1.3. Huntington Hastalığı ve Mitokondriyal Disfonksiyon	10
2.1.3.1. Huntington Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon Modeli: 3-NP	11
2.1.4. Diğer Mitokondriyal Disfonksiyon Modelleri: Antimisin A ve Oligomisin	11
2.1.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri	12
2.1.6. Etiketsiz Karşılaştırmalı Protein Ekspresyon Analiz Yöntemi	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Hücre Kültürü ve Elektron Taşıma Zinciri İnhibisyonu	18
3.2. Hücreden Protein Ekstraksiyonu, Konsantrasyon Tayini ve Triptik Peptitlerin Hazırlanması	18
3.3. Kromatografik Ayırıştırma	20
3.3.1. 1D Ters Faz Kromatografisi (RP)	21
3.4. MS ve MS/MS Deney Kurulumu	22
3.4.1. MS <sup>E</sup> Deney Kurulumu	22
3.5. Karşılaştırmalı Grup Analizi	22
3.5.1. PLGS Ekspresyon <sup>E</sup> Protein Ekspresyon Analizi	23
3.6. İstatiksel Analiz ve Biyoinformatik Yazılımlar	23
3.6.1. ANOVA ve t-test	23
3.6.2. Scaffold 3 Taramaları	24
3.6.3. Temel Bileşenler Analizi	24
3.7. Sınırlılıklar	25
4. BULGULAR	26
4.1. LC-MS/MS Sonuçları	26
4.2. PLGS Sonuçları	26
4.2.1. Kontrol-Sodyum azit Karşılaştırmaları	26
4.2.2. Kontrol-3-NP Karşılaştırmaları	28



4.2.3. Kontrol-MPTP Karşılaştırmaları	33
4.2.4. Kontrol-Antimisin A Karşılaştırmaları	34
4.2.5. Kontrol-Oligomisin Karşılaştırmaları	37
4.3. PCA Sonuçları	40
4.3.1. PLS-DA Kullanarak Tüm Grup Farklılıklarının Belirlenmesi	40
4.3.1.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)	41
4.3.1.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)	42
4.3.1.3. Ekstrem Gözlemlerin Belirlenmesi (Hotellings T2)	43
4.3.1.4. X Değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi	43
4.3.1.5. Tahmini Değişken Önemi (VIP-Variable Importance-In Projection-)	44
4.3.1.6. Goodness of Fit Grafiği	45
4.3.1.7. Sınıflandırma Özeti	45
4.3.2. PLS-DA Kullanarak Kontrol-Soydum Azit Gruplarının Karşılaştırılması	46
4.3.2.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)	46
4.3.2.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)	47
4.3.2.3. X Değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi	47
4.3.2.4. Tahmini Değişken Önemi (VIP)	48
4.3.3. PLS-DA Kullanarak Kontrol-MPTP Gruplarının Karşılaştırılması	49
4.3.3.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)	49
4.3.3.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)	50
4.3.3.3. X Değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi	50
4.3.3.4. Tahmini Değişken Önemi (VIP)	51
4.3.4. PLS-DA Kullanarak Kontrol-3-NP Gruplarının Karşılaştırılması	52
4.3.4.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)	52
4.3.4.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)	53
4.3.4.3. X Değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi	53
4.3.4.4. Tahmini Değişken Önemi (VIP)	54
4.3.5. PLS-DA Kullanarak Kontrol-Antimisin A Gruplarının Karşılaştırılması	55
4.3.5.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)	55
4.3.5.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)	56
4.3.5.3. X Değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi	56
4.3.5.4. Tahmini Değişken Önemi (VIP)	57
4.3.6. PLS-DA Kullanarak Kontrol-Oligomisin Gruplarının Karşılaştırılması	58
4.3.6.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)	58
4.3.6.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)	59
4.3.6.3. X Değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi	59
4.3.6.4. Tahmini Değişken Önemi (VIP)	60
4.4. Scaffold Sonuçları	61
4.5. IPA Yolak Analizi Sonuçları	66
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR DİZİNİ	86
ÖZGEÇMİŞ	96

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- 1DRP: Tek boyutlu ters faz kromatografisi  
3-NP: 3-Nitropropionik Asit  
ADH: Alkol dehidrogenaz  
AH: Alzheimer Hastalığı  
ANOVA: Değişken Analizi (Analysis of Variance)  
AÖP: Amiloid öncül protein  
apoE: Apolipoprotein E  
A $\beta$ : Amiloid beta  
BOS: Beyin omurilik sıvısı  
COX: Sitokrom c oksidaz  
DTT: Ditiotreitol  
ESI-QTOF: Elektrosprey iyonizasyon-kuadropol uçuş zamanı  
ETS: Elektron taşıma sistemi  
HH: Huntington hastalığı  
IAA: Iodoasetamit  
IPA: Ingeunity Pathway Analysis  
LC-MS: Sıvı kromatografili kütle spektroskopisi  
MPP<sup>+</sup>: 1-metil-4fenilpridinium  
MPTP: 1-metil-4fenil-2, 3, 6-tetra hidropiridin  
MS: Kütle spektroskopisi  
NO: Nitrik oksit  
PCA: Temel bileşen analizi (Principle component analysis)  
PH: Parkinson hastalığı  
RNT: Reaktif nitrojen türleri  
ROT: Reaktif oksijen türleri  
RP: Ters faz (reverse phase)  
TFA: Trifloroasetik asit  
TOF: Uçuş zamanı (Time of flight)  
UPLC: Nanoakış sıvı kromatografisi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Elektron taşıma sistemindeki kompleksler ( I, II, III, IV, V ).....	5
Şekil 2.2. Kütle spektrometresi ile protein analizi.....	13
Şekil 2.3. a.Peptitlerin belirlenmesi. b. Örneğe ait peptitlerin kromotogram ile gösterimi. c. Karşılaştırmalı analizlerde iki grubu ait iki örneğin kromatogramlarının üst üste çakıştırılarak karşılaştırılması. d. Karşılaştırma sonucu elde edilen protein ifade farklılıklarının logaritmik gösterimi.....	14
Şekil 3.1. LC-MS/MS Cihazı.....	21
Şekil 3.2. a. Scaffold 3 Gen Ontoloji. b. PCA Analizi.....	24
Şekil 4.1. Scores plot grafiğinde tüm grupların gösterimi.....	41
Şekil 4.2. Loadings plot grafiğinde tüm grupların gösterimi.....	42
Şekil 4.3. Hotelling's T2 dağılım grafiği ile tüm grupların gösterimi.....	43
Şekil 4.4. Loadings bi plot grafiği (tüm gruplar için).....	43
Şekil 4.5. Tüm gruplar için tahmini değişken önemi grafiği.....	44
Şekil 4.6. Goodness of fit grafiği (tüm gruplar için).....	45
Şekil 4.7. Scores plot grafiğinde Kontrol ve Soydum azit gruplarının gösterimi.....	46
Şekil 4.8. Loadings plot grafiğinde Kontrol ve Soydum azit gruplarının gösterimi.....	47
Şekil 4.9. Loadings bi plot grafiği (Kontrol ve Sodyum azit grubu için).....	47
Şekil 4.10. Kontrol ve Soydum azit grubu için tahmini değişken önemi grafiği.....	48
Şekil 4.11. Scores plot grafiğinde Kontrol ve MPTP gruplarının gösterimi.....	49
Şekil 4.12. Loadings plot grafiğinde Kontrol ve MPTP gruplarının gösterimi.....	50
Şekil 4.13. Loadings bi plot grafiği (Kontrol ve Sodyum azit grubu için).....	50
Şekil 4.14. Kontrol ve Soydum azit grubu için tahmini değişken önemi grafiği.....	51
Şekil 4.15. 3-NP ve Kontrol grubu farklılıklarının scores-plot ile gösterimi.....	52
Şekil 4.16. Loadings plot grafiğinde Kontrol ve 3-NP gruplarının gösterimi.....	53
Şekil 4.17. Loadings bi plot grafiği (Kontrol ve 3-NP grubu için).....	53
Şekil 4.18. Kontrol ve 3-NP grubu için tahmini değişken önemi grafiği.....	54
Şekil 4.19. Scores plot grafiğinde Antimisin A ve Kontrol gruplarının gösterimi.....	55
Şekil 4.20. Loadings plot grafiğinde Kontrol ve Antimisin A gruplarının gösterimi.....	56
Şekil 4.21. Loadings bi plot grafiği (Kontrol ve Antimisin A grubu için).....	56
Şekil 4.22. Kontrol ve Antimisin A grubu için tahmini değişken önemi grafiği.....	57
Şekil 4.23. Oligomisin ve Kontrol grubu farklılıklarının scores plot ile gösterimi.....	58
Şekil 4.24. Loadings plot grafiğinde Kontrol ve Oligomisin gruplarının gösterimi.....	59

<b>Şekil 4.25.</b> Loadings bi plot grafiği (Kontrol ve Oligomisin grubu için).....	59
<b>Şekil 4.26.</b> Kontrol ve Antimisin A grubu için tahmini değişken önemi grafiği.....	60
<b>Şekil 4.27.</b> Scaffold tablosu 1, 2, 3, 4.....	61
<b>Şekil 4.28.</b> Proteinlerin hücredeki yerine göre dağılımı.....	65
<b>Şekil 4.29.</b> Proteinlerin biyolojik görevlerine göre dağılımı.....	65
<b>Şekil 4.30.</b> Proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımı.....	65
<b>Şekil 4.31.</b> Tüm protein birbirleriyle ilişkisinin şematik gösterimi.....	66
<b>Şekil 4.32.</b> Hastalık bağlantılı protein network şeması.....	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan gereçler.....	17
Çizelge.4.1. Kontrol ve Sodyum azit grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu...	26
Çizelge.4.2. Kontrol ve 3-NP grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.....	28
Çizelge.4.3. Kontrol ve MPTP grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.....	33
Çizelge 4.4. Kontrol ve Antimisin A grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu..	34
Çizelge 4.5. Kontrol ve Oligomisin grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu....	37
Çizelge 4.6. Tüm gruplar için PLS-DA data tanım özeti.....	38
Çizelge 4.7. Sınıflandırma özeti tablosu.....	45
Çizelge 4.8. Kontrol ve Soydum azit için PLS-DA data tanım özeti.....	46
Çizelge 4.9. Kontrol ve MPTP için PLS-DA data tanım özeti.....	49
Çizelge 4.10. Kontrol ve 3-NP için PLS-DA data tanım özeti.....	52
Çizelge 4.11. Kontrol ve Antimisin A için PLS-DA data tanım özeti.....	55
Çizelge 4.12. Kontrol ve Oligomisin için PLS-DA data tanım özeti.....	58
Çizelge 5.1. Apex 3D özellikleri ve değerleri.....	70
Çizelge 5.2. Databank search query.....	71

## 1. GİRİŞ

Tıptaki ilerlemelere ve yaşam seviyesindeki gelişmelere paralel olarak ortalama yaşam süreleri uzamaktadır (Wanjek, 2002). Artan yaşlı nüfusu ile beraber daha ileri yaşlarda kendini gösteren nörodejeneratif hastalıklar daha büyük kesimleri etkilemekte ve ülkelerin ekonomisine daha fazla oranda yük bindirmektedir. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre sadece Alzheimer hastalığı bile dünya çapında 24 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir ve 2050 yılında her 85 kişiden birine AH teşhisi konulacağı tahmin edilmektedir. 65 yaş üstü nörodejeneratif hastalıkların prevalansının ciddi oranlarda artış göstereceği düşünülmektedir (Montine, 2011).

Nörodejeneratif hastalıkların 600'den fazla çeşidi bulunmaktadır ve aynı anda birden fazla dejeneratif bozukluk birden görülebilmektedir (Uitti et al., 1995; Feany et al., 1996; Kurosinski et al., 2002). Örnek olarak Alzheimer hastalarında, Parkinson hastalığı semptomları da saptanabilmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklar; genetik mutasyonlar, çevresel faktörler, metabolik bozukluklar gibi birçok etkenden kaynaklanabilmektedir. Çok karmaşık hücrel mekanizmaların rol oynadığı bu tür hastalıkların tedavisinde kullanılacak etkin tedaviler henüz geliştirilememiştir. Özellikle erken teşhisinin yapılması, dejenerasyonun gelişimini durdurabilecek yöntemler bilinmemektedir. Sadece ortaya çıkan semptomları bertaraf edebilecek ilaçlar kullanılmaktadır (Pleasure, 2010).

Günümüzde nörodejenerasyonun tedavisinin henüz olmamasının nedeni karmaşık mekanizmaların tamamıyla aydınlatılamamasıdır. Bu nedenle de hücrel yollarda meydana gelen değişikliklerin haritalanması ve aydınlatılması gerekmektedir. Son on yıl içerisinde Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi hastalıkların çalışılması için, gerek *in-vitro* gerekse de klinik örnekler kullanılarak birçok proteomik çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda farklı protein ifade farklılıkları gösterilmiştir. Günümüze dek yapılan çalışmalarda 2D-Jel elektroforez olarak bilinen proteomik yaklaşım, yöntemin ucuzluğundan dolayı tercih edilmiş fakat bu yaklaşımda yeterli sayıda protein tanımlaması gerçekleştirilememiştir. Özellikle, istatistiksel olarak anlamlı protein ifade farklılıklarının gösterilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte büyük örnek gruplarının analizinde pratik olmaktan çıkışı, uygulanabilirliğini imkansız kılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmamızda 2D-temelli proteomik yaklaşım yerine LC-MS/MS temelli yaklaşım kullandık.

## 1.1. Amaç ve Kapsam

Nörodejeneratif hastalıklar alanında yapılan çalışmalarda belirtildiği üzere, nörodejenerasyona sebebiyet veren en önemli etkenlerden biri mitokondriyal bozukluklardır (Witte et al., 2010). Alzheimer hastalığında mitokondriyal kompleks IV'de, Parkinson hastalığında kompleks I'de, Huntington hastalığında ise kompleks II'de spesifik bozunmalar belirlenmiştir.

Bizim bu çalışmadaki amacımız, hücre modeli kullanarak oluşturduğumuz mitokondriyal bozuklukları, proteomik yaklaşım kullanarak incelemek, karşılaştırmak ve anlamaktı. Bu amaçla, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin elektron taşıma sistemindeki (ETS) komplekslerini, bu komplekslere özgü inhibitörler ile inhibe ederek Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığının mitokondriyal disfonksiyon hücre modellerini ürettik. Bu modellerde inhibisyon sonrasında reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) oluşmakta ve ATP üretimi azalmaktadır.

Gruplardaki proteomun belirlenmesi için, oluşturulan hücre modellerinden total protein özütleri hazırlandı ve protein ifade farklılıkları LC-ESI-qTOF-MS/MS yöntemi ile belirlendi. Nörotoksin etkileşimi sonrasında hangi yolların etkilendiğini ve tanımlanan proteinlerin nörodejenerasyondaki rollerini bulmak amaçlandı. Elde edilen veriler nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarını aydınlatılabilmek için kullanıldı.

## 1.2. Hipotezler

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde ETS'nin, komplekslere özgü nörotoksinler ile bloke edilmesi sonucu oksidatif stres artmakta, apoptoz yolları ve protein katlanması dahil birçok sinyal iletişim yolağı bu streten etkilenmektedir. İnhibisyon sonucu hücre içi ATP sentezi de yavaşlamaktadır. Bu durumla baş edebilmek için hücrel yollarda farklılaşmalar başlamaktadır.

Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıklarının hepsinde mitokondriyal bozukluklar görülmektedir. Oluşturduğumuz *in-vitro* mitokondriyal disfonksiyon hücre modellerinin hepsinde oksidatif stres ETS'nin bloke edilmesi ile oluşmakta fakat oksidatif stres sonrası oluşan ROT ve RNT, farklı gruplarda farklı yolların etkilenmesine neden olmaktadır.

Yaptığımız LC-MS/MS proteomik çalışmaları ile hücrel modellerdeki protein ifade farklılıklarını analiz etmeyi, *in-vitro* ortamda tanımladığımız proteinler ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişkiyi bulabilmeyi hedefledik.

Hipotezimize göre mitokondriyal disfonksiyon, ETS'nin bloke edilmesi ile başlamış olsa da elektron taşıma sistemi blokajı ajanları ile oluşturulan grupların hücrel

mekanizmalarında farklı değişimlere neden olabileceği ve bu değişimlerin nörodejenerasyonda mitokondriyal disfonksiyonun farklı rollerini açıklamak için kullanılabileceğini varsaydık. Farklılıkların kaynağı olan proteinleri tanımlamak için LC-MS/MS proteomik analizini uygun bir yöntem olarak düşündük ve nörotoksin uygulanmış SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerini, *in-vitro* mitokondriyal disfonksiyon modeli olarak, nörodejeneratif çalışmalar için tercih ettik.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nörodejenerasyon, Nörodejeneratif Hastalıklar ve Mitokondriyal Disfonksiyon

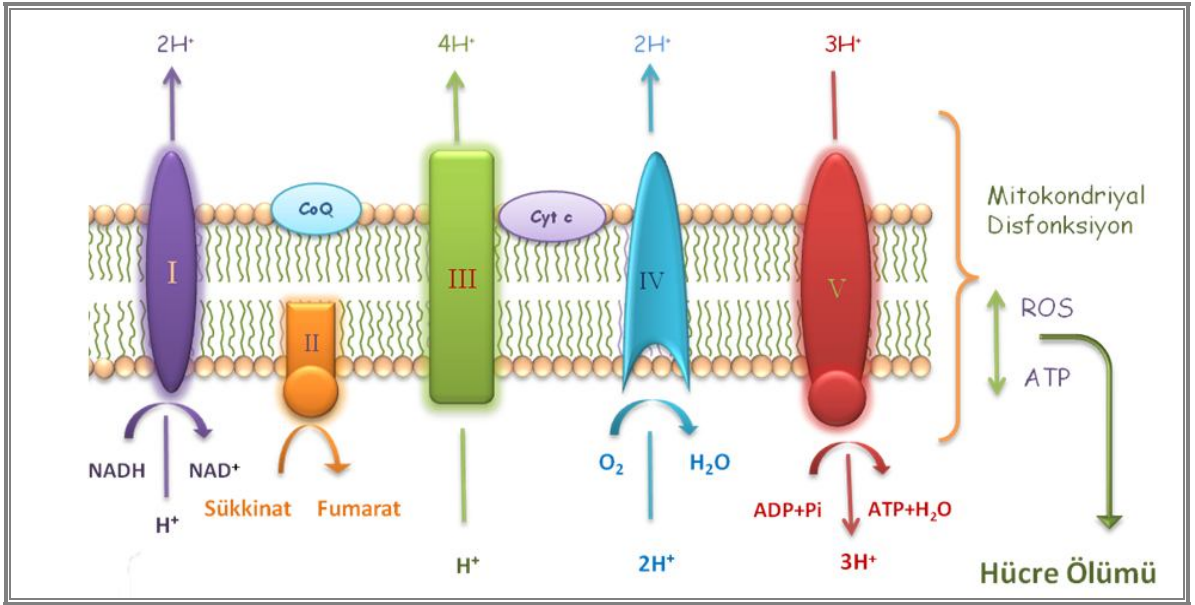
Nörodejenerasyon, nöronların yapısal ve fonksiyonel olarak işlevlerini yitirmeye başlayıp, nöron ölümüyle son bulan, ilerleyici şekilde devam eden bozukluklar için kullanılan bir terimdir. Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH) ve Huntington hastalığı (HH) gibi birçok nörodejeneratif hastalık, bu nörodejenerasyon süreci sonucu oluşmaktadır. Araştırmalar arttıkça, birbirinden farklı olarak seyreden bu hastalıkların hücre altı düzeyde birçok ortak noktaya sahip olduğu görülmüştür.

Çoğu nörodejeneratif hastalık nöronal bağlantılara, nöronal esnekliğe ve hücre ölümü sinyal yollarına olumsuz etki eden yanlış katlanmış proteinlerin toplanmasıyla karakterize edilebilir (Bence et al., 2001). PH'deki  $\alpha$ -sinüklein ve Parkin; AH'deki amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) ve tau, dejenere olma halindeki beyinde, anormal olarak katlanmış protein kümelenmelerine örnektir. PH'de sitoplazmada belirlenen, Lewy cisimcikleri denen inklüzyonlar gözlemlenmiştir. AH'li beyinlerde ise hücre içinde hiperfosforile olmuş tau içeren nörofibriler yumaklar ile A $\beta$  içeren hücre dışı plaklar bulunmaktadır. Diğer protein kümelenmesi gözlemlenen hastalıklar HH, amyotrofik lateral skleroz ve prion hastalığı olarak örnek gösterilebilir. Bu hastalıklar, beyinde protein kümelenmesi olarak ortaya çıktığından, 'konformasyonel hastalıklar' olarak da anılırlar (Kopido and Ron, 2000).

Proteinlerin yanlış katlanmalar ve kümelenmelerine temel olarak iki durum sebep olabilir. Bunlardan birincisi hastalıkla bağlantılı genlerden kodlanmış bir proteinde meydana gelen mutasyonlardır. İkincisi ise sporadik durumlara sebebiyet veren, nitroztatif ve oksidatif strese maruz kalmış olan proteinlerdeki translasyon sonrası değişimlerdir (Zaung ve Kaufman, 2006). Bundan dolayı bir nöronda oksidatif ve nitrosatif strese neden olacak durumların nörodejenerasyon mekanizmalarından sorumlu olduğu düşünülmekte ve bu durumların oluşum mekanizması henüz tamamen aydınlatılmadığından, çalışmalara devam edilmektedir (Nakamura ve Lipton, 2009).

Nöronlar metabolik olarak aktif hücreler olduklarından yüksek miktarda enerji ihtiyacı duyarlar. Mitokondri, oksidatif fosforilasyon ile adenin-tri-fosfat (ATP) sentezinde görev aldığından dolayı, hücreler için enerji sentez merkezi olarak bilinir. Sadece enerji sentez merkezi olmasından ziyade; aracı metabolizma, kalsiyum homeostazisi, hücre çoğalması, hücre büyümesi ve apoptoz gibi birçok hücre fonksiyon için kritik önemi vardır (Han et al., 2011). Mitokondriyal disfonksiyon sürecinde yukarıda bahsedilen hücresel düzenler bozulur ve hücre apoptotik ya da nekrotik yola girer.

Ökaryotik hücrelerde enerji, temel olarak organik bileşiklerin oksidatif fosforilasyonu ile elde edilir. Oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesi için mitokondrinin iç zarının iki tarafında bir potansiyel fark oluşturulması gerekir. Elektron taşıma sistemi (ETS), bu potansiyel farkı NADH ve FADH<sub>2</sub>'nin verdiği yüksek enerjili elektronlardan aldığı enerjiyle, protonları (H<sup>+</sup>) mitokondri matriksinden zarlar arası bölgeye taşıyarak sağlar. ETS elemanları 5 tanedir; kompleks I, kompleks II, kompleks III, kompleks IV ve kompleks V (Şekil 2.1). Bunlardan her hangi birinin çeşitli sebepler sonucu inhibe olması durumunda, mitokondriyal denge bozularak disfonksiyona uğrar. İlerki bölümlerde de bahsedileceği üzere, farklı komplekslerin bozulması spesifik olarak belirli hastalıklarda gözlemiştir.



**Şekil 2.1.** Elektron taşıma sistemindeki kompleksler ( I, II, III, IV, V )

Birçok nörodejeneratif hastalıkta nöron hasarına ve ölümüne sebebiyet verebilecek olay, ROT ve RNT'lerin aşırı miktarda oluşmasıdır (Emerit et al., 2004; Lin and Beal, 2006). Nitrik oksidin (NO) fazlaca üretilmesinden kaynaklanan nitrozatif stres birikimi nöronal bozukluk ve ölüme sebebiyet veren potansiyel bir faktör olarak görülmektedir (Lipton, 2006). Şu ana kadar nörodejeneratif hastalıklar için düşünülen en büyük risk faktörü yaşlanma olarak kabul edilmektedir (Evans et al., 1989). Yaşlanma sürecinde mitokondrinin, mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) mutasyonların ve ROT'ların birikimiyle, yaşlanmaya en çok katkıda olan yapı olduğu düşünülmektedir. Beyindeki sitokrom oksidaz aktivitesinin, yaşlanmayla beraber biriken mtDNA'daki nokta mutasyonlarıyla ters orantılı olduğunun bulunması da mitokondriyal bozukluk ve nörodejenerasyonun ilişkili olduğunu gösteren bir başka kanıttır (Lin et al., 2002).

### 2.1.1. Alzheimer Hastalığı ve Mitokondriyal Disfonksiyon

AH, nöronal hasar, bunama ve sonucunda da ölüm olan, yaşa bağlı olarak en yaygın (Selkoe2001; Mattson 2004) ve en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. (Evans et al., 1989). 1990'ların başından bu yana, AH'nin bazı formlarının, amiloid öncül protein (AÖP) kodlayan gende, presenilin 1 ve 2'de veya apolipoprotein E'nin (apoE) bazı allellerinde oluşmuş mutant genlerin kalıtımıyla ortaya çıktığı bilinmektedir (Corder et al., 1993; Goate et al., 1991). A $\beta$ , AÖP'nin  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz adı verilen bir grup enzim kompleksleriyle ardışık kesilmeleri sonucu oluşan proteolitik bir üründür (Vassar et al 1999; Kimberly and Wolfe 2003). AH, temel olarak hidrofobik 40-42 aminoasit uzunluğunda amiloid-beta peptidlerden oluşan (A $\beta$ ) (Glennner and Wong 1984) ekstraselüler amiloid plaklarıyla ve hiperfosforile tau proteinlerinin kümelenmesi sonucu oluşan intraselüler nörofibriler düğümler ile karakterizedir (Nukina and Ihara 1986). Bu hastalıkta neden nöronal hücre ölümü olduğunu açıklayan birkaç farklı teori vardır. Bunlar arasında en önemlisi kademeli amiloid hipotezidir (Hardy and Higgins 1992). Bu teoriye göre, bozulmuş A $\beta$  metabolizması, A $\beta$  peptid agregasyonunu tetikler ve sinaptik zarara, nörofibriler düğümlere, inflamatuvar cevaba, artmış oksidatif strese, hücre ölümüne ve sonuç olarak da AH'ye neden olur. Fakat bu fikir daha sonraları farklılaşmıştır. Özellikle, gittikçe artan çalışmaların sunduklarına göre, AH'nin iyi tanımlanmış nöropatolojik semptomlarının yanında, Ca homeostazisinin bozulması, A $\beta$ 'lerin salgı yollarında birikmesi, mitokondriyal disfonksiyona neden olan mitokondride A $\beta$  varlığı ve artmış reaktif oksijen türleri gibi intraselüler lezyonlarla bağlantılı olduğuna inanılmaktadır (Manfredi and Beal 2000; Gouras et al. 2005; Reddy and Beal 2005; Anandatheerthavarada and Devi 2007; Reddy and Beal 2008). ATP üreten ve hücre ölümünde anahtar düzenleyici olan mitokondri, bu yüzden AH ile ilişkilendirilmiştir. İki mitokondriyal protein olan A $\beta$ -binding alkol dehidrogenaz ve siklofilin D'nin bu nörodejeneratif hastalıkla bağlantılı olduğu savunulmuştur (Lustbader et al. 2004; Du et al. 2008).

Beynin, nörotransmisyon için yüksek miktarda enerjiye ihtiyacı vardır. Bu yüzden mitokondriler sinapslarda, enerji üretim amacıyla çok miktarda bulunmaktadır. Mitokondri sayılarında azalma ve azalmış enerji metabolizması da AH'li beyinlerde en erken teşhis edilen bozulmalardır (Hirai et al. 2001; Mosconi et al. 2005). AH'li kişilerin beyinlerinde frontal ve temporal loblardaki piruvat dehidrogenaz ve alfa-ketoglutarat dehidrogenazın azalmış aktivitesi gösterilmiştir (Sorbi et al. 1983; Gibson et al. 1998). Ayrıca elektron transfer zincirindeki sitokrom c oksidazın da aktivitesinin AH taşıyan beyinlerde azaldığı

gösterilmiştir (Kish et al., 1999). Tüm enzimlerin fonksiyonlarının A $\beta$  varlığında bozunmaya uğramasından dolayı, kademeli amiloid teorisi ve mitokondriyal disfonksiyon arasında bir ilişki olduğu önerilmiştir (Casley et al., 2002).

Proteomik çalışmalarda hem AÖP hem de tau işlenmesinde, konformasyonel değişimleri katalizleyen bir protein olan prolil izomeraz PIN1'in oksidatif strese karşı hassas bir molekül olduğu bulunmuştur (Pastorino et al., 2006). Oksidatif hasarın hem AH biyobelirteci olduğu hem de A $\beta$  toksisitesinde rol oynadığı belirlenmiştir. AH kaynaklı bunamaya ilişkin *in-vivo* çalışmalarda beyin belli bölgelerinde metabolizmal düşüş görülmüş (Minoshima et al., 1997; Vander Borgh et al., 1997), ölüm sonrası incelemelerde ise mitokondriyal enzim aktivitelerinde bozukluk gösterilmiştir (Gibson et al., 1998). AH hastalarının beyin ve diğer bazı organlarından alınan mtDNA'nın, mtDNA bulundurmeyen hücre hattına transferiyle oluşan hibridlerde, solunum enzimlerinin aktivitelerinde düşüş görülmesi, mitokondriyal disfonksiyonun AH'de önemli bir role sahip olduğunun bir başka kanıtı olmuştur (Ito et al., 1999).

#### **2.1.1.1. Alzheimer Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon Modeli: Sodyum Azit**

İnsan beyni üzerinde yapılan ilk otopsi çalışmalarında, AH olan kişilerin parietal ve temporal kortekslerinden alınan örneklerde, piruvat dehidrogenaz kompleksinde bir bozukluk olduğu görülmüştür (Perry et al., 1980). Yine aynı bölgelerde yapılan başka bir çalışmada Krebs döngüsündeki a-ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir (Gibson et al., 1998; Blass and Brown, 2000). AH'de gözlemlenen en tutarlı bozukluklardan biri ise elektron taşıma zincirinde taşıyıcı olan sitokrom c oksidaz'da (COX) görülen bozukluktur (Castellani et al., 2002).

Sodyum azit'in mitokondriyal enerji sentezinde bozukluğa ve nöron ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (Zhang et al., 2000). Sodyum azitin, ETS kompleksinde seçici olarak COX üzerinde (Kompleks IV) inhibisyon etkisinin olduğu da kanıtlanmıştır (Bennett et al., 2002). AH'li kişiler ve normal yaşlı bireyler arasında, kompleks I+II, kompleks II+III, kompleks IV, sükkinat dehidrogenaz ve sitrat sentaz; frontal korteks, temporal korteks, hipokampus ve serebellumda karşılaştırılmış, en belirgin sonuç COX aktivitesindeki düşüş olarak belirlenmiş ve anatomik spesifite görülmüştür. Diğer komplekslerde ciddi bir değişim gözlenmemiştir (Maurer et al., 2000). Bu da sodyum azit'in AH modeli olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. COX inhibisyonlu AH hayvan modelleri yapılarak da bu fikrin geçerliliği gösterilmiştir (Bennett et al., 1992).

### 2.1.2. Parkinson Hastalığı ve Mitokondriyal Disfonksiyon

PH en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve 60 yaş üstündeki kişilerin ~%1'ini etkiler (Abou-Sleiman, 2006). Dünyada yaklaşık 6 milyon insanın PH'li olduğu bilinmekte ve bu rakama her yıl 100000-150000 kişi eklenmektedir (Kasap ve Akpınar, 2011). Hastalığın görünümü ilerleyici bir hareket kaybı şeklindedir. Hastalık klinik olarak; rijidite (sertlik), dinlenme halindeki titreme, hareketlerde yavaşlama ve vücudun duruş şeklinde instabilite olarak tanımlanır. Patolojik nitelikleri, substantia nigra pars kompakta denilen bölgedeki dopaminerjik nöronların kaybı ve intrasitoplazmik inklüzyonlar olan, fibriler  $\alpha$ -sinüklein'den oluşan Lewy cisimcikleridir (Spillantini et al., 1997). Hem kimyasal hem de genetik kanıtların öne sunduklarına göre mitokondriyal disfonksiyon PH ile bağlantılıdır (Chen and Chan, 2009). PH hastalarında substantia nigradan alınan örneklerde mitokondride kompleks I'de bir bozukluk olduğu gösterilmiştir (Mann et al., 1994).

PH'nin etiyopatogenezine ilişkin ilk fikirler 1997'de  $\alpha$ -sinüklein'deki mutasyonlar (Polymeropoulos et al., 1997) ve bir yıl sonrasında da *parkin* mutasyonlarının (Kitada et al., 1998) belirlenmesiyle oluştu. Aynı yıl içinde  $\alpha$ -sinüklein'in Lewy cisimciklerinin ana yapısı olduğunun bulunmasıyla,  $\alpha$ -sinüklein'in agregat oluşumunda temel ve tek sebep olduğu düşünülmüş fakat daha sonra oksidatif stres ve  $\alpha$ -sinüklein kümelenmesi arasında sıkı bir bağlantı bulunmasıyla bu fikir değişmiştir (Convey et al., 2001). PH için otozomal resesif, erken başlangıç geni ve olası redoks sensörü olan *DJI* 'de (Bonifati et al., 2003), fosfataz ve tensin homoloğu indüklü kinaz 1'de (PTEN indüklü kinaz 1) mutasyonların keşfi (Valente et al., 2004), oksidatif stresin ve mitokondriyal disfonksiyonun PH patogenezinde birincil role sahip olduğu fikrini güçlendirmiştir. Yine de bu genlerdeki mutasyonların nörodejenerasyona nasıl neden oldukları henüz belirlenememiştir.

Son 3, 4 yıl içinde *Pink1* ve *Parkin* kalıtsal olan PH için tanımlanmıştır (Dodson and Guo, 2007). İnsan dopaminerjik nöronlarında veya primer fare nöronu kültürlerinde, *Pink1*'deki bozulmanın bazal canlılığı etkilediği ve bununla beraber mitokondriyal anormalliklerin meydana geldiği görülmüştür (Wood-Kaczmar et al., 2008). İdiyopatik ve semptom-öncesi PH'ye sahip olan kişilerin substantia nigralarında yapılan çalışmalarda kompleks I'de bozulma ve glutation azalması, kompleks I inhibisyonu ile oksidatif stresin birbiriyle alakalı ve eş zamanlı meydana gelen olaylar olduğunu göstermiştir.

### 2.1.2.1. Parkinson Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon Modeli: 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetra hidropiridin (MPTP)

Mitokondriyal disfonksiyonun PH'deki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Bu fikrin ortaya ilk çıkışı, bir toksin olan MPTP kullanmaya bağımlı olan kişilerde hızlı ve geri dönüşümsüz biçimde PH'ye özgü semptomların oluştuğunun gözlenmesiydi (Langston et al., 1983). Daha sonraki çalışmalarda, MPTP'nin glial monoamine oksidaz B tarafından, MPTP'nin aktif bir metaboliti olan 1-metil-4fenilpiridinium'a (MPP<sup>+</sup>) dönüştüğü ve bu metabolitin mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki kompleks I' i inhibe ettiği ayrıca dopamin taşınımı için bir substrat olarak davrandığı öne sürüldü. Bu nedenle, bu nörotoksin dopaminerjik nöronlarda birikmekte ve bu nöronlarda kompleks I' i inhibe edip, nöronal toksisiteye ve nihayetinde nöron ölümüne sebep olmaktadır (Nicklas et al., 1985). MPTP, serbest radikallerin ve oksidatif stresin oluşumuna, ATP üretiminde düşüşe, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasına, ekzitotoksisiteye ve nitrik oksit bağlantılı hücrel hasara sebebiyet vermektedir. MPP<sup>+</sup>'nin, dopamin salınımını daha da arttırdığı bunun da daha fazla oksidatif strese sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Fiskum et al., 2003).

Kompleks I'in inhibisyonu sadece mitokondriyal ATP üretiminde düşüşe sebep olmaz, süperoksit radikallerin oluşumuna ve lipid peroksidasyon reaksiyonlarına da neden olur (Takayanagi et al., 1980; Kang et al., 1983). MPP<sup>+</sup>'nin kalp submitokondriyal partiküllerinde O<sub>2</sub> radikali oluşumunu stimule ettiği ve lipid peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir (Hasegawa et al., 1990). Oksijen radikalleri ve intraselüler ATP kaybı MPP<sup>+</sup>'nin hücre ölümüne sebebiyet vermesini açıklıyor. Bununla beraber süperoksit dismutaz -h (+) kullanarak (süperoksiti O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye çeviren enzim) bakır/çinko tip süperoksit dismutazı overeksprese eden transgenik fareler (Przedborski et al., 1992) ve nöronal nitrik oksit sentaz yoksunluğu olan mutant fareler (Przedborski et al., 1996), MPTP indüklü nörotoksisiteye karşı koruma sağlamışlardır. Bu yüzden MPP<sup>+</sup>'nin *in-vivo* ortamda, mitokondride oksidatif stres ajanı olarak faaliyet gördüğü öne sürülmüştür.

Dünya çapındaki birçok farklı grup tarafından yapılan çalışmalarda, PH'ye sahip olan kişilerin substantia nigra, iskelet kası ve plateletlerinden alınan örneklerde, kompleks I'de bir azalma olduğu görülmüştür (Patrick et al., 2006). Kompleks I'in sağladığı bu toksisite modeli ile, aynı zamanda oksidatif stresin de sağlanabileceği gösterilmiştir (Sherer et al., 2003). MPTP, PH semptomlarına neden olmasından dolayı, birçok insan ve hayvan hastalık modelleri oluşturmak için kullanılmıştır (Dauer and Przedborski, 2003).

### 2.1.3. Huntington Hastalığı ve Mitokondriyal Disfonksiyon

HH otozomal dominant olarak kalıtılan, motor fonksiyonların ilerleyici bir şekilde bozulması, duygusal rahatsızlık, bunama ve kilo kaybı ile ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır (Kremer et al., 1994). Motor semptomlar oluştuğunda, hastalanmış kişi fonksiyonel bozulmalardan dolayı kendine yetemez duruma gelir ve bundan sonraki 15-20 yıl içinde bu semptomların şiddetli fiziksel ve zihinsel bozulmalara dönüşmesi sürecinde gittikçe artan ilgi ve denetime ihtiyaç duyar (Hersch ve Rosas, 2008). HH için US Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış tek ilaç olan tetrabenazin, HH'de görülen istem dışı hareketleri (chorea) önlemeye yardımcı fakat hastalığın gelişim sürecini durdurma konusunda herhangi bir etkiye sahip değildir (Poon et al., 2010).

HH' ye ait genetik lokus haritalandıktan on yıl kadar sonra bu hastalıkta etkilenmiş olan gen (IT15) bulunmuştur (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Bu gen tarafından üretilen huntingtin (Htt) adlı proteinin, normal embriyonik ve nöronal gelişim için gerekli olduğu, birçok hücreyel yolakta, iyon transportunda, veziküler trafikte, beyin-kaynaklı nörotrofik faktörün üretimi ve taşınımında önemli olduğu düşünülmüştür (Cattaneo et al., 2005). IT15 genini kodlayan bölgenin 5' ucunda normal olarak 7-36 tane CAG-üçlüsü tekrarı varken, HH'de bu tekrar sayısının artmış olduğu görülmüş ve hastalık belirteci olarak sayılmıştır (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisiyle yapılan araştırmalarda korkteks ve bazal gangliada laktat miktarının normalin üstünde olduğu gösterilmiştir (Jenkins et al., 1993). Biyokimyasal çalışmalarda ise özellikle ETS'de kompleks II ve III aktivitelerinde azalma olduğunu göstermiştir (Gu et al., 1996). Mutant-htt-knock-in fare modellerinde, mitokondriyal solunum ve ATP üretiminde belirgin bir bozulma olduğu açıklanmıştır (Milakovic and Johnson, 2005). Mitokondrideki azalmış mitokondriyal hareket ve mitokondrideki ultrayapısal değişiklikler HH taşıyan kişilerde ve model farelerde de görülmüştür (Bossy-Wetzel et al., 2008).

Hastalık semptomları göstermeyen fakat ilgili gen bölgelerini taşıyan olası hastalarda yapılan çalışmalarda, hastaların kaudat ve putamenlerinde küçülme başladığı görülmüştür (Aylward et al., 2004). Bu da semptomlar başlamadan evvel hastalıkla ilgili dejeneratif değişimlerin yıllar evvel başladığını göstermektedir. Bu nedenle daha hastalık başlamadan evvel olası hastalardan alınacak çeşitli örneklerle tanıyı mümkün kılacak biyobelirteç ve metodlara ihtiyaç duyulmaktadır.

### 2.1.3.1. Huntington Hastalığında Mitokondriyal Disfonksiyon Modeli:

#### 3-Nitropropionik Asit (3-NP)

3-NP, *Astragalus* gibi toksik bitkilerden, *Arthrimum spp* gibi mantarlardan elde edilen, toksik olduğu bilinen bir kimyasaldır. Bazal ganglia dejenerasyonlarına, insanda ve deneysel olarak kullanılan hayvanlarda ekstrapiramidal semptomlara neden olmaktadır. 3-NP toksini kemirgenlere sistematik bir şekilde uygulandığında, kemirgenlerin HH'ye sahip olan kişilerdeki beyin lezyonlarını gösterdikleri saptanmıştır (Beal et al., 1993). 3-NP'nin kimyasal yapısı sukkinat ile izoelektronik olduğundan, bu nörotoksin ETS üzerindeki sukkinat dehidrogenazın (kompleks II) olduğu yere bağlanarak, kompleks II'yi inhibe eder (Alston et al., 1977). Bu durum enerji kaynağını azaltır ve ekzitotoksik mekanizma ile nörodejenerasyona sebep olur. Striatal ve kortikal nöronlarda yapılan spektroskopik incelemeler ile 3-NP'nin apoptotik olarak nöronal hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir. Vücuda 3-NP alınımı HH'nin semptomlarına yol açarak nörodejenerasyona sebep olur (Beal et al., 1993). 3-NP'nin, kompleks II'ye ait zincir A'nın aktif bölgesinde bulunan Arg<sup>297</sup>'ye kovalent bağlanarak bu bölgeyi inhibe ettiği, ardışık kütle spektroskopisi çalışmalarında gösterilmiştir (Huang et al., 2006). HH olan kişilerde ise ETS üzerindeki kompleks II aktivitesinde kayıp gözlenmiştir (Browne et al., 1997). Bu sebeple, 3-NP gerek insan gerek hayvan HH modeli oluşturmak üzere birçok çalışmada kullanılmıştır (Borlongan et al., 1997).

#### 2.1.4. Diğer Mitokondriyal Disfonksiyon Modelleri: Antimisin-A ve Oligomisin

Kompleks III, sitokrom *b* ve *c*<sub>1</sub> yapılarından oluşur (Hatefi et al., 1962). Antimisin A'nın kompleks III'ü inhibe ettiği bilinmektedir (Estrabrook, 1957). Antimisin A tarafından mitokondriyal zincirde inhibe olan merkez, sitokrom *b* ve *c*<sub>1</sub> arasındaki bölge olarak belirlenmiştir (Green et al., 1961). Ayrıca Antimisin A'nın kompleks III'e spesifik olduğu da sitokiyometrik çalışmalarda gösterilmiştir (Rieske and Zaugg, 1962). Yine bu mitokondriyal toksinin belirtilen bölgelere geri dönüşümsüz biçimde bağlandığı ve sadece yüksek deterjan ve tuz seviyelerinde kompleks II'ye bağlanma bölgesinde denatürasyon olup kompleks III'den ayrıldığı gözlemlenmiştir (Rieske et al., 1967).

Oligomisin, *Streptomyces* tarafından üretilen ve diğer organizmalara karşı zararlı olan bir kimyasaldır. Kompleks V, mitokondriyal zincirdeki ATP sentaz bölgesidir ve oligomisinle etkileştirildiğinde, oligomisinin bu bölgeye sıkıca bağlanmasıyla inhibisyona uğrar (Galante et al., 1979). ATP sentazın inhibisyona uğraması sonucunda oksidatif fosforilasyon için gerekli olan ADP'nin ATP ye dönüşüm aşaması, yani enerji üretimi gerçekleşemez. Oligomisin, ATP sentaz inhibitörü olarak birçok çalışmada yer almıştır.



### 2.1.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri

SH-SY5Y hücre hattı, insan nöroblastoma hücrelerinden türevlenmiştir. Esas olarak SK-N-SN hücrelerinin üçüncü alt klonudurlar. SK-N-SN hücre hattının ilk altklonu olan nöroblastoma benzeri hücreler SH-SY5 hücreleridir ve bu hücre hattının bir alt klonunu da SH-SY5Y hücre hattı oluşturmaktadır (Biedler et al., 1978). Klonlama süreci, istenilen fenotipi elde etmek üzere yapay bir seçilime dayanmıştır. Bu hücre 40 yaşında bir bayanın, nöroblastoma metastazı içeren kemik iliğinden elde edilmiştir (Biedler et al., 1973). Bu hücreler genetik mutasyon olarak trisomi 1q taşırlar. Bu hücre hattının dopaminerjik (Inoka et al., 2007; Xie et al., 2010) , asetilkolinerjik (Murphy et al., 1991), glutamaterjik (Ross et al., 1983) ve adenosinerjik oldukları çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu nedenle birçok *in-vitro* çalışma için sıklıkla kullanılan hücreler olmuşlardır.

### 2.1.6. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Ekspresyon Analizi Yöntemi

Nano akış sıvı kromatografisinin (UPLC), elektrosprey iyonizasyon-kuadrupol uçuş zamanı (ESI-QTOF) kütle spektrometresi ile birleştirilmesi ile protein ifade farklılıklarının hesaplanmasının yanında translasyon sonrası modifikasyonların da derinlemesine analiz edilebileceği ileri bir proteomik araştırmalar platformu meydana gelmektedir. Teknolojik yenilikler ile birlikte proteomik yöntemler de gelişmektedir.

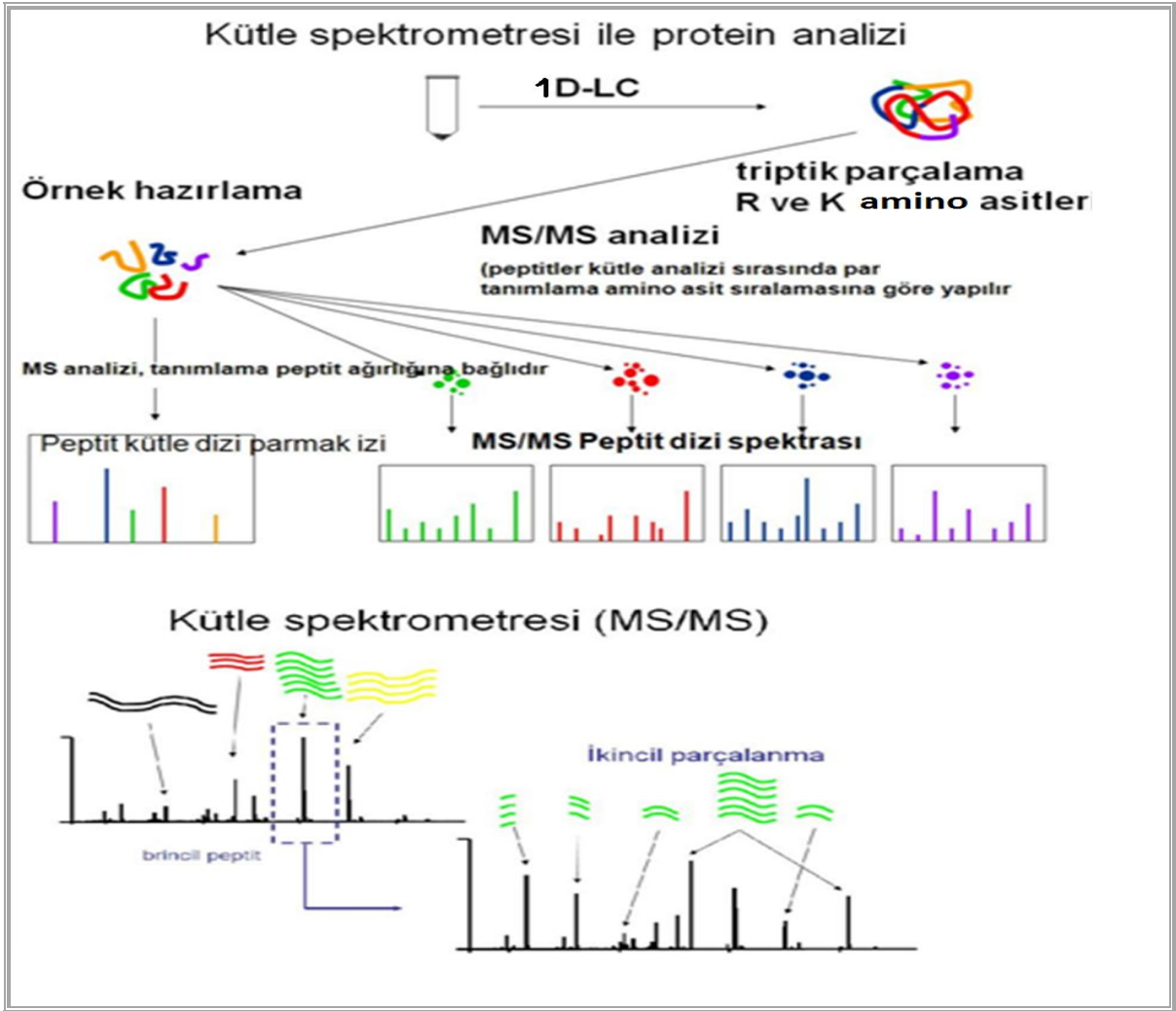
Çalışmada, hücre kültüründen sonra elde edilen farklı hastalık modellerine ait grupların analizi için sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi<sup>E</sup> (LC-MS<sup>E</sup>) denilen ileri bir teknik kullanıldı. Bu teknolojiyle SH-SY5Y mitokondriyal disfonksiyon model hücrelerinden ekstrakte edilen proteinler tripsin ile parçalandıktan sonra güçlü katyon değişim (SCX) ve ters faz (RP) kromatografik ayrıştırımdan geçer. Ardından peptit ağırlıklarının belirlenebilmesi için MS denilen analiz gerçekleştirilir. Bundan sonra ise MS/MS yöntemiyle amino asit sekansı belirlenir. Bu yöntemde deteksiyon limiti dahilinde hücre içerisindeki bütün proteinler tanımlanmaktadır (Şekil 2.2).

Karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kararlı, yüksek çözünürlükte ve hassasiyette çalışabilen, gelişmiş kromatografik sistemlere ihtiyaç duyulur. UPLC, örneklerin çok yüksek düzeyde kromatografik ayrımlarını, tekrar edilebilir ve yüksek hassasiyette yapılmasına olanak vermektedir. Bu sistemde pik kapasitesi ve pik şeklindeki gelişmelerden dolayı analiz edilebilen parçacık sayısında ciddi artışlar görülmektedir.

UPLC, 10.000 psi basınçta çalışabilmektedir ve bu özellik 2 mikrondan küçük dolgu maddesi içeren daha uzun kolonların kullanılmasını gerektirmektedir. İki boyutlu sıvı kromatografisi için optimize edilmiş olan bu sistem, 200 nl/dk ile 100 µl/dk akış hızlarında

çalışabilmektedir. Böylece kromatografik ayırmlar, 50-300 mm uzunluktaki kolonlar ile gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle etil köprülü hibrit (BEH) adı verilen dolgu maddelerinin kullanıldığı kolonların çok kararlı olması, florik asit yerine trifloroasetik asidin (TFA) kullanılmasını mümkün kılmaktadır. TFA kromatografik olarak daha keskin piklerin elde edilmesini sağlamaktadır ki bu durum çözünürlüğü direkt olarak etkilemektedir.

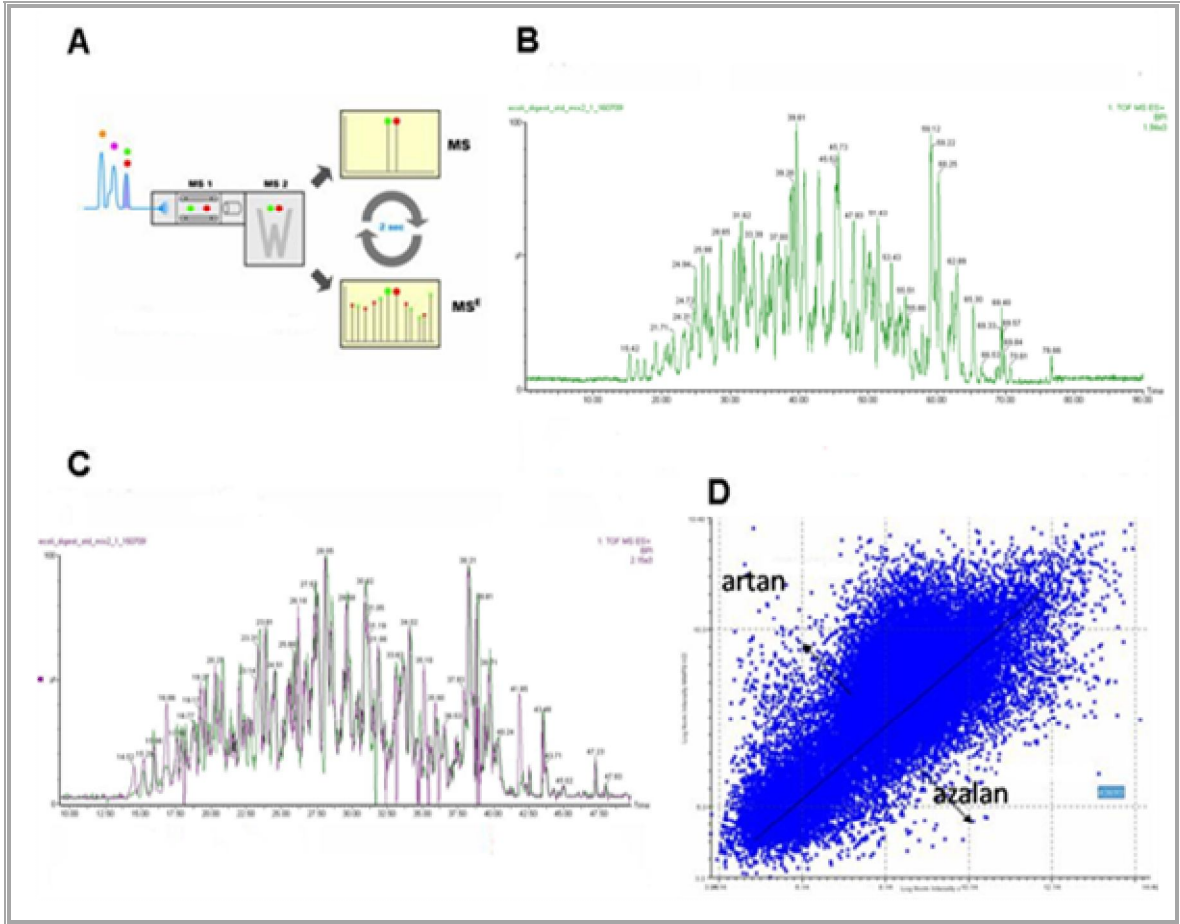
Laboratuvarımızda kurulu olan yüksek çözünürlük kütle spektrometresi (SYNAPT-HDMS), “Triwave” teknolojisi sayesinde peptit analizinde çok büyük gelişmeleri beraberinde getirmiştir.



Şekil 2.2. Kütle spektrometresi ile protein analizi.

Analizler için kullanılacak olan proteomik yöntem, etiketsiz LC-MS<sup>E</sup> olarak bilinen ve 2008 yılında kullanılmaya başlanan yeni bir teknolojidir. Farklı örnek gruplarının karşılaştırılarak protein ifade farklılıklarının hesaplanması için iki temel proteomik yaklaşım vardır. Birincisi etiketli analiz olarak adlandırılan iTRAQ, SILIC ve <sup>18</sup>O profilleme adındaki metotlardır ki bu yaklaşımda peptitler kovalent bağlarla bir kimyasal

etikete bağlanır ve analiz sırasında etiketlerden elde edilen sinyale dayanarak ifade farklılıkları hesaplanır. Bu yaklaşımın dezavantajı, mevcut teknoloji ile sadece 8 farklı örneğin karşılaştırılabilir olması ve bu yüzden 72 örneği analiz ettiğimiz bu çalışma için uygun olmamasıdır. Ayrıca etiketli metotlarda en azından 100 ug proteinin gerekli olması ve kimyasal etiketlerin pahalı olmasından ötürü makul bir bütçe ile karşılanamayacak olmasıdır.



**Şekil 2.3.a.** Peptitlerin belirlenmesi. **b.** Örneğe ait peptitlerin kromatogram ile gösterimi. **c.** Karşılaştırmalı analizlerde iki gruba ait iki örneğin kromatogramlarının üst üste çakıştırılarak karşılaştırılması. **d.** Karşılaştırma sonucu elde edilen protein ifade farklılıklarının logaritmik gösterimi (Protein intensity Log(e) grafiği).

Etiketli proteomik çalışmalara alternatif olan ve literatürde başarıyla uygulanmaya başlanılan yöntem, etiketsiz LC-MS<sup>E</sup> metodolojisidir. Bu metotta analizi gerçekleştirilecek olan biyolojik örnek, tripsinizasyon ile peptitlerine parçalanır ve tekrar edilebilirliği yüksek olan UPLC sisteminde kromatografik ayrıştırması gerçekleştirilir. Elde edilen sonuçların güvenilirliği UPLC sisteminin, her bir peptidin kromatografik alıkonma zamanında yok denecek kadar az farklılığı sağlamasıdır. Ayrıştırma sonrasında peptitler “time of flight (TOF)” denilen uçuş zamanı tüpünden geçerek kuadrupol içinde argon ile çarpıştırılarak

parçalanır. Bu aşamada MS<sup>E</sup> sisteminde öncelikle düşük çarpışma enerjisinde peptidin bütünü hakkında ve daha sonra çarpışma enerjisi artırılarak peptidi oluşturan amino asitler hakkında bilgi toplanır (Şekil 2.3.a). Protein karışımları binlerce peptidi ihtiva ettiğinden ayrıştırma gücünün çok fazla olduğu kolonların kullanılması gerekmektedir. UPLC sisteminde dolgu maddesi 1.7Å olan BEHC<sub>18</sub> partikülleri kullanılmakta ve kolon uzunluğu 30 cm kadar olabilmektedir, bu şekilde peptit yükleme miktarı artırılmakta ve 300 nL/dk akış hızları ile 8000 psi basınç altında çok iyi ayrıştırma gerçekleştirilmektedir. Bu düzenek ile 500 ng peptit karışımından 200-400 proteinin tanımlanması mümkün olmaktadır.

Karşılaştırmalı protein analizinin gerçekleştirilmesi için UPLC sisteminin tekrar edilebilir ve kararlı olması gerekmektedir. Peptit miktarlarının analizi iyon kromatogramında elde edilen piklerin integrasyonu ile gerçekleştirildiğinden peptitlerin farklı örnekler içinde analiz edilebilmesi için kromatografik alıkonulma zamanlarının örtüşmesi gerekmektedir (Şekil 2.3.b). UPLC sisteminde farklı örnek kromatogramları üst üste çakıştırıldığında görülüyor ki peptit kromatografik alıkonulma zamanlarında çok az bir değişiklik var ve “ProteinLynx Global Server” (PLGS) yazılımı sayesinde her bir peptit piki kolayca üst üste çakıştırılabilir (Şekil 2.3.c). Bir ve iki boyutlu ayrıştırma sonucunda analiz edilen ve tanımlaması yapılan peptit sayısının binlerce olmasından dolayı veri analizi karmaşıklaşabiliyor ama PLGS-Expression<sup>E</sup> yazılımı sayesinde örnekler arası karşılaştırma daha kolay yapılabilir. Karşılaştırması yapılacak örneklerdeki protein ifade farklılıkları, ‘Protein intensity Log(e) grafiği’ gibi proteinlerin nanogramlarına göre oluşturulan grafiklerle kolayca incelenebilir (Şekil 2.3.d). Çok daha az miktarda protein karışımı gerektiren bu yaklaşımla farklı gruplardan oluşan örnekler tekrar edilebilir ve güvenilir bir şekilde analiz edilebilir, ayrıca protein ifade farklılıklarının belirlenmesi mümkün olur.

LC-MS<sup>E</sup> metodolojisi ile protein analizi sonucunda her örnek için yüzlerce protein tanımlaması ve ifade farklılıkları belirlenir. Elde edilen verilerden yola çıkarak anlamlı sonuçlara ulaşabilmek için çeşitli biyoinformatik yazılımlara başvurulur. Bunlardan ilki olan Scaffold 3 yazılımı ile protein tanımlamaları doğrulanır ve aynı zamanda tanımlanan her protein için gen ontoloji bilgileri otomatik olarak “The National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) veritabanlarından indirilir. Bu şekilde tanımlanan proteinler hızlı bir şekilde hücresel yerleşim, metabolik süreç, regülasyon gibi kategorilere ayrılarak ilgili patolojide hangi protein gruplarının etkilendiği bulunur. Tanımlanan yüzlerce proteinin birbirleri ile olan bağlantısının belirlenebilmesi ve hesaplanan ifade

farklılıklarından yola çıkarak nasıl bir mekanizmanın rol aldığını bulması için “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA) yolak analizi yazılımı kullanılabilir. Scaffold 3 ve IPA yazılımları birçok örneğin analiz edileceği çalışmalarda, sonuçların değerlendirilip anlamlı sonuçlara ulaşmayı hızlandıracaktır. Gruplar arası karşılaştırmanın doğru bir şekilde yapılabilmesi, analiz grupları arasında farklılığa neden olan protein biyobelirteçlerin bulunabilmesi için temel komponent analizi (PCA) kullanılması gerekir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

**Çizelge 3.1.** Deneyde kullanılan gereçler.

<u>Kullanılan Gereçler</u>	<u>Marka ve Ürün Kodları</u>
Su, Chromosolv, for HPLC	SIGMA-ALDRICH # 34877
DL-Dithiothreitol (dtt) $\geq$ % 99, 5	SIGMA # 43815
Iodoacetamide (IAA)	SIGMA #  1149-25G
Trifluoroacetic acid (TFA) %98	SIGMA-ALDRICH #T6508-100ML
Amonyum Bikarbonat $\geq$ % 99, 5	Fluka # 09830
Asetonitril, LC-MS Chromasolv	Fluka # 34967
Formik Asit, for MS %98	Fluka # 94318-50L-F
Alkol Dehidrogenaz (ADH)	Waters # 186002328
Protein Standart Set (BSA)	SIGMA-ALDRICH #P5494-1SET
Triptik BSA	Waters # 1860022329
Bradford Reagent	SIGMA #B6916-500ML
Aseton	SIGMA-ALDRICH #34850
Rapigest	WATERS # 186001861
Tripsin (Proteomics Grade)	SIGMA # T6567-5X20UG
Proteaz İnhibitör Kokteyli	SIGMA # P8340
Vivaspin (100-500ul)	Sartorius-Stedim # 9049850
Lobind Tüpler	Eppendorf # Z666505, Z666491 – 100EA
LC-Vial	SUPELCO # 29413-U
Nitril Eldivenler	Supreno Plus, Powder-free

### 3.1. Hücre Kültürü ve Elektron Taşıma Zinciri İnhibisyonu

SH-SY5Y hücreleri poli-D-lizin kaplı 150 cm<sup>2</sup> ebatında polistren kültür tabaklarına ekildi ve %10 FBS (fetal bovine serum), penisilin (100ünite/ml), streptomisin (100 µg/ ml) ve esansiyel olmayan aminoasitler ihtiva eden Dulbecco's modified eagle serum (DMEM) içinde büyütüldü. 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 havadan oluşan nemlendirilmiş bir atmosferde inkübe edildi. Her bir proteomik analiz için 1 × 10<sup>6</sup> hücre kullanıldı. Komplekslere özgü inhibitörlerin konsantrasyonlarının artırılmasıyla, hücre metabolizmasında düşüş, reaktif oksijen türlerinde artış, en nihayetinde de hücre ölümüne varan bir süreç olduğundan dolayı, inhibitör konsantrasyonları seçilirken her bir nörotoksin uygulamasının ardından %80 oranında hücre canlılığı yakayabilmek amaçlandı. Bu biyolojik cevap temelli normalizasyon ile inhibisyona özgü diferansiyel inhibitör transferi, metabolizması ve inhibisyon kinetiği sorunu aşılmış oldu. Böylece hesaplanan protein ifade farklılıklarının inhibisyon sonrasında meydana gelen metabolik değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücreler, tabaklardaki yoğunlukları %80-90'a ulaştığında, %10 FBS, penisilin (100 ünite/ml), streptomisin (100 µg/ml), NAA ve buna ek olarak da her biri farklı bir inhibiör içeren taze DMEM'ler ile inkübe edildi. İnhibitörlerin miktarları; 1mM MPTP, 5 mM 3-NP, 4 µg/ml antimisin a, 2mM sodyum azit ve 1 µg/ml oligomisin olarak belirlendi. Tüm elektron zincir inhibisyon reaksiyonları 24 saat sürdürülürken, 3-NP sadece 12 saat boyunca devam ettirildi. Her bir ETS inhibisyonunda hücreler sayıldı ve genel hücre yaşam oranı %80 olarak muhafaza edildi. Her ETS inhibisyon reaksiyonu boyunca bir de kontrol hücre kültürü dahil edildi. Tüm deneyler dörtlü olarak tekrar edildi.

### 3.2. Hücreden Protein Ekstraksiyonu, Konsantrasyon Tayini ve Triptik Peptitlerin Hazırlanması

%0.1 Rapigest: 1 mg Rapigest 1 ml 50 mM AmBic içinde çözülür.

50 mM Amonyum Bikarbonat (AmBic): 40 mg Ambic 1 ml HPLC Su içinde çözülür.

100 mM Dithiothreitol (DTT): 0.0155 g DTT 1ml AmBic içinde çözülür.

200 mM iyodoasetamid (IAA): 0.0560 g IAA 1ml AmBic içinde çözülür.

1: 50 Tripsin: 1 ug tripsin 1ml AmBic içinde çözülür ve 50 ul kullanılır.

Hücre kültüründen sonra toplanan pelletler, besiyerinden uzaklaştırmak amacıyla, 3 defa soğuk 50 mM amonyum bikarbonat ile yıkandı. Hücreler, yaklaşık 4800 rpm hızda, 3 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüjden sonra süpernatant, hücrelere zarar verilmeden aspire edildi. Santrifüj aşamasından sonra hücreler, üzerlerine 500 ul liziz

buffer eklenip vortekslendi. Proteomik araştırmalarda standart liziz buffer, amonyum bikarbonat içinde hazırlanmış olan % 0.1 Rapigest'tir.

Örnekler, sonikasyon yapılmak üzere buz üzerine alındı. Sonikasyon üç tekrarlı olarak ve her bir tekrar 5 sn sürecek şekilde ayarlandı. Tüpler, sonikasyon sürecinde artan sıcaklık sonucu oluşabilecek protein kaybını önlemek amacıyla, mümkün olduğunca buz üzerinde tutuldu. Bu aşamadan sonra, örnekler 15,000 rpm hızla 15 dk boyunca santrifüj edilerek, hücre debrisi çöktürüldü. Süpernatant yeni tüplere konuldu. Örneklerin protein konsantrasyonunu ölçmek amacıyla, Bradford yöntemi kullanıldı. Protein konsantrasyon tayini için standart Bradford yöntemi ile 100-1200 ug/ml konsantrasyon aralığında konsantrasyon eğrisi oluşturuldu. Örnek ekstraksiyonları Bradford kolorimetrik yöntemi ile 595 nm dalga boyunda standart konsantrasyon eğrisi absorpsiyon değerleri ile karşılaştırılarak, protein miktarları tayin edildi. Konsantrasyon eğrilerinden yararlanılarak elde edilen hesaplama sonucu, her bir örnekten 100 ug protein sağlanabilmesi için, örneklerden alınması gereken hacim hesaplandı. Her bir örnek için gereken hacimler alınarak yeni lobind tüplere konuldu.

Konsantrasyon ölçümlerinde, hücre özütlerinin eldesi için kullanılmış olan liziz buffer göz önüne alınarak, konsantrasyon metoduna karar verilmelidir. RapiGest ve micro BCA yöntemleri, proteomik analizler ile uyumlu oldukları bilinen ölçüm yöntemlerindedir.

Protein ve peptitlerin LC-MS/MS yöntemi ile tanımlanabilmesi için örnek hazırlama aşaması çok önem arz etmektedir. Nano sıvı kromatografisi ve elektropray iyonlaşma kütle spektrometresi özellikle örnek içerisindeki tuzlardan ve küçük moleküllerden olumsuz yönde etkilendiğinden dolayı, tuzlar iki farklı yöntem ile uzaklaştırılabilir. Birinci yöntemde, tripsinizasyondan önce protein karışımı, Sartorius Vivapin 500 5 kDa PES moleküler kütle membran zarlı 0,5 ml spin kolonu ile santrifüj edilir ve örnek, tuzlarından arındırılır. İkinci yöntem, ilk yöntemle protein çözünürlüğünde sorun yaşanırsa uygulanacak olan bir metottur. Bu alternatif yöntemde Pierce Slide-A-Lyzer 5 kDa moleküler kütle membranlı mikro diyaliz kaseti kullanılabilir. Daha uzun zaman almasına rağmen proteinlerin işlemler esnasında çökmemelerini sağlar. Bu çalışmada diyaliz için birinci yöntem seçildi.

Örnekler 5 kDa PES membran spin kolonuna transfer edildi ve ilave 500 ul %0,1 RapiGest çözeltisi ile iki defa yıkandı. Örnekler, bu kolonlar içinde, hacimleri 50 ul olana kadar santrifüj edilip, yoğunlaştırıldı. Ardından yeni lobind edendorf tüplere alındılar.



Örneklerin konsantrasyonları Bradford yöntemi ile tayin edildi. Her bir örnekten 50 ug protein sağlanabilmesi için, örneklerden alınması gereken hacim hesaplandı ve lobind tüplere alındı.

Her birinde 50 ug protein olduğunu bildiğimiz tüplere önce 5,5 ul 100 mM DTT ilave edilerek, disülfid bağlarının kırılması sağlandı. Disülfid bağları, proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarında bulunan bir bağdır. Disülfid bağlarının kırılmasıyla, proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarını açmış olduk. Ardından, 6,1 ul 200 mM iyodoasetamit (IAA) ilavesi ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletilerek indirgenmiş olan sistin (disülfid bağlarının yapısında bulunur), yan zincirlerinden metillenmiş oldu. Metillenme yapılmasıyla, oluşabilecek protein katlanmaları engellenmiş oldu.

Hazırlanan bu karışım, triptik peptitleri elde etmek için, 50 ul, 50 mM amonyum bikarbonat içinde, 1:50 oranında 1 ug tripsin ile gece boyu 37°C'deki etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra proteaz aktivitesi, 3 ul trifloroasetik asit (TFA) ve 2 ul asetonitril ilavesi ile durduruldu. Peptit karışımına TFA katılması ile RapiGest deterjanı hegzanol ve kütle spektrometresi ile uyumlu olan bir kimyasala bölündü. Elde edilen peptit karışımı içerisine 50 fmol kadar ADH1\_Yeast triptik peptitleri dahili standart olarak eklendi. Örnek içerisine katılan bu dahili standart, örnekler arası normalizasyonun yapılabilmesi için gereklidir. Bu aşamada peptitler 80°C'de 2 saat kadar çalkalanarak ısıtıldı. Son aşama olarak da 10 dk kadar 15,000 rpm hızda santrifüj edilerek, çözünmeyen ve kromatografi aşamasında sorun çıkartabilecek partiküller çöktürüldü ve süpernatant 200 ul'lik PTFE örnek viyaline konuldu.

RapiGest, zwitter iyonik deterjanı proteindeki iyonik etkileşimleri ortadan kaldırarak denatürasyonu kolaylaştırır. Böylelikle hem proteinlerin çözünürlüğünü artar hem de tripsin proteazının, proteine yaklaşmasına ve lizin, arginin aminoasitlerinden sonra daha kolay bir şekilde peptit zincirinin kesilmesine olanak verir. Bu şekilde daha etkin ve hızlı bir şekilde tripsinizasyon gerçekleştirilir.

### **3.3. Kromatografik Ayrıştırma**

Karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kütle spektrometresi analizi öncesinde bu örneklerin çeşitli yöntemler ile ayrıştırılmaları yani analiz edilen karışımın basitleştirilmesi gerekmektedir. Örneklerden elde edilen total protein ekstraktları tek bir seferde kütle spektrometresine verilmiş olsaydı, yüksek miktardaki proteinler düşük miktarda bulunan proteinleri maskeleyecek ve tanımlamanın kısıtlı olmasına neden olacaktır.



**Şekil 3.1.** LC-MS/MS Cihazı

### **3.3.1. 1D Ters Faz Kromatografisi (RP):**

Ayrıştırma yöntemlerinden en az zaman gerektirecek olan, bir boyutlu ters faz kromatografisidir. Bu kromatografik yöntemde peptitler,  $C_{18}$  kolon dolgu maddesine karşı göreceli hidrofobik etkileşimlerine dayanarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Bu metotta peptit örnekleri öncelikle tuzak kolon adı verilen 2 cm'lik  $C_{18}$  kolonunda alıkonulur. Ardından nano pompa ile oluşturulan asetonitril gradienti ile tuzak kolondan ayrılan peptitler  $C_{18}$  analitik kolonunda hidrofobik etkileşimler ile ayrıştırılarak kolondan çıkar. Peptit karışımının karmaşıklık derecesi göz önüne alınarak, farklı uzunlukta nano kolonlar kullanılabilir. Karmaşık peptit karışımının ayrıştırılması için ayrıştırma gücü yüksek olan  $1,7 \mu\text{m}$  BEH  $C_{18}$   $75 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm}$  nano LC kolonu ile  $300 \text{ nL/dk}$  akış hızında 90 dk'lık ters faz kromatografisi uygulanmıştır. 250 mm nano LC kolonunun toplam peptit yükleme kapasitesi 500 ng olarak belirlenmiştir. Bunun üzerinde örnek yüklemesi, kromatografik çözünürlüğü düşüreceğinden ayrıştırmayı olumsuz etkiler. Kolona örnek yüklemesi öncesinde yapılan Bradford protein konsantrasyon tayini ile enjekte edilen her mikrolitreye karşılık ne kadar peptit bulunduğu saptandı ve böylelikle fazla yüklemeler önlendi.

### 3.4. MS ve MS/MS Deney Kurulumu:

MS analizi, peptitlerin bütünü hakkında bilgi toplamak için gerçekleştirilir. MS/MS analizi ise peptitlerin amino asit dizi bilgisinin bulunmasıdır. Peptitlerin analizi için Waters'ın MS<sup>E</sup> sistemi diye adlandırılan ve SYNAPT-HDMS sisteminde önce 5 eV daha sonra 25-40 eV çarpışma enerjisindeki analiz yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde her bir çarpışma enerjisinde 1,5 sn kadar veri toplandı ve belirli m/z aralığında olan peptitler tarandı. Bu şekilde hem peptidin bütünü hakkında hem de amino asit sekansı hakkında daha fazla bilgi alınabildi.

#### 3.4.1. MS<sup>E</sup> Deney Kurulumu:

Peptit aminoasit dizi bilgisinin analizi için, çalışmada öncelikli olarak kullandığımız yöntem MS<sup>E</sup>'dir. Geçmiş dönemlerde ESI-QTOF kütle spektrometrelerinde sadece DDA metodu kullanılabilirdi fakat 2008 yılında Waters firmasının ürettiği SYNAPT-HDMS cihazı ile bu yeni metot kullanılmaya başlanmış oldu. DDA metodundan temel farkı 'precursor' denen peptit seçimlerinin yapılmaması ve kromatografik ayrıştırmadan sonra elüe olan bütün peptitlerin aynı anda miktarlarındaki farklılıklar gözetmeksizin parçalanmaya başlanmasıdır. Aynı anda parçalanan peptitlerden ayrılan parçaların hangi peptitten geldiği yani aminoasit dizi bilgisi "Time-Aligne" fonksiyonu ile ilişkilendiriliyor. Bu yöntemin kullanıcı açısından yararı, DDA metodundan çok daha az parametre ayarlanması gerektiği ve temel olarak sadece hangi m/z aralığında peptitlerin taranmasını istediğinizi (genellikle 50-1990 ya da 100-1600) belirtmenizdir. Nöroblastoma ve düz kas hücreleri protein ekstraktları ile yapmış olduğumuz proteomik çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında MS<sup>E</sup> metodunda DDA'den daha iyi sonuçlar almaktayız. Daha iyi şu anlama gelmektedir;

1. Teorik olarak tripsin ile bir proteinin parçalanmasından sonra elde edilebilecek triptik peptitlerin gerçekte kaç tanesini gördüğünüz % sekans tanımlamasını belirler, yani daha fazla peptit tanımlanmış ise protein tanımlaması daha güçlüdür.

2. Her bir peptitte parçalanma sonrasında oluşan *b* ve *y* iyon serileri olarak adlandırılan parçacıkların sayısının fazlalığı amino asit dizisinin daha doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi sağlar.

Sonuç olarak MS<sup>E</sup> yöntemi ile daha doğru ve daha fazla sayıda proteinin tanımlaması gerçekleştirilecektir.

### 3.5. Karşılaştırmalı Grup Analizi:

Karmaşık protein örneklerinden elde edilen triptik peptitlerin analizi esnasında binlerce kütle spektrarı elde edilmektedir. Bu ham verilerden başlayarak protein

miktarlarındaki değişimlerin hesaplanabilmesi için çeşitli yazılımların kullanılması gerekmektedir. Çalışmamızda nöroblastoma örneklerinden ekstrakte edilen proteinlerdeki ekspresyon farklılıklarının analizi için PLGS-Expression<sup>E</sup> modülü ve alternatif bir yöntem olarak da IPA platformu kullanıldı. Bu biyoinformatik yazılımlar ile her bir örnek grubundaki protein farklılıkları hesaplandı ve tablo halinde listelendi.

### **3.5.1. PLGS Expression<sup>E</sup> Protein Ekspresyon Analizi:**

Protein miktarlarındaki değişimlerin hesaplanması için kullanılacak öncelikli yazılım PLGS-Expression<sup>E</sup> modülüdür. Bu modül, XML tabanlı inforatik bileşenleri ile kalitatif ve kantitatif hesaplamaların gerçekleştirildiği, protein biyobelirteç keşif platformudur. Bu analiz yönteminde her bir örnek üç defa analiz edildi ve üç analizden en az iki tanesinde tanımlanan peptitler hesaplamalara dahil edildi, böylelikle teknik hatalardan kaynaklanan yanlış sonuçlar bertaraf edildi. Yöntemde farklı nöroblastoma örnekleri grup olarak karşılaştırılarak grupları birbirinden ayıran proteinler tanımlandı. Expression<sup>E</sup> modülü ile elde edilen veriler, t-test filtrelemelerine tabi tutularak istatistiksel olarak anlam ifade eden protein farklılıkları listelendi.

### **3.6. İstatiksel Analiz ve Biyoinformatik Yazılımlar**

Deneyde elde edilen sonuçların güvenilirliğinin test edilebilmesi, üçlü tekrarlarla beraber 72 örneğin aynı anda karşılaştırılabilmesi ve anlamlı bilgilere ulaşılabilmesi için çeşitli istatiksel hesaplamalar kullanıldı. Bu konudaki çeşitli yazılımlar ya laboratuvarımızdaki bilgisayarlarda ya da web tabanlı olarak erişimimiz olan programlardır. Proteomik araştırmalar biyoinformatik yazılımların çok yoğun olarak kullanıldığı bir bilim dalıdır. Biyolojik örneklerden binlerce peptidin amino asit dizisinin bulunması, peptitlerden proteinlerin tanımlanması, peptit üzerindeki translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi, istatiksel hesaplamalar ile tanımlama doğruluğunun tayin edilmesi, tanımlanan proteinler hakkında veri bankalarından bilgi toplanması gibi aşamalarda farklı yazılımlar çalışma dahilinde kullanılmıştır.

#### **3.6.1. ANOVA ve t-test**

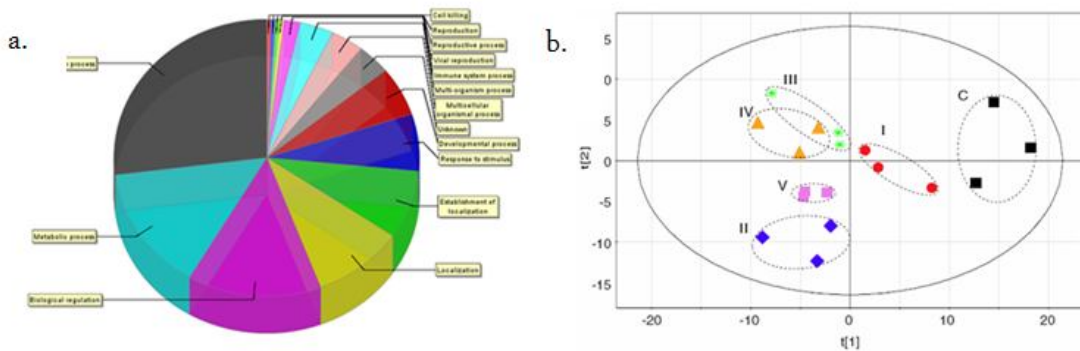
T-test (student's two-sample t-test) iki örnek grubunun karşılaştırılarak aralarında anlamlı bir farklılığın olup olmadığını bulmak için uygulandı. Çalışmada farklı örnek gruplarından iki tanesinin hızlı bir şekilde karşılaştırılması için t-test metodu kullanıldı. İki den fazla grubun istatiksel olarak karşılaştırılabilmesi için daha gelişmiş bir model olan ANOVA (analysis of variance) modelleri uygulandı. T-test ve ANOVA, Microsoft Excel programı içindeki istatistik modülü ile yapıldı. Ayrıca Scaffold analizinde de anova, t-test sonuçları tekrar edildi.

### 3.6.2. Scaffold 3 Taramaları

Proteome Software firması tarafından üretilen Scaffold 3 yazılımı karmaşık örneklerden LC-MS/MS metodu ile tanımlanmış yüzlerce proteinin otomatik olarak biyolojik anotasyonlarının belirlenmesi için kullanıldı. Yazılım paketi aynı zamanda protein ve peptit tanımlamalarının istatistiksel olasılıklarını hesaplayarak tanımlamaların güvenilirliği konusunda değerlendirmeler için kullanıldı. Scaffold 3, PLGS ya da Mascot arama motorları kullanılarak tanımlaması yapılan proteinleri X!Tandem motoru ile tekrar tanımlamaya çalışarak protein tanımlama hatalarını da denetler.

### 3.6.3. Temel Bileşenler Analizi

Temel bileşenler analizi (PCA), bir analiz sonucu elde edilen p sayıda değişkenin, varyans yapısını daha az sayıda ve doğrusal bileşenler ile ifade etme yöntemidir. Aralarında korelasyon bulunan p sayıda değişkenin açıkladığı yapıyı, aralarında korelasyon bulunmayan ve sayıca orijinal değişken sayısından daha az sayıda ( $p > k$ ) orijinal değişkenlerin doğrusal bileşenleri olan değişkenlerle ifade etme yöntemi olarak da tanımlanabilir. Veri matrisinde yer alan p sayıda değişkenin doğrusal bileşenlerini bulmak için kovaryans matrisinin ya da korelasyon matrisinin özdeğerleri ve özvektörleri kullanılır. Eğer değişkenler aynı birim veya karşılaştırılabilir birimlerdeyse, değişken varyansları aynı boyuttaysa varyans-kovaryans matrisi kullanılır. Bu durumlar sağlanmadığında varyans-kovaryansmatrisi yerine korelasyon matrisi kullanılır. PCA'nın üç temel amacı vardır; Verilerin boyutunu azaltmak, tahminleme yapmak ve veri setini, bazı analizler için görüntülemek. PCA uyguladığımızda p boyutlu uzayın gerçek boyutu belirlenir. Bu gerçek boyuta temel bileşenler adı verilir. Temel bileşenlerin üç özelliği vardır; korelasyonsuzlardır, birinci temel bileşen toplam değişkenliği en çok açıklayan değişkendir ve bir sonraki temel bileşen kalan değişkenliği en çok açıklayan değişkendir.



Şekil. 3.2. a. Scaffold 3 Gen Ontoloji. b. PCA Analizi

### 3.7. Sınırlılıklar

Her ne kadar, mitokondriyal disfonksiyon üzerine proteomik bir çalışma yapılmış olsa da, insan hücresinden türevlenen tüm hücrelerde olan karmaşık proteom nedeniyle, bottom-up bir proteomik teknikle, yeteri kadar protein tanımlaması yapılamayabilir. Bu durum farklı fraksiyonlama teknikleriyle aşılabılır. Bu çalışmada mitokondriye yönelik subsellüler fraksiyonlama yapıp, ardından kütle spektrometresi analiziyle, mitokondriye ait daha fazla protein bulunabilirdi.

LC-MS/MS sisteminde zar proteinleri geniş ölçekte tanımlanamamaktadır. Bunun için liziz aşamasında kaotropik deterjanlar seçilerek, zarda bulunan proteinlerin tanımlanma oranı artırılabilirdi.

Her bir inhibisyon grubuna ait dört biyolojik örnek hazırlandı. Bu sayı artırılarak, aykırı gözlemlerin azaltılması ve daha mantıklı istatistiksel sonuçlar alınması sağlanabilirdi.

*İn-vitro* mitokondriyal disfonksiyon modeli yapmak üzere seçtiğimiz SH-SY5Y hücreleri ilk olarak bir *in-vivo* model olmadıkları için insan nörodejeneratif hastalıklarının araştırılması için yeterli ve güvenilir kaynak olmamaktadır. Ayrıca, *in-vivo* ortamda uzun bir süreçte gelişen nörodejeneratif hastalıkların, nörotoksin indüklü hızlı modellenmesinin hastalık patolojisini ne kadar yansıtacağı da tartışma konusudur. Bu sorunların aşılması için bu tarz çalışmaların *in-vivo* ortama taşınması, daha güvenilir sonuçlar alınmasını sağlayacaktır. *İn-vitro* çalışmalar ise bu çalışmalara geçmek ve metodolojinin oturtulması için kullanılan bir basamak mahiyetindedir.

LC-MS/MS yönteminin de kendine ait kısıtlamaları vardır. Bu durum önerilerde de bahsedildiği üzere farklı metodolojilerin beraber kullanılmasıyla aşılabılır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 LC-MS/MS Sonuçları

Protein ekstraksiyonu sonucu elde edilen triptik peptitler nano akış sıvı kromatografisinde ayrıştırıldı. Bundan sonra kütle spektrometresinde gerçekleştirilen MS deneyi ile peptitler kantitatif olarak ölçülmüş oldu. Ardından yapılan MS/MS deneyi ile de peptitler parçalanarak amino asit dizilimleri belirlendi. MS ve MS/MS deneyleri sonucunda, SH-SY5Y deney gruplarına ait toplam 380 adet, yüksek güvenilirlikte protein tanımlandı.

### 4.2. PLGS Sonuçları

PLGS analizi ile, gruplar arasındaki protein ifade farklılıkları hesaplandı. Sonuçlar, kontrole karşı her bir grup için yapıldı. Elde edilen sonuçlarla, kontrol ve karşı gruplar arasındaki farklar, 2(grup): 1(kontrol) olarak belirtildi. PLGS yazılımında, belli bir protein, üçlü tekrarların en az ikisinde görülecek şekilde ayarlandığından, örneklerin hazırlanmasından kaynaklanabilecek hatalar mümkün oldukça analiz dışı bırakılmıştır. Proteinlerin mutlak miktarları ve örnekten örneğe ne kadar değişiklik gösterdikleri, her bir örneğe ilişkin elde edilen kromatogramların PLGS ile analizi sonucu saptanmıştır.

#### 4.2.1. Kontrol-Sodyum Azit Karşılaştırmaları

PLGS analizi ile, kontrol grubu ve sodyum azit grubu arasında, içerdikleri proteinlerin nanogramları baz alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Proteinler, Uniprot protein data bankasındaki erişim numaraları ve adlarıyla, Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. Çizelgede bahsi geçen 2:1 oranı, bahsedilen proteinin nanogramını sodyum azit/kontrol olarak belirtir. 2:1\_P ise t-test oranını belirtir. Çizelgedeki grup sütununda yer alan 1 ve 2 değerleri, bahsedilen proteinin sadece 1 (kontrol) ya da 2'de (sodyum azit) görüldüğünü belirtir.

**Çizelge.4.1.** Kontrol ve sodyum azit grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.

Erişim No	OK	Protein Adı	PLGS Skoru	Grup	2:1_Oranı	2:1_ Log(e) Oranı	2:1_ Log(e) StdSpma	2:1_P
P07195	2	L laktat dehidrogenaz B zinciri	621	1-2	1.38	0.32	0.03	1.00
P10809	2	60 kDa heat shock protein mitokondriyal	702	1-2	0.73	-0.32	0.03	0.00
Q58FG0	2	Putative heat shock protein HSP 90	291	1-2	0.32	-1.15	0.24	0.00
P60174	2	Triosefosfat izomeraz	2749	1-2	1.36	0.31	0.02	1.00
P04350	2	Tubulin beta 4 zinciri	4695	1-2	0.78	-0.25	0.13	0.00

P16401	2	Histon H1 5	592	1-2	0.44	-0.82	0.07	0.00
Q6S8J3	2	POTE ankyrin domain family member E	3025	1-2	0.73	-0.31	0.11	0.00
P09651	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1568	1-2	0.61	-0.49	0.04	0.00
Q562R1	2	Beta actin like protein 2	1396	1-2	0.29	-1.23	0.13	0.00
Q71UI9	2	Histone H2A V	6608	1-2	0.59	-0.52	0.02	0.00
P07900	2	Heat shock protein HSP 90 alpha	1277	1-2	1.22	0.20	0.03	1.00
P07437	2	Tubulin beta chain	11346	1-2	0.45	-0.79	0.03	0.00
Q92621	2	Nuclear pore complex protein Nup205	98	1-2	0.70	-0.36	0.04	0.00
P09104	2	Gamma enolase	419	1-2	1.26	0.23	0.23	0.96
P52565	2	Rho GDP dissociation inhibitor 1	448	1-2	1.27	0.24	0.05	1.00
P34931	2	Heat shock 70 kDa protein 1 like	841	1-2	0.79	-0.24	0.15	0.00
P40926	2	Malate dehydrogenase mitochondrial	2298	1-2	1.68	0.52	0.03	1.00
P09429	2	High mobility group protein B1	736	1-2	0.59	-0.53	0.05	0.00
P0CG38	2	POTE ankyrin domain family member I	2302	1-2	0.28	-1.27	0.12	0.00
P04406	2	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	6947	1-2	0.58	-0.55	0.03	0.00
P68363	2	Tubulin alpha 1B chain	5337	1-2	0.79	-0.23	0.05	0.00
P27348	2	14 3 3 protein theta	329	1-2	1.25	0.22	0.06	1.00
P11021	2	78 kDa glucose regulated protein	188	1-2	2.56	0.94	0.03	1.00
P14625	2	Endoplasmin	131	1-2	232	0.84	0.04	1.00
P61981	2	14 3 3 protein gamma	733	1-2	1.25	0.22	0.06	1.00
P06454	2	Prothymosin alpha	5027	1-2	0.79	-0.23	0.08	0.00
Q71U36	2	Tubulin alpha 1A chain	5172	1-2	0.54	-0.61	0.02	0.00
P61978	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	189	1-2	0.58	-0.54	0.06	0.00
P62258	2	14 3 3 protein epsilon	926	1-2	1.22	0.20	0.04	1.00
P61604	2	10 kDa heat shock protein mitochondrial	467	1-2	2.77	0.20	0.05	1.00



Q00839	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	816	1-2	0.36	-1.02	0.07	0.00
P09211	2	Glutathione S transferase P	579	1-2	1.36	0.31	0.05	1.00
P06748	2	Nucleophosmin	1542	1-2	0.57	-0.57	0.04	0.00
Q13509	2	Tubulin beta 3 chain	9937	1-2	0.60	-0.51	0.06	0.00
Q15233	2	Non POU domain containing octamer binding protein	238	2	2	2	2	2
P22626	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 B1	805	1-2	0.73	-0.32	0.04	0.00
Q02878	2	60S ribosomal protein L6	193	1-2	0.77	-0.26	0.08	0.00
P12277	2	Creatine kinase B type	317	1-2	1.25	0.22	0.06	1.00
P62081	2	40S ribosomal protein S7	369	1-2	0.68	-0.38	0.10	0.00
P16949	2	Stathmin	2116	1-2	1.55	0.44	0.03	1.00
Q05639	2	HUMAN Elongation factor 1 alpha 2	1543	1-2	0.40	-0.92	0.04	0.00
P68104	2	Elongation factor 1 alpha 1	3513	1-2	0.35	-1.05	0.03	0.00
P62826	2	GTP binding nuclear protein Ran	218	1-2	1.25	0.22	0.04	1.00
P63104	2	14 3 3 protein zeta delta	298	1-2	1.49	0.40	0.04	1.00
P30613	2	Pyruvate kinase isozymes R L	161	1-2	0.63	-0.47	0.15	0.00
P62805	2	Histone H4	26679	1-2	0.52	-0.65	0.02	0.00
P33778	2	Histone H2B type 1 B	6189	1-2	0.66	-0.41	0.05	0.00

#### 4.2.2. Kontrol-3-NP Karşılaştırmaları

PLGS analizi ile, kontrol grubu ve 3-NP grubu arasında, içerdikleri proteinlerin nanogramları baz alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Proteinler, Uniprot protein data bankasındaki erişim numaraları ve adlarıyla, Çizelge 4.2’de belirtilmiştir. Çizelgede bahsi geçen 2:1 oranı, bahsedilen proteinin nanogramını 3-NP/kontrol olarak belirtir. 2:1\_P ise t-test oranını belirtir. Çizelgedeki grup sütununda yer alan 1 ve 2 değerleri, bahsedilen proteinin sadece 1 (kontrol) ya da 2’de (3-NP) görüldüğünü belirtir.

**Çizelge.4.2.** Kontrol ve 3-NP grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.

Erişim No.	OK	Protein Adı	PLGS Skoru	Grup	2:1_Oranı	2:1_ Log(e) Oranı	2:1_ Log(e) StdSpm	2:1_ P
O75526	2	RNA binding motif protein X linked like 2	251	1	1	1	1	1
P00338	2	L lactate dehydrogenase A chain	816.73	1-2	0.79	-0.24	0.06	0.00
P00558	2	Phosphoglycerate kinase 1	424	1-2	0.81	-0.21	0.07	0.00
P04075	2	Fructose bisphosphate aldolase A	543	1-2	0.82	-0.20	0.07	0.00
P04406	2	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	6947	1-2	0.66	-0.42	0.02	0.00
P05386	2	60S acidic ribosomal protein P1	1709	1-2	0.53	-0.64	0.09	0.00
P06454	2	Prothymosin alpha	5027	1-2	0.41	-0.89	0.10	0.00
P06733	2	Alpha enolase	1243	1-2	0.79	-0.23	0.03	0.00
P06744	2	Glucose 6 phosphate isomerase	123	1-2	0.64	-0.45	0.08	0.00
P06748	2	Nucleophosmin	1542	1-2	0.59	-0.53	0.05	0.00
P07195	2	L lactate dehydrogenase	621	1-2	0.79	-0.24	0.03	0.00
P07437	2	Tubulin beta chain	11346	1-2	0.79	-0.23	0.02	0.00
P07737	2	Profilin 1	2627	1-2	0.64	-0.44	0.03	0.00
P07900	2	Heat shock protein HSP 90 alpha	1277	1-2	0.68	-0.38	0.04	0.00
P08107	2	Heat shock 70 kDa protein 1A 1B	843	1-2	0.76	-0.28	0.11	0.00
P08238	2	Heat shock protein HSP 90 beta	2127	1-2	0.68	-0.38	0.02	0.00
P09104	2	Gamma enolase	419	1-2	0.57	-0.56	0.22	0.00
P09211	2	Glutathione S transferase P	579	1-2	0.70	-0.36	0.06	0.00
P09429	2	High mobility group protein B1	736	1-2	0.79	-0.23	0.06	0.00
P09651	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1568	1-2	0.60	-0.51	0.03	0.00
P10809	2	60 kDa heat shock protein	702	1-2	0.72	-0.33	0.04	0.00

P11142	2	Heat shock cognate 71 kDa protein	2300	1-2	0.63	-0.47	0.03	0.00
P12277	2	Creatine kinase B type	317	1-2	0.79	-0.23	0.06	0.00
P13639	2	Elongation factor 2	447	1-2	0.66	-0.41	0.04	0.00
P13929	2	Beta enolase	417	1-2	0.57	-0.57	0.21	0.00
P14618	2	Pyruvate kinase isozymes M1 M2	1760	1-2	0.72	-0.33	0.02	0.00
P14625	2	Endoplasmin	131	1-2	0.78	-0.25	0.08	0.00
P14866	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	183	1-2	0.67	-0.40	0.10	0.00
P16401	2	Histone H1 5	592	1-2	0.56	-0.58	0.06	0.00
P17066	2	Heat shock 70 kDa protein 6	848	1-2	0.55	-0.59	0.17	0.00
P22392	2	Nucleoside diphosphate kinase B	2350	1-2	0.73	-0.32	0.06	0.00
P22626	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 B1	805	1-2	0.63	-0.47	0.04	0.00
P23528	2	Cofilin 1	10887	1-2	0.73	-0.32	0.03	0.00
P26583	2	High mobility group protein B2	415	1-2	0.69	-0.37	0.08	0.00
P30613	2	Pyruvate kinase isozymes R L	161	1-2	0.63	-0.46	0.13	0.00
P31943	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	176	1-2	0.71	-0.34	0.06	0.00
P32119	2	Peroxiredoxin 2	808	1-2	0.56	-0.58	0.13	0.00
P33778	2	Histone H2B type 1 B	6189	1-2	0.57	-0.56	0.06	0.00
P40926	2	Malate dehydrogenase mitochondrial	2298	1-2	0.66	-0.41	0.03	0.00
P49411	2	Elongation factor Tu mitochondrial	285	1-2	0.65	-0.43	0.09	0.00
P52565	2	Rho GDP dissociation inhibitor 1	448	1-2	0.72	-0.33	0.07	0.00
P60174	2	Triosephosphate isomerase	2749	1-2	0.80	-0.22	0.03	0.00
P61604	2	10 kDa heat shock protein mitochondrial	467	1-2	0.82	-0.20	0.06	0.00
P61978	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	189	1-2	0.64	-0.45	0.05	0.00

P61981	2	14 3 3 protein gamma	733	1-2	0.79	-0.23	0.06	0.00
P62158	2	Calmodulin	1809	1-2	0.63	-0.46	0.06	0.00
P62258	2	14 3 3 protein epsilon	926	1-2	0.70	-0.36	0.05	0.00
P62805	2	Histone H4	26679	1-2	0.65	-0.43	0.02	0.00
P62826	2	GTP binding nuclear protein Ran	218	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
P62937	2	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	3493	1-2	0.53	-0.63	0.03	0.00
P68032	2	Actin alpha cardiac muscle 1	5539	1-2	0.60	-0.51	0.05	0.00
P68104	2	Elongation factor 1 alpha 1	3513	1-2	0.59	-0.52	0.03	0.00
P78371	2	T complex protein 1 subunit beta	232	1-2	0.64	-0.44	0.10	0.00
Q00839	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	816	1-2	0.63	-0.46	0.03	0.00
Q05639	2	Elongation factor 1 alpha 2	1543	1-2	0.59	-0.53	0.03	0.00
Q06830	2	Peroxiredoxin 1	441	1-2	0.73	-0.31	0.05	0.00
Q08211	2	ATP dependent RNA helicase A	84	1-2	0.60	-0.51	0.08	0.00
Q13509	2	Tubulin beta 3 chain	9937	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
Q13838	2	Spliceosome RNA helicase BAT1	190	1	1	1	1	1
Q14103	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	213	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
Q16658	2	Fascin	352	1-2	0.79	-0.24	0.03	0.00
Q562R1	2	Beta actin like protein 2	1396	1-2	0.21	-1.55	0.09	0.00
Q58FF8	2	Putative heat shock protein HSP 90 beta 2	418	1-2	0.49	-0.71	0.19	0.00
Q58FG0	2	Putative heat shock protein HSP 90 alpha A5	291	1-2	0.47	-0.75	0.42	0.00
Q71U36	2	Tubulin alpha 1A chain	5172	1-2	0.64	-0.44	0.03	0.00
Q71UI9	2	Histone H2A V	6608	1-2	0.57	-0.57	0.03	0.00
Q8N7X1	2	RNA binding motif protein X linked like 3	254	1	1	1	1	1

Q92841	2	Probable ATP dependent RNA helicase DDX17	112	1-2	0.39	-0.95	0.11	0.00
Q9BYX7	2	Putative beta actin like protein 3	2700	1-2	0.35	-1.06	0.27	0.00
Q9H4B7	2	Tubulin beta 1 chain	1185	1-2	0.52	-0.66	0.19	0.00
Q9Y6H1	2	Coiled coil helix coiled coil helix domain containing protein 2 mitochondrial	963	2	2	2	2	2
P62805	2	Histone H4	26679	1-2	0.65	-0.43	0.02	0.00
P62826	2	GTP binding nuclear protein Ran	218	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
P62937	2	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	3493	1-2	0.53	-0.63	0.03	0.00
P68032	2	Actin alpha cardiac muscle 1	5539	1-2	0.60	-0.51	0.05	0.00
P68104	2	Elongation factor 1 alpha 1	3513	1-2	0.59	-0.52	0.03	0.00
P78371	2	T complex protein 1 subunit beta	232	1-2	0.64	-0.44	0.10	0.00
Q00839	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	816	1-2	0.63	-0.46	0.03	0.00
Q05639	2	Elongation factor 1 alpha 2	1543	1-2	0.59	-0.53	0.03	0.00
Q06830	2	Peroxiredoxin 1	441	1-2	0.73	-0.31	0.05	0.00
Q08211	2	ATP dependent RNA helicase A	84	1-2	0.60	-0.51	0.08	0.00
Q13509	2	Tubulin beta 3 chain	9937	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
Q13838	2	Spliceosome RNA helicase BAT1	190	1	1	1	1	1
Q14103	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	213	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
Q16658	2	Fascin	352	1-2	0.79	-0.24	0.03	0.00
Q562R1	2	Beta actin like protein 2	1396	1-2	0.21	-1.55	0.09	0.00
Q58FF8	2	Putative heat shock protein HSP 90 beta 2	418	1-2	0.49	-0.71	0.19	0.00
Q58FG0	2	Putative heat shock protein HSP 90 alpha A5	291	1-2	0.47	-0.75	0.42	0.00
Q71U36	2	Tubulin alpha 1A chain	5172	1-2	0.64	-0.44	0.03	0.00

Q71UI9	2	Histone H2A V	6608	1-2	0.57	-0.57	0.03	0.00
Q8N7X1	2	RNA binding motif protein X linked like 3	254	1	1	1	1	1
Q92841	2	Probable ATP dependent RNA helicase DDX17	112	1-2	0.39	-0.95	0.11	0.00
Q9BYX7	2	Putative beta actin like protein 3 OS	2700	1-2	0.35	-1.06	0.27	0.00
Q9H4B7	2	Tubulin beta 1 chain	1185	1-2	0.52	-0.66	0.19	0.00
Q9Y6H1	2	Coiled coil helix coiled coil helix domain containing protein 2 mitochondrial	963	2	2	2	2	2

#### 4.2.3. Kontrol- MPTP Karşılaştırmaları

PLGS analizi ile, kontrol grubu ve MPTP grubu arasında, içerdikleri proteinlerin nanogramları baz alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Proteinler, Uniprot protein data bankasındaki erişim numaraları ve adlarıyla, Çizelge 4.3'te belirtilmiştir. Çizelgede bahsi geçen 2:1 oranı, bahsedilen proteinin nanogramını MPTP/kontrol olarak belirtir. 2:1\_P ise t-test oranını belirtir. Çizelgedeki grup sütununda yer alan 1 ve 2 değerleri, bahsedilen proteinin sadece 1 (kontrol) ya da 2'de (MPTP) görüldüğünü belirtir.

**Çizelge.4.3.** Kontrol ve MPTP grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.

Erişim No	OK	Protein Adı	PLGS Skoru	Grup	2:1_Oranı	2:1_Log(e) Oranı	2:1_Log(e) StdSpma	2:1_P
O75526	2	RNA binding motif protein X linked like 2	251	1	1	1	1	1
P04406	2	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	6947	1-2	0.76	-0.28	0.03	0.00
P09429	2	High mobility group protein B1	736	1-2	0.75	-0.29	0.07	0.00
P11142	2	Heat shock cognate 71 kDa protein	2300	1-2	0.77	-0.26	0.02	0.00
P13929	2	Beta enolase	417	1-2	0.77	-0.26	0.25	0.02
P15531	2	Nucleoside diphosphate kinase A	2425	1-2	1.95	0.67	0.19	1.00
P16401	2	Histone H1 5	592	1-2	0.59	-0.53	0.07	0.00
P27348	2	14 3 3 protein theta	329	1-2	1.22	0.20	0.06	1.00
P33778	2	Histone H2B type 1 B	6189	1-2	0.70	-0.36	0.09	0.00

P49458	2	Signal recognition particle 9 kDa protein	612	2	2	2	2	2
P54652	2	Heat shock related 70 kDa protein 2	1731	1-2	0.79	-0.24	0.12	0.00
P62158	2	Calmodulin	1809	1-2	0.66	-0.42	0.09	0.00
P62805	2	Histone H4	26679	1-2	0.66	-0.41	0.02	0.00
P62937	2	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	3493	1-2	0.78	-0.25	0.07	0.00
P63261	2	Actin cytoplasmic 2	10879	1-2	0.80	-0.22	0.02	0.00
P68032	2	Actin alpha cardiac muscle 1	5539	1-2	0.73	-0.32	0.04	0.00
P68104	2	Elongation factor 1 alpha 1	3513	1-2	0.73	-0.31	0.03	0.00
Q05639	2	Elongation factor 1 alpha 2	1543	1-2	0.76	-0.28	0.04	0.00
Q6S8J3	2	POTE ankyrin domain family member E	3025	1-2	0.76	-0.27	0.15	0.00
Q71UI9	2	Histone H2A V	6608	1-2	0.68	-0.38	0.04	0.00
Q99867	2	Putative tubulin beta 4q chain	1191	1-2	0.50	-0.70	0.16	0.00
Q9H4B7	2	Tubulin beta 1 chain	1185	1-2	0.68	-0.38	0.22	0.01

#### 4.2.4. Kontrol- Antimisin A Karşılaştırmaları

PLGS analizi ile, kontrol grubu ve antimisin a grubu arasında, içerdikleri proteinlerin nanogramları baz alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Proteinler, Uniprot protein data bankasındaki erişim numaraları ve adlarıyla, Çizelge 4.4'te belirtilmiştir. Çizelgede bahsi geçen 2:1 oranı, bahsedilen proteinin nanogramını antimisin a/kontrol olarak belirtir. 2:1\_P ise t-test oranını belirtir. Çizelgedeki grup sütununda yer alan 1 ve 2 değerleri, bahsedilen proteinin sadece 1 (kontrol) ya da 2'de (antimisin) görüldüğünü belirtir.

**Çizelge 4.4.** Kontrol ve Antimisin A grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.

Erişim No.	OK	Protein Adı	PLGS Skoru	Grup	2:1_Oranı	2:1_Log(e) Oranı	2:1_Log(e) StdSpma	2:1
P07195	2	L lactate dehydrogenase B chain	621	1-2	0.74	-0.30	0.04	0.00
P10809	2	60 kDa heat shock protein mitochondrial	702	1-2	0.78	-0.25	0.04	0.00

P60174	2	Triosephosphate isomerase	2749	1-2	0.81	-0.21	0.03	0.00
P17066	2	Heat shock 70 kDa protein 6	848	1-2	0.81	-0.21	0.17	0.02
P04350	2	Tubulin beta 4 chain	4695	1-2	0.70	-0.36	0.12	0.00
P16401	2	Histone H1 5	592	1-2	0.70	-0.36	0.05	0.00
P08238	2	Heat shock protein HSP 90 beta	2127	1-2	0.74	-0.30	0.03	0.00
Q6S8J3	2	POTE ankyrin domain family member E	3025	1-2	0.58	-0.54	0.14	0.00
P13929	2	Beta enolase	417	1-2	0.66	-0.41	0.29	0.02
P09651	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1568	1-2	0.53	-0.63	0.04	0.00
Q562R1	2	Beta actin like protein 2	1396	1-2	0.22	-1.50	0.14	0.00
Q71UI9	2	Histone H2A V	6608	1-2	0.81	-0.21	0.03	0.00
Q8N7X1	2	RNA binding motif protein X linked like 3	254	1	1	1	1	1
P63261	2	Actin cytoplasmic 2	10879	1-2	0.58	-0.55	0.02	0.00
Q08211	2	ATP dependent RNA helicase A	84	1-2	0.62	-0.48	0.08	0.00
Q06830	2	Peroxiredoxin 1	441	1-2	0.73	-0.31	0.05	0.00
P07437	2	Tubulin beta chain	11346	1-2	0.55	-0.60	0.04	0.00
P14866	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	183	1-2	0.55	-0.60	0.21	0.00
P62158	2	Calmodulin	1809	1-2	0.67	-0.40	0.05	0.00
P32119	2	Peroxiredoxin 2	808	1-2	0.59	-0.53	0.08	0.00
P62937	2	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	3493	1-2	0.56	-0.58	0.04	0.00
Q92621	2	Nuclear pore complex protein Nup205	98	1-2	0.30	-1.20	0.07	0.00
P07737	2	Profilin 1	2627	1-2	0.66	-0.41	0.04	0.00
P52565	2	Rho GDP dissociation inhibitor 1	448	1-2	0.74	-0.30	0.10	0.00
P34931	2	Heat shock 70 kDa protein 1 like	841	1-2	0.66	-0.41	0.21	0.00
P09429	2	High mobility group protein B1	736	1-2	0.47	-0.75	0.08	0.00



P57053	2	Histone H2B type F	10888	2	2	2	2	2
P22392	2	Nucleoside diphosphate kinase B	2350	1-2	0.70	-0.36	0.06	0.00
P68363	2	Tubulin alpha 1B chain	5337	1-2	0.51	-0.67	0.03	0.00
P27348	2	14 3 3 protein theta	329	1-2	0.76	-0.27	0.08	0.00
P05386	2	60S acidic ribosomal protein P1	1709	1-2	0.43	-0.84	0.20	0.00
P61981	2	14 3 3 protein gamma	733	1-2	0.58	-0.55	0.06	0.00
P14618	2	Pyruvate kinase isozymes M1 M2	1760	1-2	0.73	-0.31	0.03	0.00
P06454	2	Prothymosin alpha	5027	1-2	0.28	-1.28	0.09	0.00
P31943	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	176	1-2	0.69	-0.37	0.07	0.00
P61978	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	189	1-2	0.70	-0.35	0.04	0.00
P62258	2	14 3 3 protein epsilon	926	1-2	0.54	-0.62	0.09	0.00
Q00839	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	816	1-2	0.68	-0.39	0.04	0.00
P09211	2	Glutathione S transferase P	579	1-2	0.70	-0.36	0.07	0.00
P06748	2	Nucleophosmin	1542	1-2	0.43	-0.85	0.05	0.00
Q13509	2	Tubulin beta 3 chain	9937	1-2	0.46	-0.77	0.05	0.00
P22626	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 B1	805	1-2	0.60	-0.51	0.05	0.00
P08107	2	Heat shock 70 kDa protein 1A 1B	843	1-2	0.73	-0.31	0.11	0.00
P06733	2	Alpha enolase	1243	1-2	0.68	-0.38	0.03	0.00
Q16658	2	Fascin	352	1-2	0.73	-0.32	0.05	0.00
Q13838	2	Spliceosome RNA helicase BAT1	190	1	1	1	1	1
Q9Y281	2	Cofilin 2	856	1-2	0.79	-0.23	0.27	0.05
Q14103	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	213	1-2	0.56	-0.58	0.07	0.00
Q16629	2	Serine arginine rich splicing factor 7	322	2	2	2	2	2
P04075	2	Fructose bisphosphate aldolase A	543	1-2	0.71	-0.34	0.07	0.00

Q05639	2	Elongation factor 1 alpha 2	1543	1-2	0.68	-0.39	0.04	0.00
P49411	2	Elongation factor Tu mitochondrial	285	1-2	0.41	-0.88	0.16	0.00
P11142	2	Heat shock cognate 71 kDa protein	2300	1-2	0.68	-0.38	0.02	0.00
P68104	2	Elongation factor 1 alpha 1	3513	1-2	0.64	-0.44	0.02	0.00
P62826	2	GTP binding nuclear protein Ran	218	1-2	0.61	-0.49	0.05	0.00
P63104	2	14 3 3 protein zeta delta	298	1-2	0.69	-0.37	0.06	0.00
P13639	2	Elongation factor 2	447	1-2	0.64	-0.44	0.05	0.00
P23528	2	Cofilin 1	10887	1-2	0.63	-0.46	0.03	0.00
P62805	2	Histone H4	26679	1-2	0.57	-0.56	0.02	0.00

#### 4.2.5. Kontrol- Oligomisin Karşılaştırmaları

PLGS analizi ile, kontrol grubu ve oligomisin grubu arasında, içerdikleri proteinlerin nanogramları baz alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Proteinler, Uniprot protein data bankasındaki erişim numaraları ve adlarıyla, Çizelge 4.5'te belirtilmiştir. Çizelgede bahsi geçen 2:1 oranı, bahsedilen proteinin nanogramını oligomisin/kontrol olarak belirtir. 2:1\_P ise t-test oranını belirtir. Çizelgedeki grup sütununda bulunan 1 ve 2 değerleri, bahsedilen proteinin sadece 1 (kontrol) ya da 2'de (oligomisin) görüldüğünü belirtir.

**Çizelge 4.5.** Kontrol ve Oligomisin grubunun PLGS analizi ile karşılaştırma sonucu.

Erişim No.	OK	Protein Adı	PLGS Skoru	Grup	2:1_Oranı	2:1_Log(e) Oranı	2:1_Log(e) StdSpma	2:1_P
P00338	2	L lactate dehydrogenase A chain	816	1-2	0.70	-0.35	0.04	0.00
P00558	2	Phosphoglycerate kinase 1	424	1-2	0.69	-0.37	0.04	0.00
P04406	2	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	6947	1-2	0.68	-0.38	0.02	0.00
P05386	2	60S acidic ribosomal protein P1	1709	1-2	0.49	-0.71	0.06	0.00
P06454	2	Prothymosin alpha	5027	1-2	0.53	-0.64	0.05	0.00
P06733	2	Alpha enolase	1243	1-2	0.61	-0.50	0.02	0.00

P06748	2	Nucleophosmin	1542	1-2	0.54	-0.62	0.04	0.00
P07195	2	L lactate dehydrogenase B chain	621	1-2	0.64	-0.44	0.03	0.00
P07437	2	Tubulin beta chain	11346	1-2	0.50	-0.70	0.02	0.00
P07737	2	Profilin 1	2627	1-2	0.58	-0.55	0.03	0.00
P07900	2	Heat shock protein HSP 90 alpha	1277	1-2	0.69	-0.37	0.03	0.00
P08107	2	Heat shock 70 kDa protein 1A 1B	843	1-2	0.77	-0.26	0.10	0.00
P08238	2	Heat shock protein HSP 90 beta	2127	1-2	0.61	-0.50	0.02	0.00
P09211	2	Glutathione S transferase P	579	1-2	0.54	-0.61	0.05	0.00
P09429	2	High mobility group protein B1	736	1-2	0.46	-0.78	0.07	0.00
P09651	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1568	1-2	0.57	-0.56	0.03	0.00
P10809	2	60 kDa heat shock protein mitochondrial	702	1-2	0.62	-0.48	0.04	0.00
P11021	2	78 kDa glucose regulated protein	188	1-2	0.71	-0.34	0.04	0.00
P11142	2	Heat shock cognate 71 kDa protein	2300	1-2	0.54	-0.62	0.02	0.00
P12277	2	Creatine kinase B type	317	1-2	0.64	-0.44	0.06	0.00
P13639	2	Elongation factor 2	447	1-2	0.59	-0.53	0.04	0.00
P14618	2	Pyruvate kinase isozymes M1 M2	1760	1-2	0.63	-0.47	0.02	0.00
P14625	2	Endoplasmic	131	1-2	0.66	-0.41	0.06	0.00
P16401	2	Histone H1 5	592	1-2	0.63	-0.46	0.05	0.00
P16949	2	Stathmin	2116	1-2	0.69	-0.37	0.03	0.00
P22626	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 B1	805	1-2	0.64	-0.44	0.03	0.00
P23528	2	Cofilin 1	10887	1-2	0.58	-0.55	0.03	0.00
P26583	2	High mobility group protein B2 OS	415	1-2	0.66	-0.41	0.11	0.00
P27348	2	14 3 3 protein theta	329	1-2	0.72	-0.33	0.06	0.00

P30613	2	Pyruvate kinase isozymes R L	161	1-2	0.55	-0.60	0.15	0.00
P31943	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	176	1-2	0.67	-0.40	0.05	0.00
P32119	2	Peroxiredoxin 2	808	1-2	0.66	-0.42	0.06	0.00
P40926	2	Malate dehydrogenase mitochondrial	2298	1-2	0.63	-0.46	0.03	0.00
P60174	2	Triosephosphate isomerase	2749	1-2	0.67	-0.40	0.02	0.00
P61604	2	10 kDa heat shock protein mitochondrial	467	1-2	0.61	-0.50	0.14	0.00
P61978	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	189	1-2	0.66	-0.42	0.04	0.00
P61981	2	14 3 3 protein gamma	733	1-2	0.58	-0.55	0.04	0.00
P62158	2	Calmodulin	1809	1-2	0.59	-0.52	0.03	0.00
P62258	2	14 3 3 protein epsilon	926	1-2	0.55	-0.59	0.05	0.00
P62805	2	Histone H4	26679	1-2	0.71	-0.34	0.02	0.00
P62826	2	GTP binding nuclear protein Ran	218	1-2	0.58	-0.55	0.05	0.00
P62937	2	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	3493	1-2	0.50	-0.69	0.02	0.00
P63104	2	14 3 3 protein zeta delta	298	1-2	0.59	-0.53	0.05	0.00
P68104	2	Elongation factor 1 alpha 1	3513	1-2	0.62	-0.48	0.02	0.00
P68363	2	Tubulin alpha 1B chain	5337	1-2	0.51	-0.67	0.02	0.00
Q00839	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	816	1-2	0.64	-0.45	0.03	0.00
Q02878	2	60S ribosomal protein L6	193	1-2	0.62	-0.48	0.07	0.00
Q05639	2	Elongation factor 1 alpha 2	1543	1-2	0.64	-0.45	0.03	0.00
Q06830	2	Peroxiredoxin 1	441	1-2	0.60	-0.51	0.04	0.00
Q13509	2	Tubulin beta 3 chain	9937	1-2	0.52	-0.66	0.04	0.00
Q13838	2	Spliceosome RNA helicase BAT1	190	1	1	1	1	1
Q14103	2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	213	1-2	0.52	-0.66	0.05	0.00
Q16658	2	Fascin	352	1-2	0.58	-0.54	0.04	0.00

Q562R1	2	Beta actin like protein 2	1396	1-2	0.75	-0.29	0.05	0.00
Q58FF8	2	Putative heat shock protein HSP 90 beta 2	418	1-2	0.55	-0.59	0.18	0.00
Q6S8J3	2	POTE ankyrin domain family member E	3025	1-2	3.32	1.20	0.10	1.00
Q71UI9	2	Histone H2A V	6608	1-2	0.74	-0.30	0.03	0.00
Q8N7X1	2	RNA binding motif protein X linked like 3	254	1	1	1	1	1
Q99867	2	Putative tubulin beta 4q chain	1191	1-2	0.63	-0.47	0.45	0.01
Q9H4B7	2	Tubulin beta 1 chain	1185	1-2	0.52	-0.65	0.17	0.00

### 4.3. PCA Sonuçları

SH-SY5Y mitokondriyal disfonksiyon hücre modellerinden elde edilen proteom MS ve MS/MS deneyleri sonucunda tespit edilmiş ve sonucunda 380 adet yüksek güvenilirlikte protein tanımlaması yapılmıştır. PLGS ile nanogram miktarları tayin edilen proteinler PCA ile analiz edilmiştir.

Dataların işlenebilmesi ve anlamlı sonuçları tespit edebilmek için PCA analizi kullanılmıştır. Elde edilen verilerle gruplar arasındaki farklılıkları göstermek amaçlanmıştır. PCA analiziyle datanın çok boyutluluğu, faktörler arasında kovaryans analizi yapılarak iki boyuta indirgenir ve gözlemlenebilecek hale getirilir. Kovaryans matrislerinden eigen vektörleri ve eigen değerleri bulunur. Bunlar bir datayı temsil eden temel unsurlar olarak düşünülebilir. Kovaryans analizi her zaman iki faktör arasında olur. Üç faktör ile kovaryans analizi: x-y, y-z- x-z arasındadır. Faktörler arttığında PCA analizi data özeti için kullanışlı bir metod haline gelmektedir.

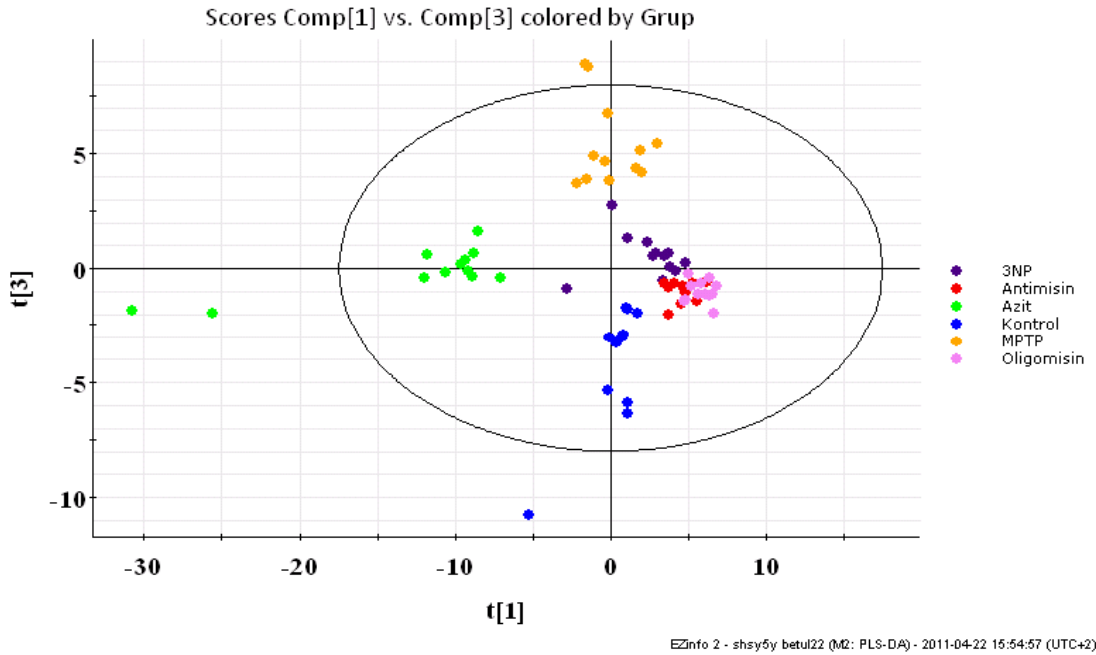
#### 4.3.1. PLS-DA Kullanarak Tüm Grup Farklılıklarının Belirlenmesi

Altı adet grubun her birine ait olan dört örneğin üçlü tekrarlarıyla elde edilen 72 adet gözlem PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis) kullanılarak tanımlanmıştır. Ölçek olarak çok değişkenli sistem kullanılmıştır. Çizelge 4.6'da, kullanılan datanın özeti verilmiştir. Bu çizelgede, gözlemler tüm gruplara ait tüm tekrarları içermektedir. Dahil edilenler, bu analiz için kullanılan gözlemleri belirtir. Değişkenler, bu analizin oluşturulması için değerlendirilen protein sayısını ifade eder. Komponentler, grupların ayrılabilmesi için gereken minimum protein sayısını gösterir. Ölçek olarak seçilen uni-varied (UV), proteomik analizleri için tercih edilen bir skaladır. Bu skala, daha geniş ölçekte protein grubunu analize dahil eder.

**Çizelge 4.6.** Tüm gruplar için PLS-DA data tanım özeti.

<b>Gözlemler</b>	72	
Dahil Edilenler	72	
Dahil Edilmeyenler	0	
<b>Değişkenler</b>	379	
Gruplar	Kontrol, MPTP, 3-NP, Antimisin, Oligomisin	
X Değişkenleri	369	
Dahil Edilmeyenler	10	O75526, P00330, P03106, ...
Üretilen	0	
<b>Model</b>	<b>PLS-DA</b>	
Ölçek	UV	
Dönüşüm	Hiçbiri	
Komponentler	6	
<b>Gürültü Seviyesi</b>	Bu datadaki gürültü seviyesi 31% 'dir. (Bu, ilerki gözlemlerde ortaya çıkacak olan tahmin hatasının (tahmin edilen ve gerçek değer arasındaki sapma) bu gürültü seviyesinde olacak demektir.)	

#### 4.3.1.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)

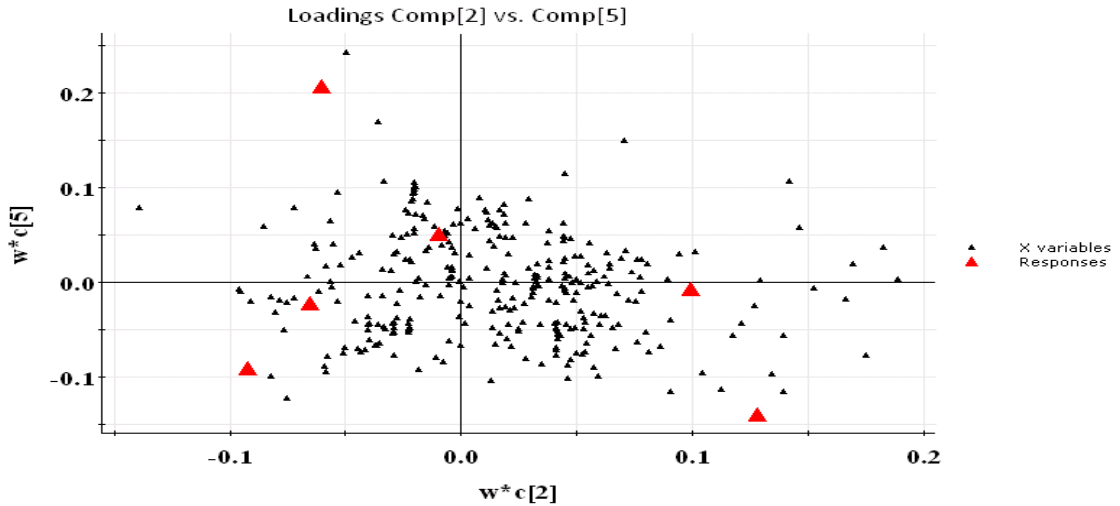


**Şekil 4.1.** Scores Plot grafiğinde tüm grupların gösterimi.

Gruplar arasındaki farklılığı gözlemek için PCA'nın scores plot grafiği kullanılmıştır. Bunlar, X değişkenlerinin doğru bir özetini çıkarabilmek için, orijinalerin ortalaması ölçülerek belirlenmiştir. Bu modelde altı tane skor vardır. Buna ek olarak PLS-DA skorları hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar hesaplanmıştır. Skorlardan t[1] ve t[2] datanın özeti ve ayrılması için seçilebilecek en önemli iki yeni indekstir. t[1] ve t[2]'nin plotı datanın bir resmini göstermektedir. Grafikteki her bir nokta bir gözlemin karşılığıdır.

Kontrolle beraber altı adet grup farklı renklerde gösterilmiştir (Şekil 4.1). Her gruptan dört farklı örnek ve her örneğin üçlü tekrarı olduğundan, bir gruba ait 12 adet nokta görülmektedir. Bu grafik, analiz sırasında belirlenen proteinlerdeki nanogram farkları baz alınarak oluşturulmuştur. Scores plotta gözlemlenen noktaların grup içinde birbirine yakın, gruplar arası ise birbirine nispeten uzak olması beklenir.

#### 4.3.1.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki (Loadings Plot)



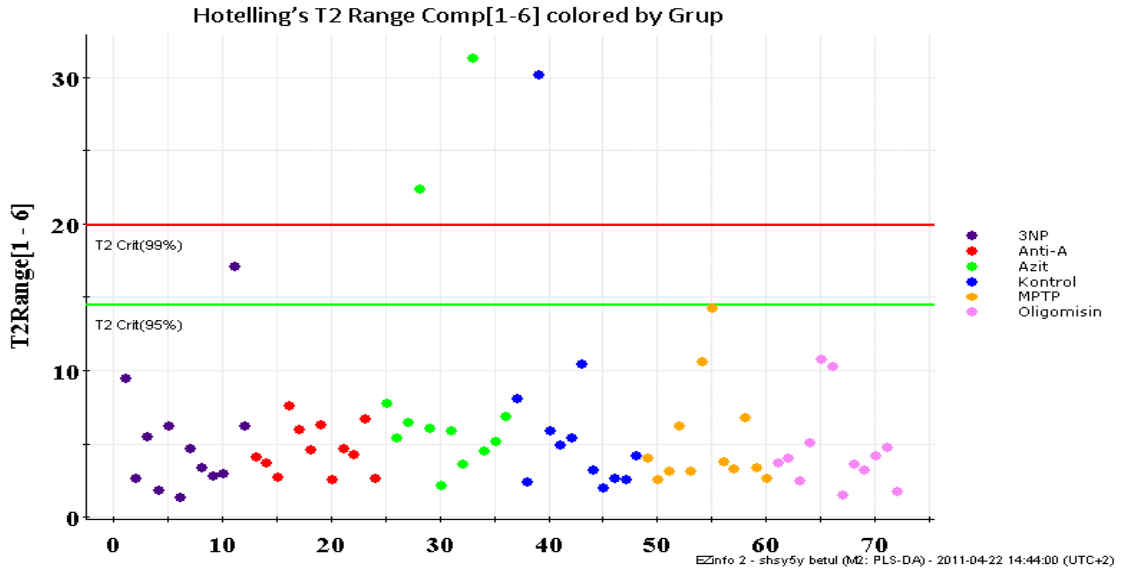
EZInfo 2 - shsy5y betul22 (M2: PLS-DA) - 2011-04-22 15:57:34 (UTC+2)

Şekil 4.2. Loadings Plot grafiğinde tüm grupların gösterimi.

Bu grafik data setimizdeki X değişkenlerinin birbirleriyle ve yanıtlarıyla nasıl ilişki kurduğunu göstermektedir. Bir önceki grafik olan scores plotla kombinasyon halinde olan bu tema, hangi X değişkenlerinin, gözlemin sağda, solda, yukarda ya da aşağıda olmasından sorumlu olduğunu açıklar.

Genel olarak, birbirlerine yakın olan X değişkenleri birbirleriyle çok daha fazla ilişkili olanlardır. Y'ye yakın olan X değerleri birbirleriyle daha sıkı ilişki içindedir ve orijinden daha uzaktır. Orijine yaklaştıkça korelasyon azalır. Karşıt çemberlerde ve orijinden uzak olan X değerleri birbirleriyle negative korelasyon gösterir. Birbirlerinden ne kadar uzaklarsa korelasyon zıtlığı o kadar artar.

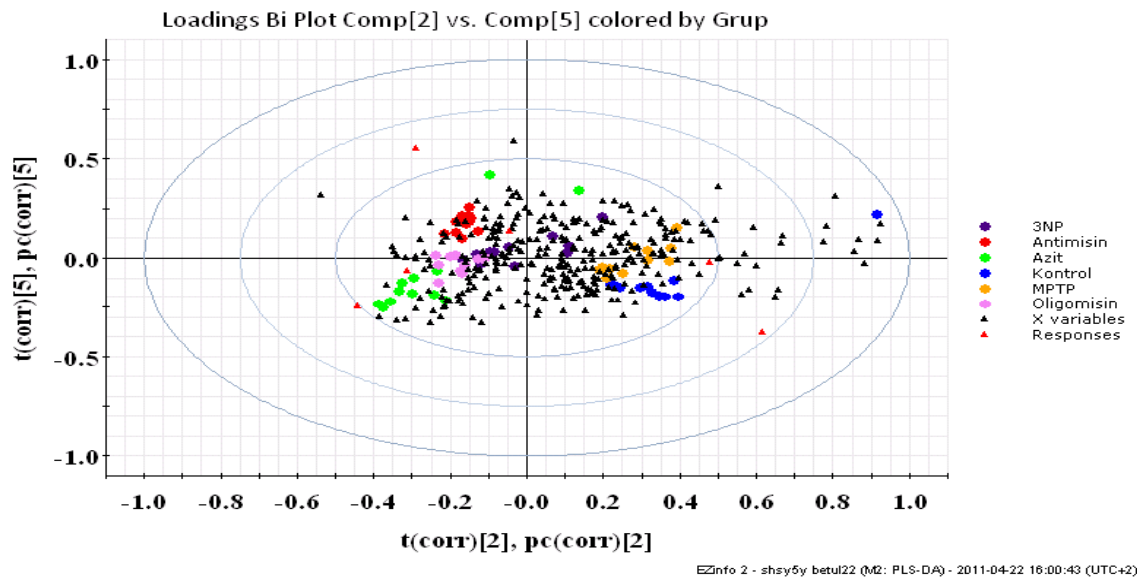
#### 4.3.1.3. Ekstrem Gözlemlerin Belirtilmesi (Hotellings T2)



Şekil 4.3. Hotelling's T2 dağılım grafiği ile tüm grupların gösterimi.

Hotelling's T2 dağılımı her bir gözlemin her bir modelleme merkezinden ne kadar uzak olduğu, ortalamadan ne kadar farklı olduğunu gösterdiğinden, tüm skorların özeti teşkil edecek bir grafiğdir. Buradaki Hotelling's grafiğinde altı adet skorun özeti görülmektedir. Gözlemler arasındaki mesafe ne kadar uzaksa, gözlemler arası fark o kadar fazladır. Yeşil veya kırmızı hatta yaklaşmış olan gözlemler, diğerlerine sırasıyla %5 ve %1'den daha az benziyor demektir.

#### 4.3.1.4. X değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi

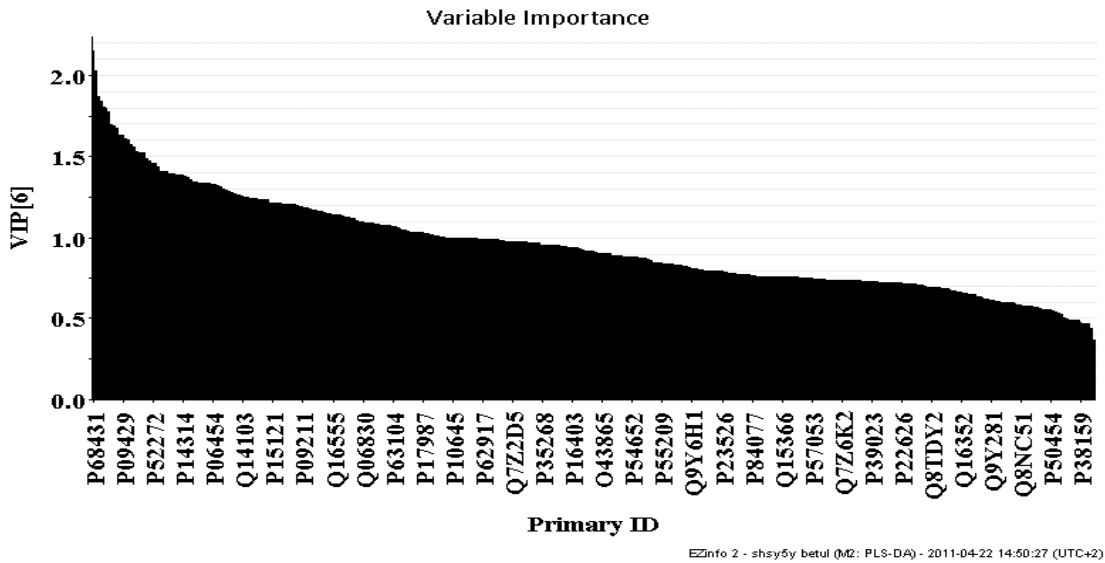


Şekil 4.4. Loadings Bi Plot Grafiği (Tüm Gruplar İçin)



X değişkenleri ve her bir gözlem arasındaki ilişki Loadings Bi Plot grafiğinde gözlemlenebilir. Bu temada; gözlemler (t'ler), X değişkenleri ve gruplar aynı grafikte gözlemlenebilir. Grafikteki çemberler çeşitli korelasyon seviyelerini göstermektedir. 1.0 (%100), 0.75 (%75) ve 0.5 (%50) mükemmel korelasyondan sıfır (%0) korelasyona (grafiğin ortası) kadar gösterilmektedir. Genel olarak bileşenlerdeki yakınlık, aralarında korelasyonun olduğunu belirtir. Böylece hangi X değişkenlerinin, hangi grupla pozitif korelasyonu olduğu saptanabilir.

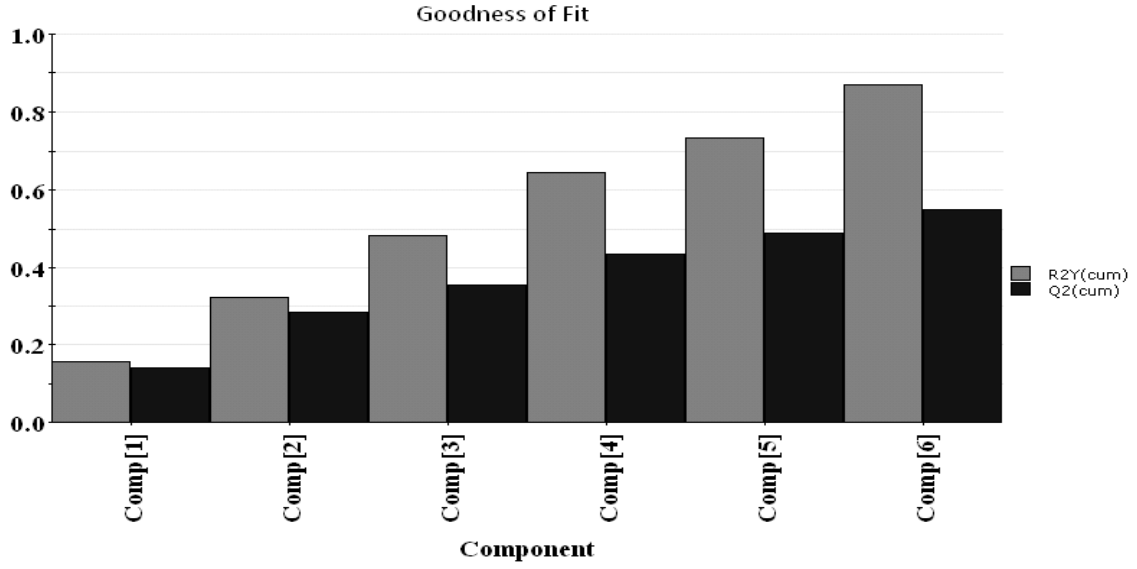
#### 4.3.1.5. Tahmini Değişken Önemi (VIP-Variable importance -in projection-)



Şekil 4.5. Tüm gruplar için tahmini değişken önemi grafiği.

VIP (variable importance, değişken önemi) değerleri, modellerdeki tüm X değişkenlerinin önemini yansıtan bir tablodur. PLS-DA ile belirlenen önem, proteinlerin grupların farklılaşmalarına ne kadar katkıları olup olmadığına göre değişir. Önemli değişkenlerin VIP değerleri  $\geq 1$  dir. Diğer tüm X değişkenlerinin yanında 1'e eşit ve 1'den büyük olan değerler, dominant X değerleridir. Buradaki grafiğe göre en önemli X değişkenleri: histon H3.1 (P68431), küçük nükleer ribonükleoprotein Sm D1 (P62314), serin/arjinin zengin, uç bileştirme faktörü 1 (Q07955), gliseraldehit-3fosfat dehidrogenaz (P04406), makrofaj göçü inhibe edici faktörü (P14174), tübülün beta zinrici (P07437), uzama faktörü Tu-mitokondriyal (P49411), heterojenöz nükleer ribonükleoprotein K (P61978), histon H4 (P62805), nükleofosmin (P06748), aldoz redüktaz (P15121), glutation S-transferaz (Q16555), peroksiredoksin 1 (Q06830), 14-3-3 protein zeta/ delta (P63104), glukozidaz 2, beta altünitesi (P14314)'dir.

#### 4.3.1.6. Goodness of Fit Grafiği



EZInfo 2 - shsy5y betul22 (M2: PLS-DA) - 2011-04-22 16:10:06 (UTC+2)

Şekil 4.6. Goodness of Fit Grafiği (Tüm Gruplar İçin)

Bu grafikte kaç komponentle (protein) birlikte grupların birbirlerinden ne kadar farklılaşacağı belirtilir.

#### 4.3.1.6. Sınıflandırma Özeti

Sınıflandırma özeti tablosunda, hangi gözlemlerin sınıflandırılabilirdiği gösterilmektedir. Çizelge 4.7'deki bilinmeyenler sütununda yer alan gözlemler, Hotelling's T2 tablosunda da belirtilmiş olan aykırı (outlier) gözlemlerdir.

Çizelge 4.7. Sınıflandırma Özeti Tablosu

Grup Adı	Gözlem Sayısı	Doğru Sınıflandırılmış Gözlem Sayısı	Yanlış Sınıflandırılmış Gözlem Sayısı	Bilinmeyenler
3NP	12	9	0	3
Anti-A	12	12	0	0
Azit	12	12	0	0
Kontrol	12	11	0	1
MPTP	12	12	0	0
Oligomisin	12	10	0	2

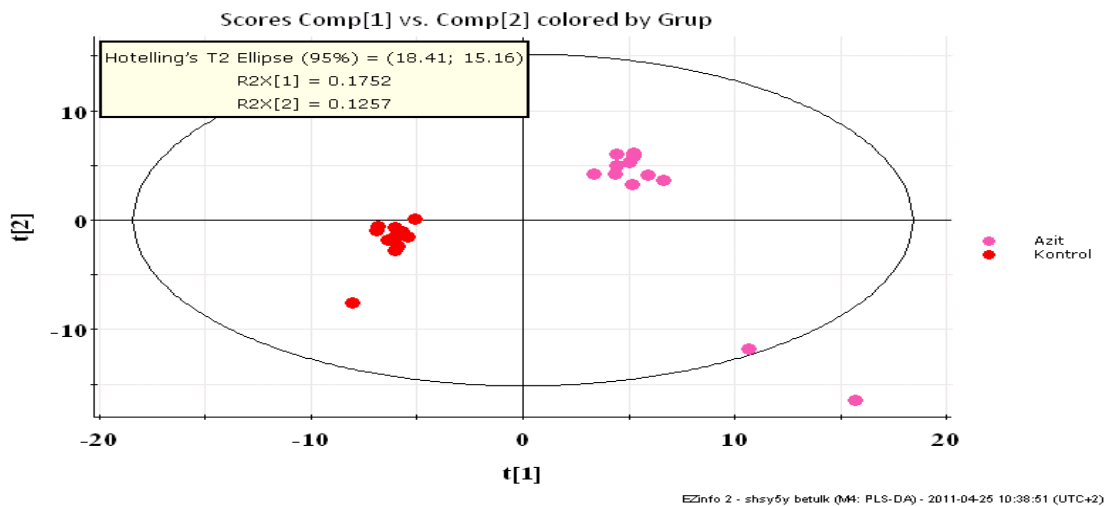
### 4.3.2. PLS-DA Kullanarak Kontrol-Soydum Azit Gruplarının Karşılaştırılması

PLS-DA modeli kullanılarak sodyum azit ile muamele edilmiş nöroblastoma hücreleri ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.8.** Kontrol ve Soydum Azit için PLS-DA data tanım özeti.

<b>Gözlemler</b>	72	
Dahil Edilenler	24	
Dahil Edilmeyenler	48	
Gruplar	2 Grup (Azit, Kontrol)	
<b>Değişkenler</b>	379	
X değişkenleri	289	
Dahil Edilmeyenler	90	A0AVI2, A2BFH1, B2RPK0, ...
Üretilen	0	
<b>Model</b>	PLS-DA	
Ölçek	UV	
Dönüşüm	Hiçbiri	
Komponentler	3	
<b>Gürültü Seviyesi</b>	Bu datadaki gürültü seviyesi 4% 'dir.	

#### 4.3.2.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)

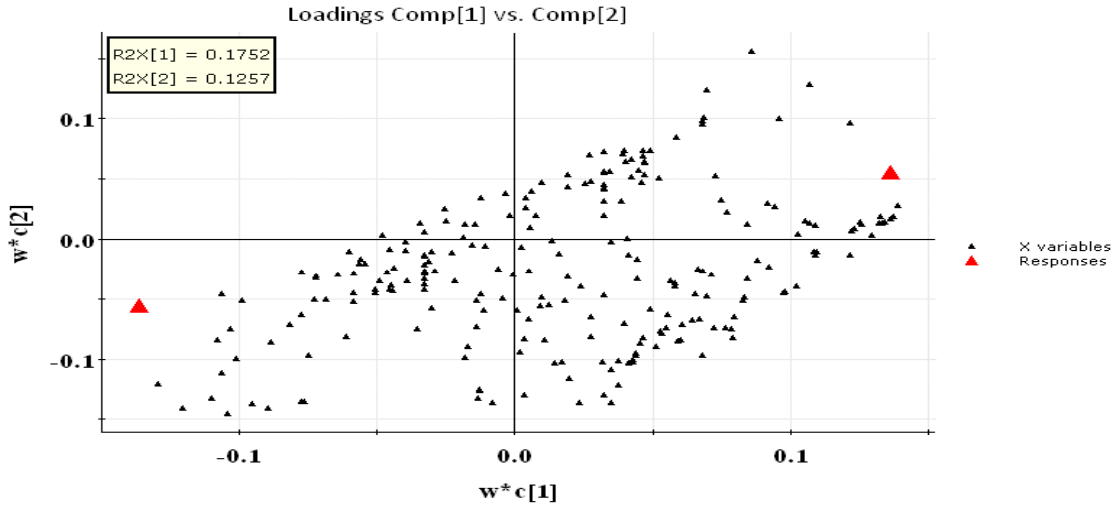


**Şekil 4.7.** Scores Plot grafiğinde Kontrol ve Soydum Azit gruplarının gösterimi.

Kontrolle karşı soydum azit grubu farklı renklerde gösterilmiştir. Her gruptan dört farklı örnek ve her örneğin üçlü tekrarı olduğundan, bir gruba ait 12 adet nokta görülmektedir. Bu grafik, analiz sırasında belirlenen proteinlerdeki nanogram farkları baz

alınarak oluşturulmuştur. Score plotta gözlemlenen grafikteki noktaların grup içinde birbirine yakın, gruplar arası ise birbirine uzak olması beklenir.

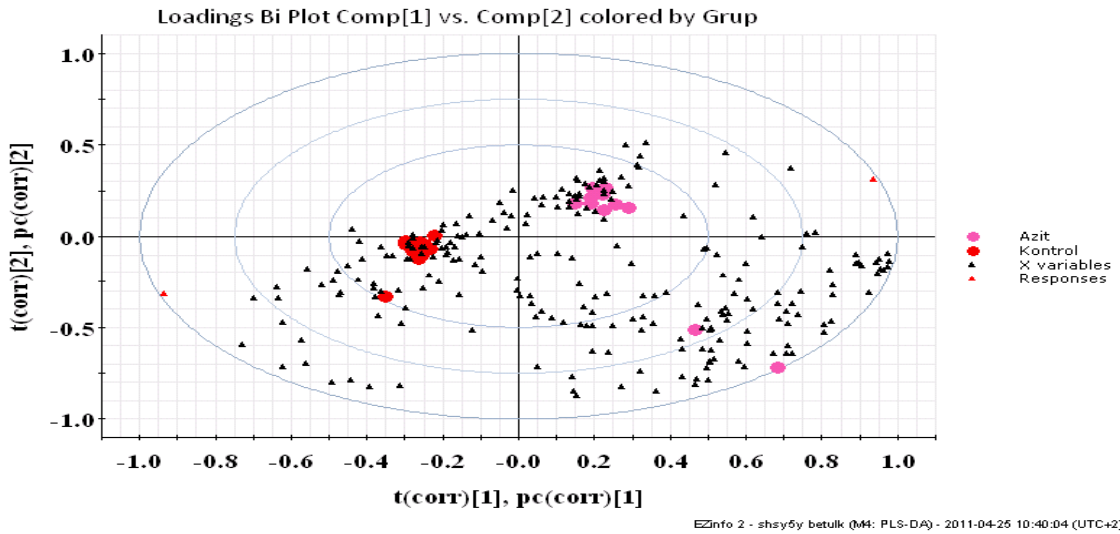
#### 4.3.2.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki



Şeki 4.8. Loadings Plot grafiğinde Kontrol ve Soydum azit gruplarının gösterimi.

Genel olarak, birbirlerine yakın olan X değişkenleri birbirleriyle çok daha fazla ilişkili olanlardır. Y'ye yakın olan X değerleri birbirleriyle daha sıkı ilişki içindedir ve orijinden daha uzaktır. Orijine yaklaştıkça korelasyon azalır. Karşıt çemberlerde ve orijinden uzak olan X değerleri birbirleriyle negative korelasyon gösterir. Birbirlerinden ne kadar uzaklarsa korelasyon zıtlığı o kadar artar.

#### 4.3.2.3. X değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi

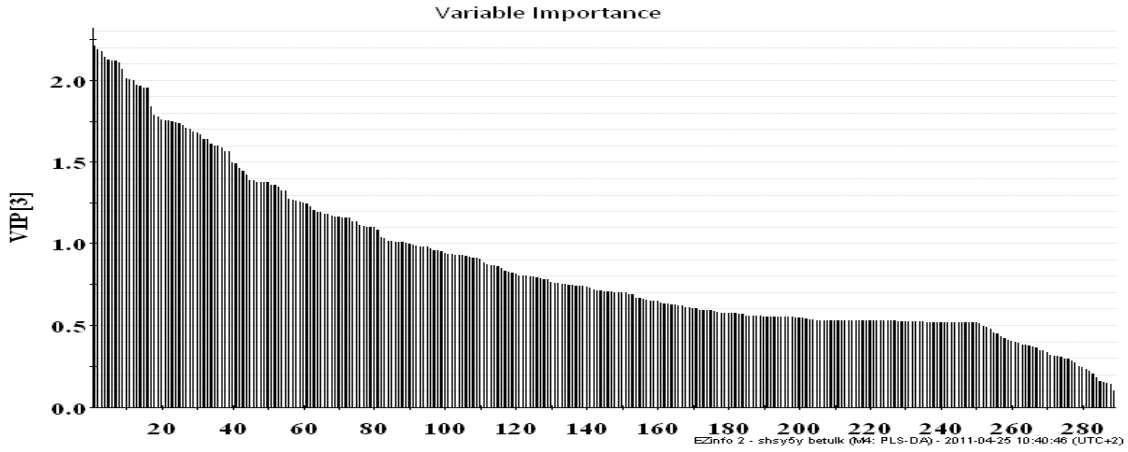


Şekil 4.9. Loadings Bi Plot Grafiği (Kontrol ve Sodyum azit Grubu İçin)

X değişkenleri ve her bir gözlem arasındaki ilişki Loadings Bi Plot grafiğinde gözlemlenebilir. Bu temada; gözlemler (t'ler), x değişkenleri ve gruplar aynı grafikte

gözlemlenebilir. Grafikteki çemberler çeşitli korelasyon seviyelerini göstermektedir. 1.0 (%100), 0.75 (%75) ve 0.5 (%50) mükemmel korelasyondan sıfır (%) korelasyona (grafikğin ortası) kadar gösterilmektedir. Genel olarak bileşenlerdeki yakınlık, aralarında korelasyonun olduğunu belirtir. Böylece hangi X değişkenlerinin hangi grupla pozitif korelasyonu olduğu saptanabilir.

#### 4.3.2.4. Tahmini Değişken Önemi



Şekil 4.10. Kontrol ve Soydum azit grubu için tahmini değişken önemi grafiği.

VIP (variable importance) değerleri, modellerdeki tüm X değişkenlerinin önemini yansıtan bir tablodur. PLS-DA ile belirlenen önem, proteinlerin grupların farklılaşmalarına ne kadar katkıları olup olmadığına göre değişir. Önemli değişkenlerin VIP değerleri  $\geq 1$  dir. Diğer tüm X değişkenlerinin yanında 1'e eşit ve 1'den büyük olan değerler, dominant X değerleridir. Buradaki grafiğe göre en önemli X değişkenleri: nöroalgısal protein VGF (O15240), kalretikülin (P27797), ATP sentaz beta altünitesi, mitokondriyal (P06576), nötral alfa glukosidaz AB (Q14697), protein disülfid izomeraz A6 (Q15084), heterojenöz nükleer ribonükleoprotein U (Q00839), endoplazmin (P14625), beyin asit çözümlü protein 1 (P80723), protein disülfid izomeraz A3 (P30101) ve tübülün beta zinciri (P07437)'dir.

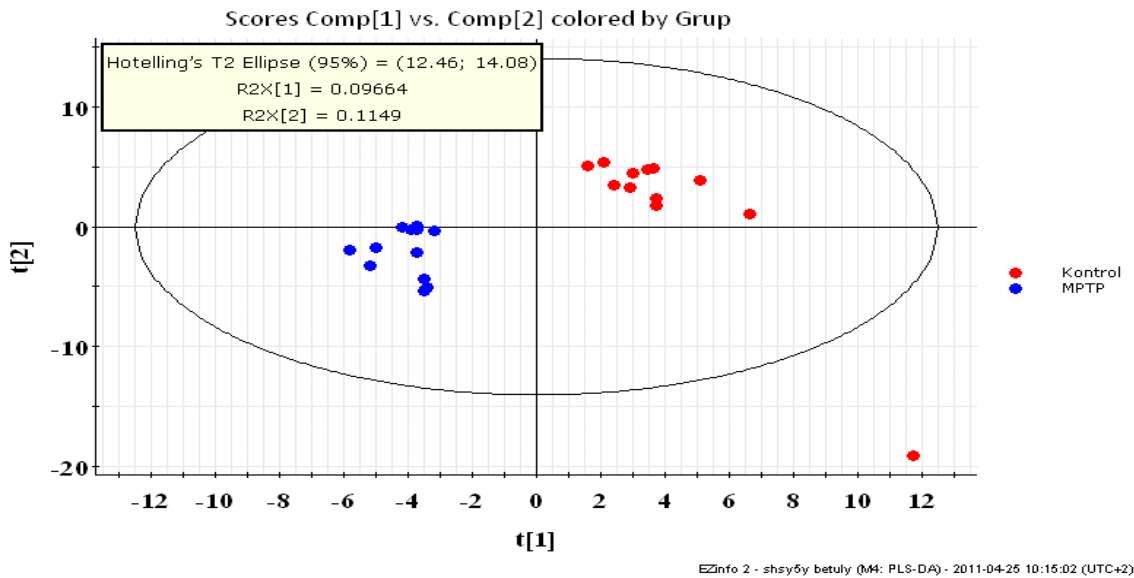
### 4.3.3. PLS-DA Kullanarak Kontrol-MPTP Gruplarının Karşılaştırılması

PLS-DA modeli kullanılarak MPTP ile muamele edilmiş nöroblastoma hücreleri ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.9.** Kontrol ve MPTP için PLS-DA data tanım özeti.

<b>Gözlemler</b>	72	
Dahil Edilenler	24	
Dahil edilmeyenler	48	
Gruplar	2 Grup (MPTP, Kontrol)	
<b>Değişkenler</b>	<b>379</b>	
X değişkenleri	271	
Dahil edilmeyenler	108	A0AVI2, A2BFH1, A6NEQ2, ..
Üretilen	0	
<b>Model</b>	<b>PLS-DA</b>	
Ölçek	UV	
Dönüşüm	Hiçbiri	
Komponentler	2	
<b>Gürültü Seviyesi</b>		
Bu datadaki gürültü seviyesi 14%'dir.		

#### 4.3.3.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)

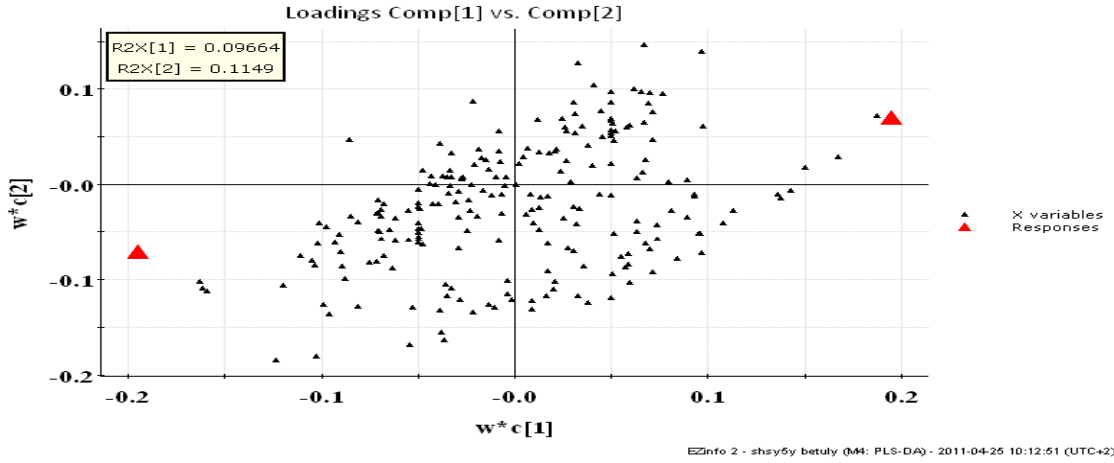


**Şekil 4.11.** Scores Plot grafiğinde Kontrol ve MPTP gruplarının gösterimi.

Kontrolle karşı MPTP grubu farklı renklerde gösterilmiştir. Her gruptan dört farklı örnek ve her örneğin üçlü tekrarı olduğundan, bir gruba ait 12 adet nokta görülmektedir.

Bu grafik, analiz sırasında belirlenen proteinlerdeki nanogram farkları baz alınarak oluşturulmuştur. Score plotta gözlemlenen grafikteki noktaların grup içinde birbirine yakın, gruplar arası ise birbirine uzak olması beklenir.

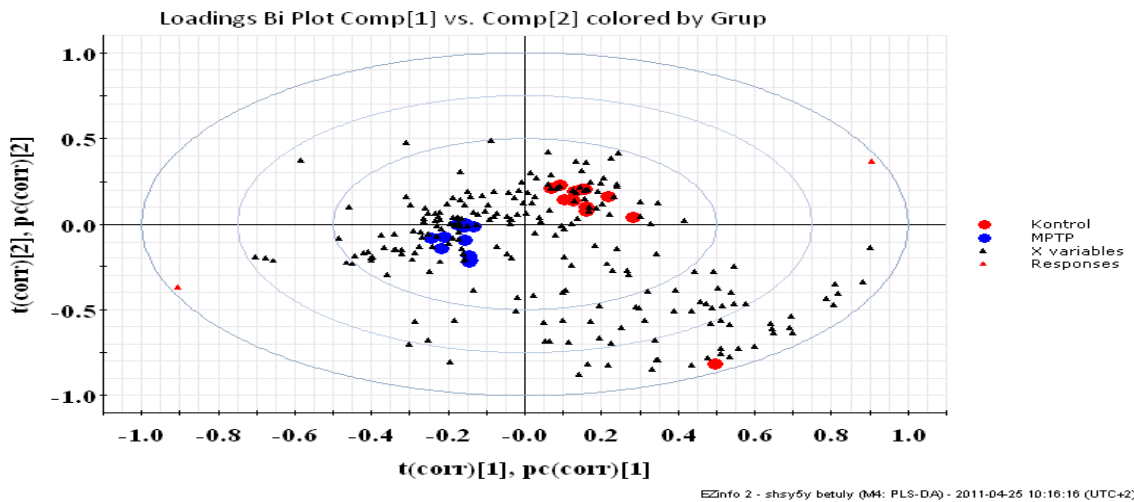
#### 4.3.3.2. X değişkenleri ve Cevapları Arasındaki İlişki



Şekil 4.12. Loadings Plot grafiğinde Kontrol ve MPTP gruplarının gösterimi.

Genel olarak, birbirlerine yakın olan X değişkenleri birbirleriyle çok daha fazla ilişkili olanlardır. Y'ye yakın olan X değerleri birbirleriyle daha sıkı ilişki içindedir ve orijinden daha uzaktır. Orijine yaklaştıkça korelasyon azalır. Karşıt çemberlerde ve orijinden uzak olan X değerleri birbirleriyle negative korelasyon gösterir. Birbirlerinden ne kadar uzaklarsa korelasyon zıtlığı o kadar artar.

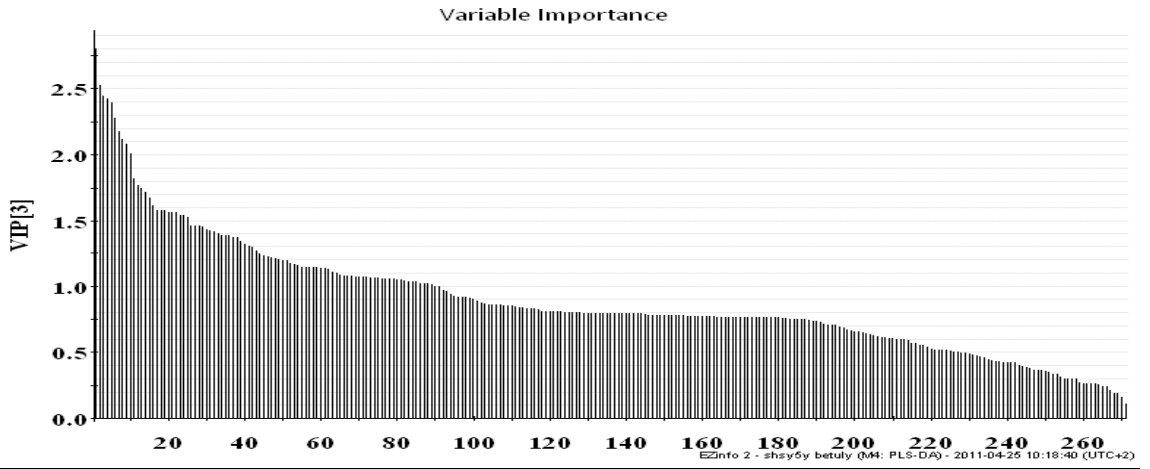
#### 4.3.3.3. X değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi



Şekil 4.13. Loadings Bi Plot Grafiği (Kontrol ve MPTP Grubu İçin)

X değişkenleri ve her bir gözlem arasındaki ilişki Loadings Bi Plot grafiğinde gözlemlenebilir. Bu temada; gözlemler (t'ler), X değişkenleri ve gruplar aynı grafikte gözlemlenebilir. Grafikteki çemberler çeşitli korelasyon seviyelerini göstermektedir. 1.0 (%100), 0.75 (%75) ve 0.5 (%50) mükemmel korelasyondan sıfır (%0) korelasyona (grafikğin ortası) kadar gösterilmektedir. Genel olarak bileşenlerdeki yakınlık aralarında korelasyonun olduğunu belirtir. Böylece hangi X değişkenlerinin hangi grupla pozitif korelasyonu olduğu saptanabilir.

#### 4.3.3.4. Tahmini Değişken Önemi



Şekil 4.14. Kontrol ve MPTP grubu için tahmini değişken önemi grafiği.

VIP (variable importance) değerleri, modellerdeki tüm X değişkenlerinin önemini yansıtan bir tablodur. PLS-DA ile belirlenen önem, proteinlerin grupların farklılaşmalarına ne kadar katkıları olup olmadığına göre değişir. Önemli değişkenlerin VIP değerleri  $\geq 1$  dir. Diğer tüm X değişkenlerinin yanında 1'e eşit ve 1'den büyük olan değerler, dominant X değerleridir. Buradaki grafiğe göre en önemli X değişkenleri: kalmodulin (P62158), galanin (P11142), protein DJ-1 (Q99497), serin/arjinin zengin uçbirleştirme faktörü (Q07955), protein SET (Q01105), uzama faktörü Tu-mitokondriyal (P49411), yüksek mobilite grup protein (P09429), heat shock protein HSP 90-beta (P08238), histon H4 (P62805) ve fosfogliseraldehit mutaz 1 (P18669)'dur.



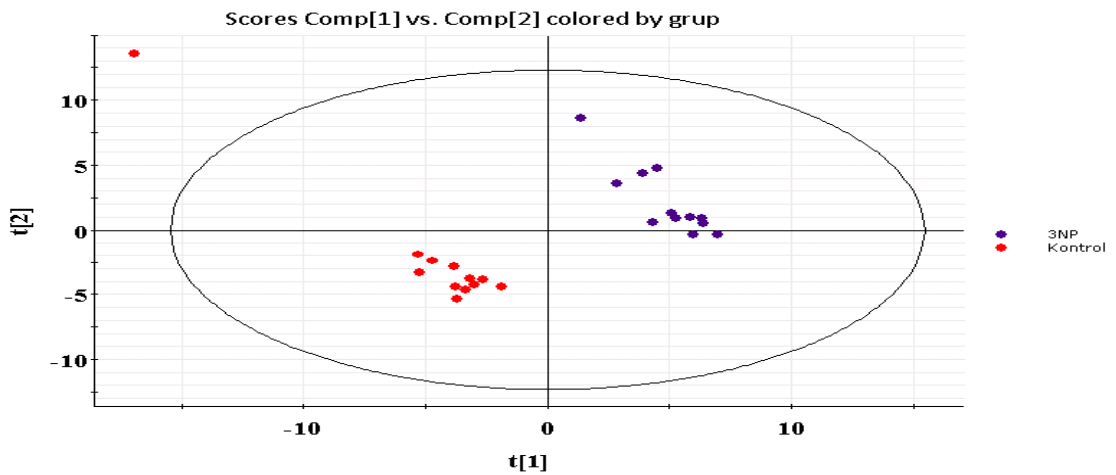
#### 4.3.4. PLS-DA Kullanarak Kontrol-3-NP Gruplarının Karşılaştırılması

PLS-DA modeli kullanılarak 3-NP ile muamele edilmiş nöroblastoma hücreleri ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.10.** Kontrol ve 3-NP için PLS-DA data tanım özeti.

<b>Gözlemler</b>	72	
Dahil Edilenler	24	
Dahil edilmeyenler	48	
Gruplar	2 Grup (3NP, Kontrol)	
<b>Değişkenler</b>	<b>379</b>	
X değişkenleri	262	
Dahil edilmeyenler	117	A2BFH1, A6NEQ2, O00148...
Üretilen	0	
<b>Model</b>	<b>PLS-DA</b>	
Ölçek	UV	
Dönüşüm	Hiçbiri	
Komponentler	3	
<b>Gürültü Seviyesi</b>		
Bu datadaki gürültü seviyesi 9% 'dir.		

##### 4.3.4.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)

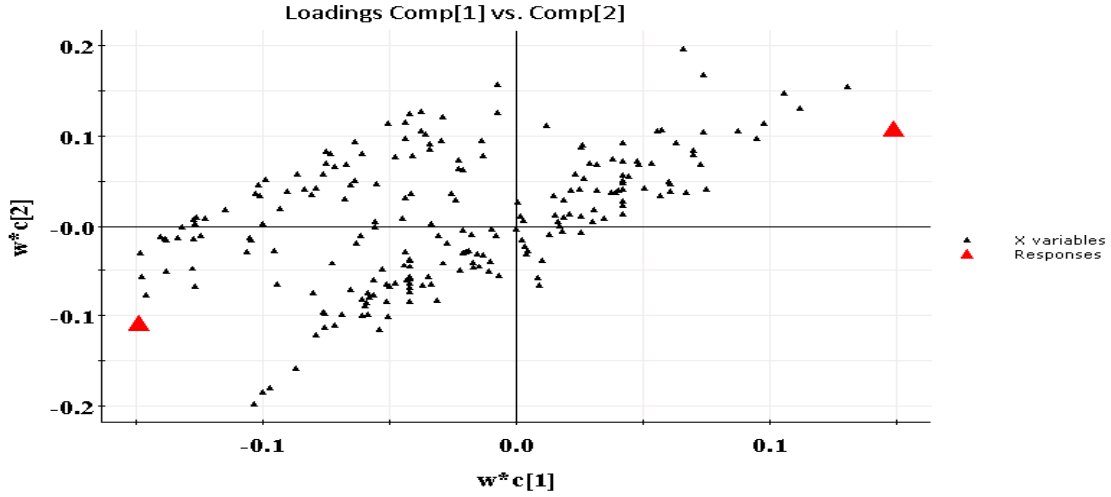


**Şekil 4.15.** 3-NP ve Kontrol grubu farklılıklarının Score-Plot grafiği ile gösterimi.

Kontrole karşı 3-NP grubufarklı renklerde gösterilmiştir. Her gruptan dört farklı örnek ve her örneğin üçlü tekrarı olduğundan, bir gruba ait 12 adet nokta görülmektedir. Bu grafik, analiz sırasında belirlenen proteinlerdeki nanogram farkları baz alınarak

oluşturulmuştur. Score plot'da gözlemlenen grafikteki noktaların grup içinde birbirine yakın, gruplar arası ise birbirine uzak olması beklenir.

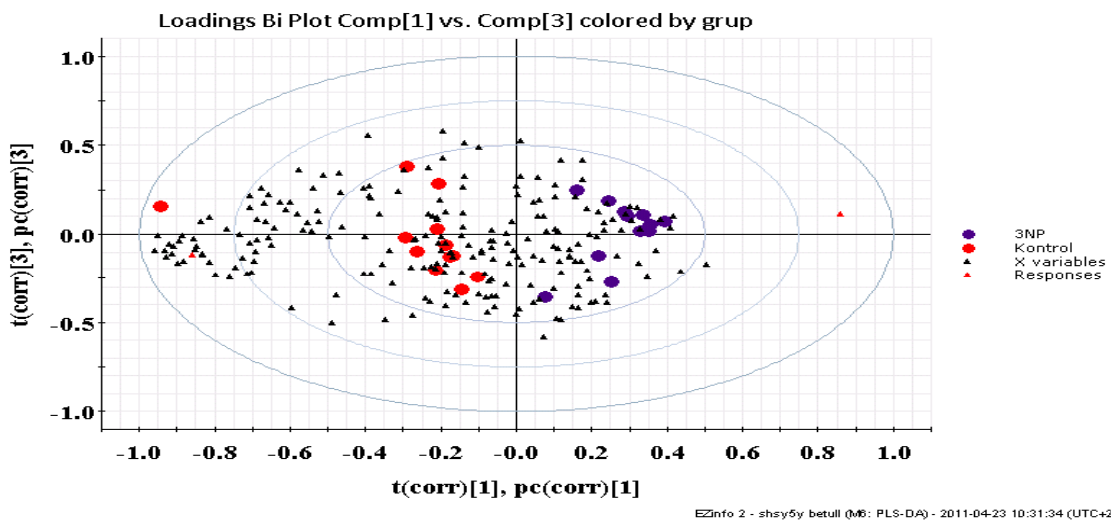
#### 4.3.4.2. X değişkenleri ve Yanıtları Arasındaki İlişki



Şekil 4.16. Loadings Plot grafiğinde Kontrol ve 3-NP gruplarının gösterimi.

Genel olarak, birbirlerine yakın olan X değişkenleri birbirleriyle çok daha fazla ilişkili olanlardır. Y'ye yakın olan X değerleri birbirleriyle daha sıkı ilişki içindedir ve orijinden daha uzaktır. Orijine yaklaştıkça korelasyon azalır. Karşıt çemberlerde ve orijinden uzak olan X değerleri birbirleriyle negative korelasyon gösterir. Birbirlerinden ne kadar uzaklarsa korelasyon zıtlığı o kadar artar.

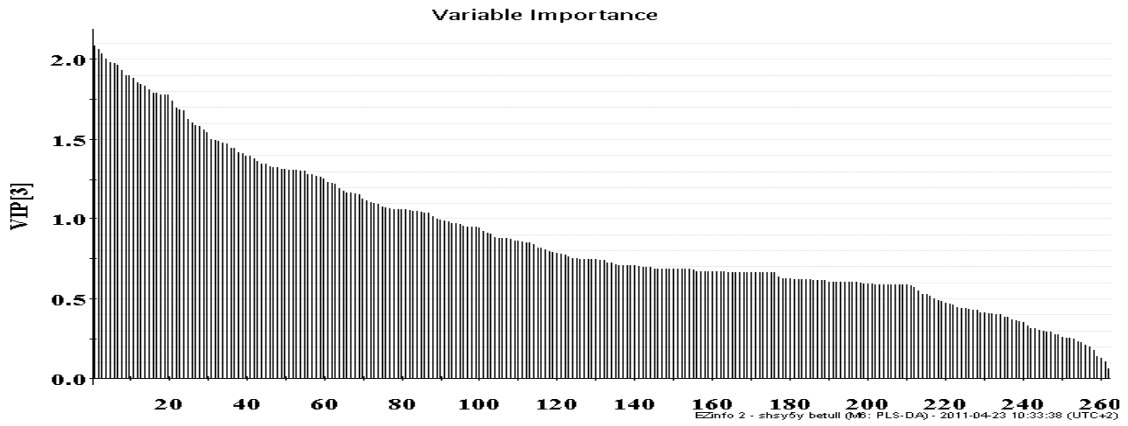
#### 4.3.4.3. X değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla Nasıl İlişkisi



Şekil 4.17. Loadings Bi Plot Grafiği (Kontrol ve 3-NP Grubu İçin)

X değişkenleri ve her bir gözlem arasındaki ilişki Loadings Bi Plot grafiğinde gözlemlenebilir. Bu temada; gözlemler (t'ler), X değişkenleri ve gruplar aynı grafikte gözlemlenebilir. Grafikteki çemberler çeşitli korelasyon seviyelerini göstermektedir. 1.0 (%100), 0.75 (%75) ve 0.5 (%50) mükemmel korelasyondan sıfır (%0) korelasyona (grafığın ortası) kadar gösterilmektedir. Genel olarak bileşenlerdeki yakınlık aralarında korelasyonun olduğunu belirtir. Böylece hangi X değişkenlerinin hangi grupla pozitif korelasyonu olduğu saptanabilir.

#### 4.3.4.4. Tahmini Değişken Önemi (VIP)



Şekil 4.18. Kontrol ve 3-NP grubu için tahmini değişken önemi grafiği.

VIP (variable importance) değerleri, modellerdeki tüm X değişkenlerinin önemini yansıtan bir tablodur. PLS-DA ile belirlenen önem, proteinlerin grupların farklılaşmalarına ne kadar katkıları olup olmadığına göre değişir. Önemli değişkenlerin VIP değerleri  $\geq 1$  dir. Diğer tüm X değişkenlerinin yanında 1'e eşit ve 1'den büyük olan değerler, dominant X değerleridir. Buradaki grafiğe göre en önemli X değişkenleri: heterojenöz nükleer ribonükleoprotein A1 (P09651), kalmadülin (P62158), GTP-bağlayıcı nükleer protein Ran (P62826), heat shock protein HSP 90-alfa (P07900), kalretikülin (P27797), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (P04406), nükleofosmin (P06748), peroksiredoksin 2 (P32119), heat shock cognate 71kDa protein (P11142) ve heterojenöz nükleer ribonükleoprotein U (Q00839)'dur.

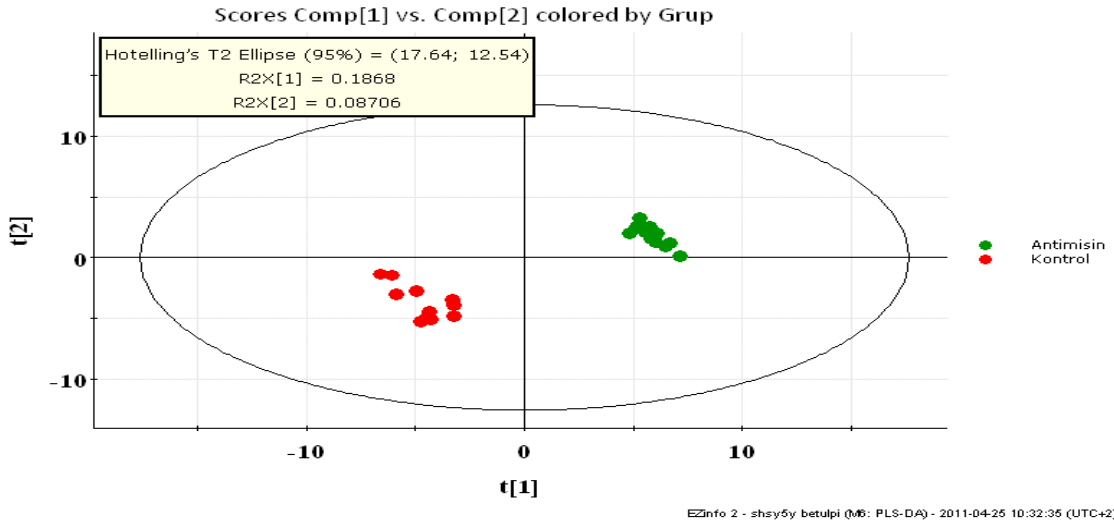
#### 4.3.5. PLS-DA Kullanarak Kontrol-Antimisin Gruplarının Karşılaştırılması

PLS-DA modeli kullanılarak Antimisin ile etkileştirilmiş nöroblastoma hücreleri ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.11.** Kontrol ve Antimisin A için PLS-DA data tanım özeti.

<b>Gözlemler</b>	72	
Dahil Edilenler	24	
Dahil edilmeyenler	48	
Gruplar	2 Grup (Antimisin, Kontrol)	
<b>Değişkenler</b>	379	
X değişkenleri	256	
Dahil edilmeyenler	123	A0AVI2, A2BFH1, A6NEQ2, ...
Üretilen	0	
<b>Model</b>	PLS-DA	
Ölçek	UV	
Dönüşüm	Hiçbiri	
Komponentler	2	
<b>Gürültü Seviyesi</b>		
Bu datadaki gürültü seviyesi 4% 'dir.		

##### 4.3.5.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)

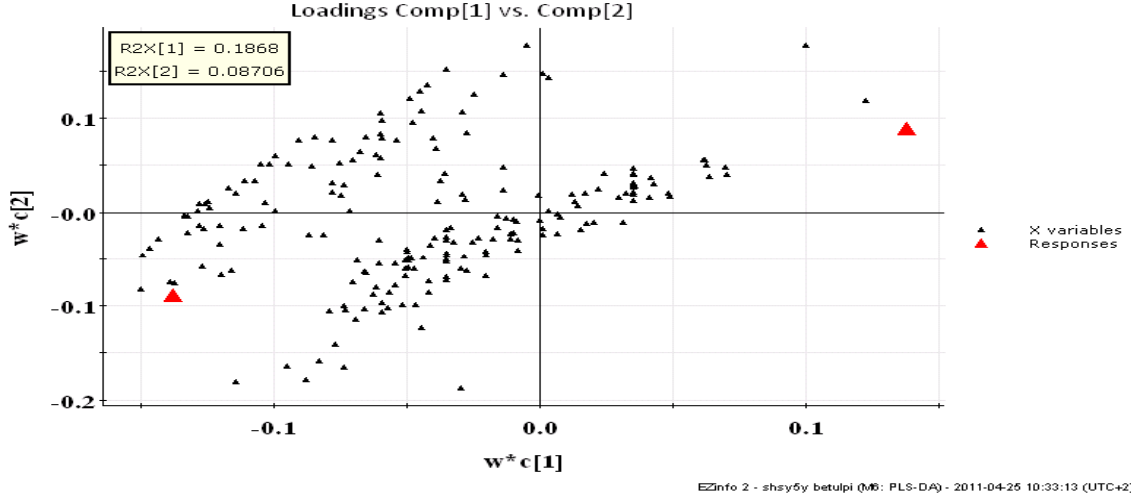


**Şekil 4.19.** Antimisin A ve Kontrol grubu farklılıklarının Score-Plot grafiği ile gösterimi.

Kontrole karşı antimisin grubu farklı renklerde gösterilmiştir. Her gruptan dört farklı örnek ve her örneğin üçlü tekrarı olduğundan, bir gruba ait 12 adet nokta görülmektedir. Bu grafik, analiz sırasında belirlenen proteinlerdeki nanogram farkları baz

alınarak oluşturulmuştur. Score plotta gözlemlenen grafikteki noktaların grup içinde birbirine yakın, gruplar arası ise birbirine uzak olması beklenir.

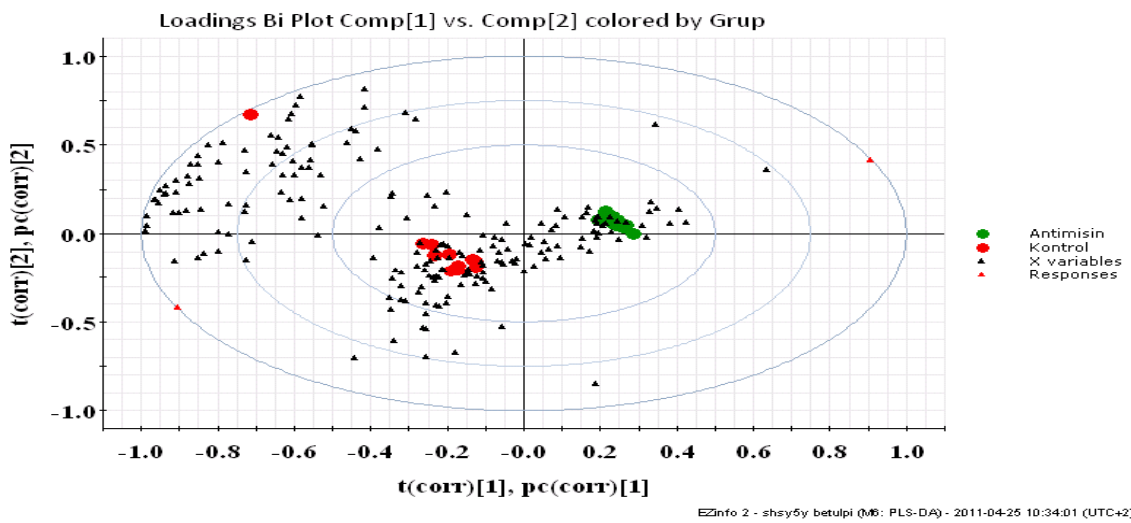
#### 4.3.5.2. X Değişkenleri ve Cevapları Arasındaki İlişki



Şekil 4.20. Loadings Plot grafiğinde Kontrol ve Antimisin A gruplarının gösterimi.

Genel olarak, birbirlerine yakın olan X değişkenleri birbirleriyle çok daha fazla ilişkili olanlardır. Y'ye yakın olan X değerleri birbirleriyle daha sıkı ilişki içindedir ve orijinden daha uzaktır. Orijine yaklaştıkça korelasyon azalır. Karşıt çemberlerde ve orijinden uzak olan X değerleri birbirleriyle negative korelasyon gösterir. Birbirlerinden ne kadar uzaklarsa korelasyon zıtlığı o kadar artar.

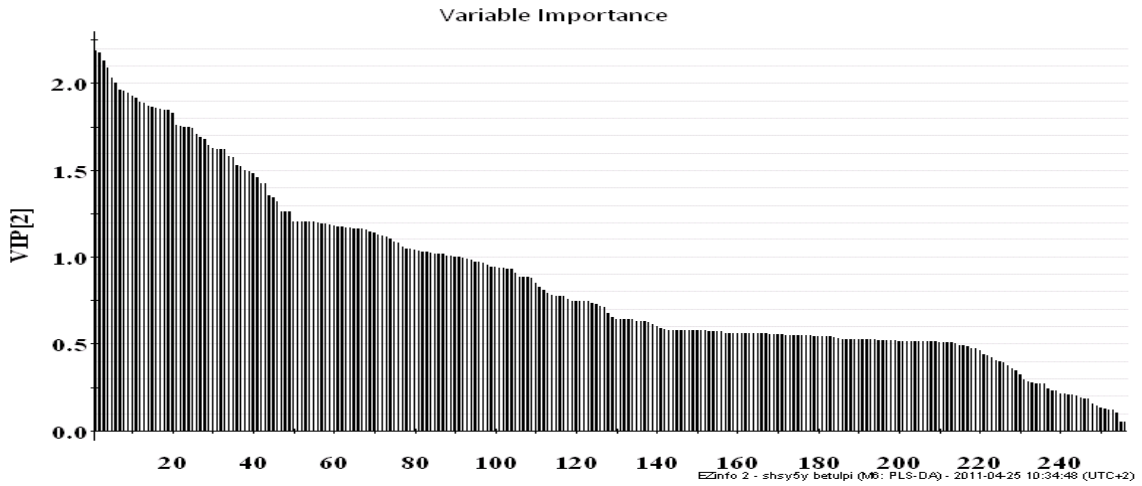
#### 4.3.5.3. X değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi



Şekil 4.21. Loadings Bi Plot Grafiği (Kontrol ve Antimisin A Grubu İçin)

X değişkenleri ve her bir gözlem arasındaki ilişki Loadings Bi Plot grafiğinde gözlemlenebilir. Bu temada; gözlemler (t'ler), X değişkenleri ve gruplar aynı grafikte gözlemlenebilir. Grafikteki çemberler çeşitli korelasyon seviyelerini göstermektedir. 1.0 (%100), 0.75 (%75) ve 0.5 (%50) mükemmel korelasyondan sıfır (%0) korelasyona (grafikğin ortası) kadar gösterilmektedir. Genel olarak bileşenlerdeki yakınlık aralarında korelasyonun olduğunu belirtir. Böylece hangi X değişkenlerinin hangi grupla pozitif korelasyonu olduğu saptanabilir.

#### 4.3.5.4. Tahmini Değişken Önemi



Şekil 4.22. Kontrol ve Antimisin A grubu için tahmini değişken önemi grafiği.

VIP (variable importance) değerleri, modellerdeki tüm X değişkenlerinin önemini yansıtan bir tablodur. PLS-DA ile belirlenen önem, proteinlerin grupların farklılaşmalarına ne kadar katkıları olup olmadığına göre değişir. Önemli değişkenlerin VIP değerleri  $\geq 1$  dir. Diğer tüm X değişkenlerin yanında 1'e eşit ve 1'den büyük olan değerler, dominant X değerleridir. Buradaki grafiğe göre en önemli X değişkenleri erişim numaralarıyla: kreatin kinaz tip-B (P12277), nükleofosmin (P06748), tübülün beta zinciri (P07437), heterojenöz nükleer ribonükleoprotein A1 (P09651), 40S ribosomal protein S7 (P62081), GTP-bağlayıcı nükleer protein Ran (P62826), triosefosfat izomeraz (P60174), kofilin-1 (P23528), alfa enolaz (P06733) ve yüksek mobilite grup protein B1 (P09429)'dur.

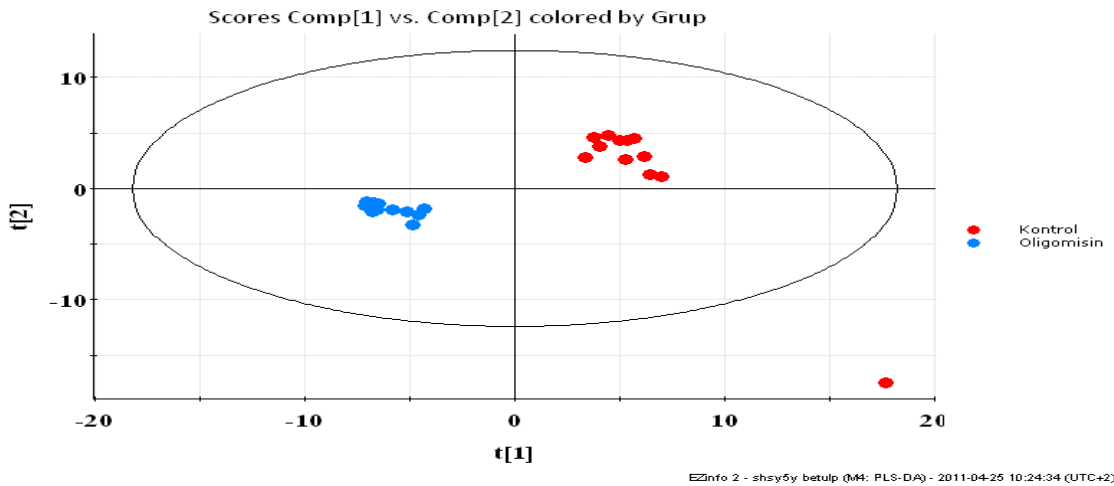
#### 4.3.6. PLS-DA Kullanılarak Kontrol-Oligomisin Gruplarının Karşılaştırılması

PLS-DA modeli kullanılarak oligomisin ile etkileştirilmiş nöroblastoma hücreleri ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.12.** Kontrol ve Oligomisin için PLS-DA data tanım özeti.

<b>Gözlemler</b>	72	
Dahil Edilenler	24	
Dahil edilmeyenler	48	
Gruplar	2 Grup (Oligomisin, Kontrol)	
<b>Değişkenler</b>	<b>379</b>	
X değişkenleri	258	
Dahil edilmeyenler	121	A0AVI2, A6NEQ2, B2RPK0...
Üretilen	0	
<b>Model</b>	<b>PLS-DA</b>	
Ölçek	UV	
Dönüşüm	Hiçbiri	
Komponentler	3	
<b>Gürültü Seviyesi</b>		
Bu datadaki gürültü seviyesi 4% 'dir.		

##### 4.3.6.1. Gruplar Birbirlerinden Ne Kadar Farklı? (Scores Plot)

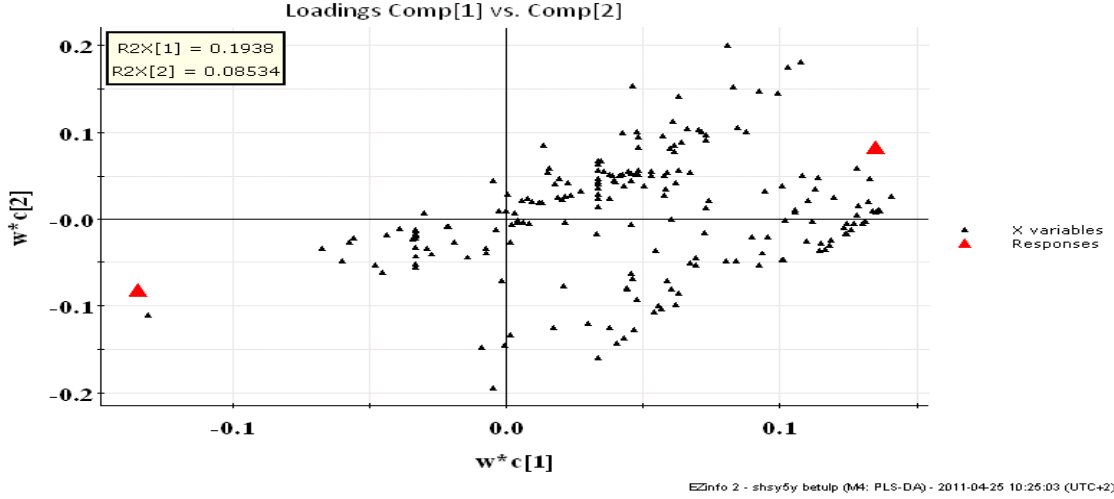


**Şekil 4.23.** Oligomisin ve Kontrol grubu farklılıklarının Score-Plot grafiği ile gösterimi.

Kontrole karşı oligomisin grubu farklı renklerde gösterilmiştir. Her gruptan dört farklı örnek ve her örneğin üçlü tekrarı olduğundan, bir gruba ait 12 adet nokta görülmektedir. Bu grafik, analiz sırasında belirlenen proteinlerdeki nanogram farkları baz

alınarak oluşturulmuştur. Score plot'da gözlemlenen grafikteki noktaların grup içinde birbirine yakın, gruplar arası ise birbirine uzak olması beklenir.

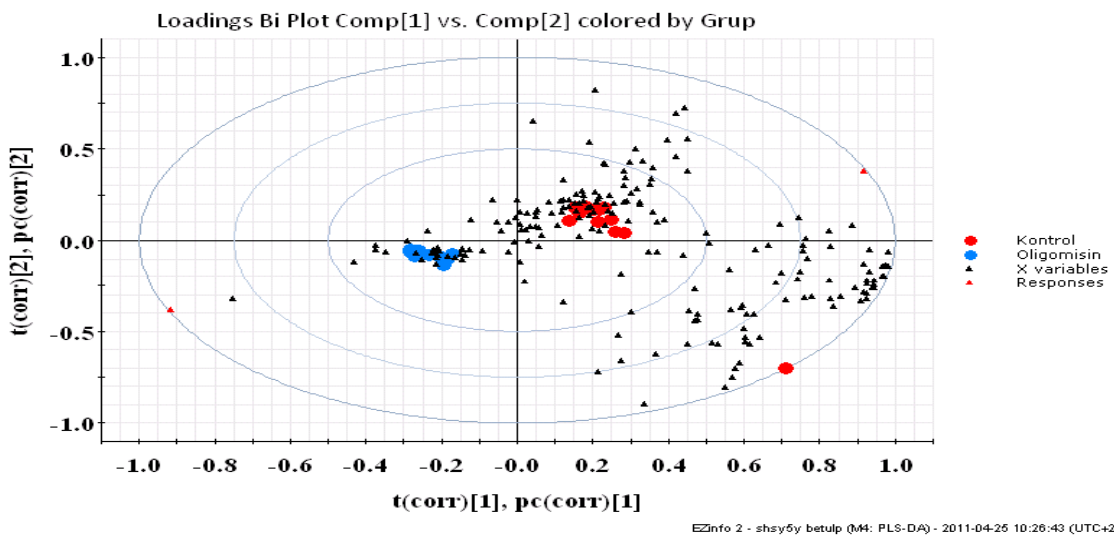
#### 4.3.6.2. X değişkenleri ve Cevapları Arasındaki İlişki



Şekil 4.24. Loadings Plot grafiğinde Kontrol ve Oligomisin gruplarının gösterimi.

Genel olarak, birbirlerine yakın olan X değişkenleri birbirleriyle çok daha fazla ilişkili olanlardır. Y'ye yakın olan X değerleri birbirleriyle daha sıkı ilişki içindedir ve orijinden daha uzaktır. Orijine yaklaştıkça korelasyon azalır. Karşıt çemberlerde ve orijinden uzak olan X değerleri birbirleriyle negative korelasyon gösterir. Birbirlerinden ne kadar uzaklarsa korelasyon zıtlığı o kadar artar.

#### 4.3.6.3. X değişkenlerinin Birbirleriyle ve Diğer Gözlem Unsurlarıyla İlişkisi

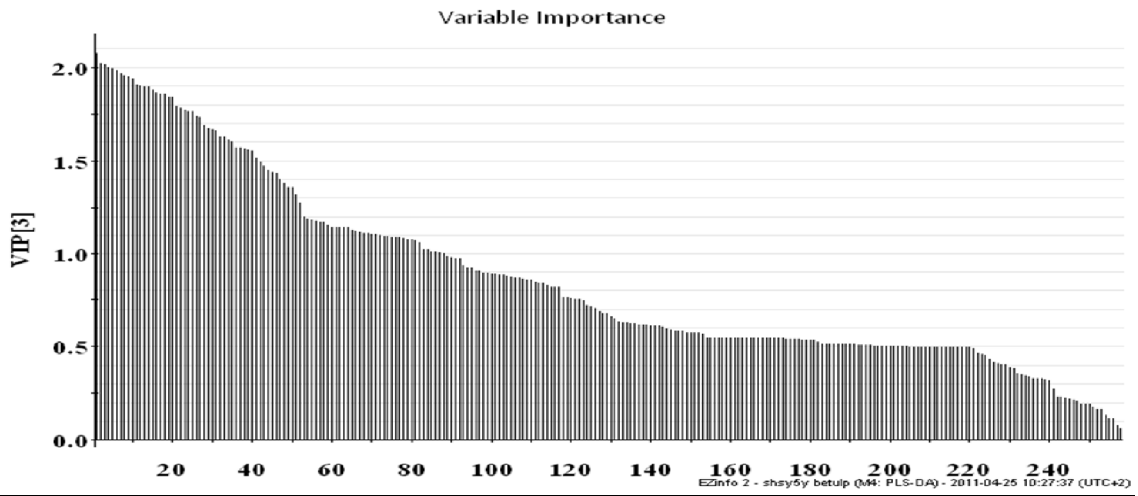


Şekil 4.25. Loadings Bi Plot Grafiği (Kontrol ve Oligomisin Grubu İçin)



X değişkenleri ve her bir gözlem arasındaki ilişki Loadings Bi Plot grafiğinde gözlemlenebilir. Bu temada; gözlemler ( $t'$  ler), X değişkenleri ve gruplar aynı grafikte gözlemlenebilir. Grafikteki çemberler çeşitli korelasyon seviyelerini göstermektedir. 1.0 (%100), 0.75 (%75) ve 0.5 (%50) mükemmel korelasyondan sıfır (%0) korelasyona (grafiğin ortası) kadar gösterilmektedir. Genel olarak bileşenlerdeki yakınlık aralarında korelasyonun olduğunu belirtir. Böylece hangi X değişkenlerinin hangi grupla pozitif korelasyonu olduğu saptanabilir.

#### 4.3.6.4. Tahmini Değişken Önemi



Şekil 4.26. Kontrol ve Antimisin A grubu için tahmini değişken önemi grafiği.

VIP (variable importance) değerleri, modellerdeki tüm X değişkenlerinin önemini yansıtan bir tablodur. PLS-DA ile belirlenen önem, proteinlerin grupların farklılaşmalarına ne kadar katkıları olup olmadığına göre değişir. Önemli değişkenlerin VIP değerleri  $\geq 1$  dir. Diğer tüm X değişkenlerinin yanında 1'e eşit ve 1'den büyük olan değerler, dominant X değerleridir. Buradaki grafiğe göre en önemli X değişkenleri: tübülün beta zinciri (P07437), triosefosfat izomeraz (P60174), heterojenöz nükleer ribonükleoprotein A1 (P09651), nükleofosmin (P06748), histon H3.1 (P68431), alfa enolaz (P06733), kreatin kinaz tip-B (P12277), piruvat kinaz izoenzimleri M1/M2 (P14618), kofilin-1 (P23528) ve peptidil prolil cis-trans izomeraz A (P62937)'dir.

#### 4.4. Scaffold Sonuçları

Scaffold 3, PLGS arama motoru kullanılarak elde edilen protein tanımlamalarını doğrulamak ve ANOVA analizlerini gerçekleştirerek gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı protein ifade farklılıklarının tayini için için kullanılmıştır. Aşağıdaki listede Scaffold taramaları sonrasında elde edilmiş protein tanımlamaları verilmiştir. Listede sadece ANOVA analizinde P<0,05 olan protein ifade farklılıkları verilmiştir (Şekil 4.27;1, 2, 3, 4).

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (272) Including 6 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	ANOVA Test (P-Value)	ANOVA Test
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H2A1D_HUMAN Histone H2A type 1-D OS=Homo sapien...P20671		14 kDa	★	0	
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondri... P06576		57 kDa	★	0.00000000000000011	
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ACTA_HUMAN Actin, aortic smooth muscle OS=Homo s... P62736		42 kDa	★	0.00000000000000013	
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	EF1A1_HUMAN Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo s... P68104		50 kDa	★	0.00000000000000029	
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	CALR_HUMAN Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR ... P27797		48 kDa	★	0.00000000000000035	
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PDIA3_HUMAN Protein disulfide-isomerase A3 OS=Ho... P30101		57 kDa	★	0.000000000000070	
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H2B1M_HUMAN Histone H2B type 1-M OS=Homo sapie... Q99879		14 kDa	★	0.000000000000072	
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	VEGF_HUMAN Neurosecretory protein VGF OS=Homo sa... O15240		67 kDa	★	0.000000000000016	
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GNAI6_HUMAN G-protein subunit alpha-6 OS=Homo s... Q14697		107 kDa	★	0.000000000000070	
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GRP78_HUMAN 78 kDa glucose-regulated protein OS=... P11021		72 kDa	★	0.00000000000023	
11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	IF5A1_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 5... Q6IS14		17 kDa	★	0.00000000000027	
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RHOA_HUMAN Transforming protein RhoA OS=Homo s... P61586		22 kDa	★	0.00000000000028	
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	CMGA_HUMAN Chromogranin-A OS=Homo sapiens GN=...P10645		51 kDa	★	0.00000000000091	
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H31_HUMAN Histone H3.1 OS=Homo sapiens GN=HIST ... P68431		15 kDa	★	0.00000000000100	
15	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ENPL_HUMAN Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP9...P14625		14 kDa	★	0.0000000000022	
16	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PDIA6_HUMAN Protein disulfide-isomerase A6 OS=Ho... Q15084		92 kDa	★	0.0000000000013	
17	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ADH1_YEAST Alcohol dehydrogenase 1 OS=Saccharom... P00330		48 kDa	★	0.0000000000039	
18	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ADH1_YEAST Alcohol dehydrogenase 1 OS=Ho... Q15084		37 kDa	★	0.000000012	
19	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PDIA4_HUMAN Protein disulfide-isomerase A4 OS=Ho... P13667		73 kDa	★	0.000000014	
20	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PIIB_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS... P23284		24 kDa	★	0.000000033	
21	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MDHM_HUMAN Malate dehydrogenase, mitochondrial ... P40926		36 kDa	★	0.000000038	
22	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	G6PI_HUMAN Glucose-6-phosphate isomerase OS=Ho... P06744		63 kDa	★	0.000000042	
23	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HNRPU_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprot... Q00839		91 kDa	★	0.000000063	
24	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TBB5_HUMAN Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN... P07437		50 kDa	★	0.000000067	
25	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	F5CN1_HUMAN Fascin OS=Homo sapiens GN=F5CN1 PE... Q16658		55 kDa	★	0.000000074	
26	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GLU2B_HUMAN Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo s... P14314		59 kDa	★	0.000000098	
27	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	BASP1_HUMAN Brain acid soluble protein 1 OS=Homo s... P80723		23 kDa	★	0.00000010	
28	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ATPA_HUMAN ATP synthase subunit alpha, mitochondri... P25705		60 kDa	★	0.00000017	
29	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	DDX17_HUMAN Probable ATP-dependent RNA helicase ... Q92841		72 kDa	★	0.00000018	
30	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H13_HUMAN Histone H1.3 OS=Homo sapiens GN=HIST ... P16402		22 kDa	★	0.00000024	
31	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KCRB_HUMAN Creatine kinase B-type OS=Homo sapien... P12277		43 kDa	★	0.00000032	
32	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	G3P_HUMAN Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogen... P04406		36 kDa	★	0.0000011	

Şekil 4.27. Scaffold tablosu 1.

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (272) Including 6 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	ANOVA Test (P-value)
33	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			71 kDa	★	0.000013
34	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein OS=...	50 kDa	★	0.000024
35	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBB2C_HUMAN Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapien...	20 kDa		0.000037
36	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		MRP_HUMAN MARCKS-related protein OS=Homo sapie...	50 kDa	★	0.000039
37	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBA4A_HUMAN Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapie...	50 kDa	★	0.000040
38	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		EF1A2_HUMAN Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo s...	20 kDa		0.000056
39	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PARK7_HUMAN Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PA...	25 kDa		0.000088
40	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PRDX6_HUMAN Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN...	14 kDa	★	0.00010
41	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		H2AZ_HUMAN Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2...	36 kDa		0.00010
42	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ALDR_HUMAN Aldose reductase OS=Homo sapiens GN...	51 kDa		0.00012
43	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		HNRPK_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprot...	89 kDa		0.00012
44	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TERA_HUMAN Transitional endoplasmic reticulum ATPa...	32 kDa		0.00013
45	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ISOC1_HUMAN Isochorismatase domain-containing pr...	50 kDa		0.00014
46	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBAJA_HUMAN Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapie...	15 kDa	★	0.00015
47	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		H32_HUMAN Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST...	28 kDa	★	0.00019
48	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		SRSF1_HUMAN Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS...	52 kDa		0.00022
49	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		CISY_HUMAN Citrate synthase, mitochondrial OS=Hom...	50 kDa		0.00023
50	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBB4_HUMAN Tubulin beta-4 chain OS=Homo sapiens ...	50 kDa	★	0.00024
51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBB3_HUMAN Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens ...	51 kDa	★	0.00029
52	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		RUVB2_HUMAN RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUV...	50 kDa		0.00032
53	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBB8_HUMAN Tubulin beta-8 chain OS=Homo sapiens ...	18 kDa	★	0.00033
54	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PP1A_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS...	62 kDa		0.00038
55	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		DPYL2_HUMAN Dihydropyrimidinase-related protein 2 ...	18 kDa		0.00041
56	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PKHJ1_HUMAN Pleckstrin homology domain-containing...Q9NW61	74 kDa	★	0.00043
57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		GRP75_HUMAN Stress-70 protein, mitochondrial OS=H...	14 kDa		0.00045
58	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		SFPQ_HUMAN Splicing factor, proline- and glutamine-ri...	76 kDa	★	0.00053
59	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		HMGB2_HUMAN High mobility group protein B2 OS=Ho...	24 kDa	★	0.00054
60	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		IF4A2_HUMAN Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Ho...	46 kDa	★	0.00055
61	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=H...	58 kDa	★	0.00057
62	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PGK1_HUMAN Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sa...	45 kDa	★	0.00064
63	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		GSTP1_HUMAN Glutathione S-transferase P OS=Homo ...	23 kDa	★	0.00079
64	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		HS90B_HUMAN Heat shock protein HSP 90-beta OS=Ho...	83 kDa	★	0.00085

Şekil 4.27. Scaffold tablosu 2.



#	Visible?	Starred?	Undeck to hide protein	Probability Legend:	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	ANOVA Test (P-Value)
65	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	over 95%	Bio View: Identified Proteins (272) Including 6 Decoys	50 kDa		0.0012
66	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	80% to 94%	EFTU_HUMAN Elongation factor Tu, mitochondrial OS=H...P49411	12 kDa		0.0013
67	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50% to 79%	CYC_HUMAN Cytochrome c OS=Homo sapiens GN=CYC... P999999	29 kDa	★	0.0013
68	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	20% to 49%	PGAM1_HUMAN Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo... P186669	28 kDa	★	0.0013
69	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0% to 19%	1433G_HUMAN 14-3-3 protein gamma OS=Homo sapie... P61981	19 kDa		0.0014
70	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		RL21_HUMAN 60S ribosomal protein L21 OS=Homo sap... P46778	12 kDa	★	0.0014
71	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		RLA2_HUMAN 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Hom... P05387	85 kDa	★	0.0014
72	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		H590A_HUMAN Heat shock protein HSP 90-alpha OS=H... P07900	48 kDa		0.0015
73	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		AATM_HUMAN Aspartate aminotransferase, mitochon... P00505	89 kDa		0.0016
74	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TIF1B_HUMAN Transcription intermediary factor 1-bet... Q13263	21 kDa		0.0016
75	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PEBP1_HUMAN Phosphatidylethanolamine-binding prot... P30086	39 kDa	★	0.0017
76	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		ALDOA_HUMAN Fructose-bisphosphate aldolase A OS=... P04075	17 kDa	★	0.0020
77	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		UBE2N_HUMAN Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N OS=... P61088	13 kDa		0.0021
78	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TBCA_HUMAN Tubulin-specific chaperone A OS=Homo ... O75347	68 kDa		0.0024
79	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TKT_HUMAN Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT ... P29401	27 kDa		0.0025
80	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		DUT_HUMAN Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidoh... P33316	33 kDa		0.0025
81	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		SET_HUMAN Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE... Q01105	15 kDa		0.0029
82	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PROF1_HUMAN Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 P... P07737	12 kDa		0.0034
83	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor O... P14174	9 kDa		0.0035
84	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		HMGW2_HUMAN Non-histone chromosomal protein HM... P05204	57 kDa		0.0044
85	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PDJ1_HUMAN Protein disulfide-isomerase OS=Homo s... P07237	49 kDa	★	0.0047
86	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		HNRH1_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprot... P31943	61 kDa		0.0047
87	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		CH60_HUMAN 60 kDa heat shock protein, mitochondria... P10809	17 kDa		0.0048
88	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		STMN1_HUMAN Stathmin OS=Homo sapiens GN=STMN... P16949	22 kDa		0.0060
89	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TAGL2_HUMAN Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TA... P37802	37 kDa	★	0.0060
90	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PCBP1_HUMAN Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sa... Q15365	51 kDa	★	0.0068
91	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		GDI3_HUMAN Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=... P50395	21 kDa	★	0.0074
92	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		H12_HUMAN Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST ... P16403	25 kDa	★	0.0077
93	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		TPISL_HUMAN Putative triosephosphate isomerase-lik... Q7Z6K2	19 kDa	★	0.0078
94	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		COF1_HUMAN Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE... P23528	13 kDa	★	0.0085
95	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		RL30_HUMAN 60S ribosomal protein L30 OS=Homo sap... P62888	28 kDa		0.0090
96	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		PRDX3_HUMAN Thioredoxin-dependent peroxide reduc... P30048	32 kDa		0.0093
					MARCS_HUMAN Myristoylated alanine-rich C-kinase su... P29966			

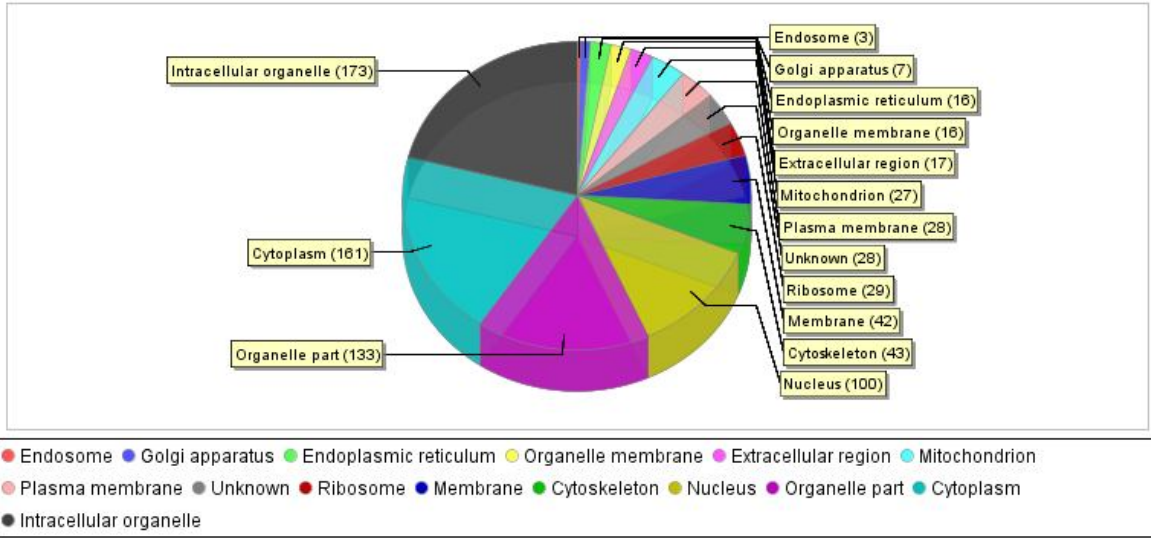
Şekil 4.27. Scaffold tablosu 3.

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (272) Including 6 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	ANOVA Test (P-Value)
97	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	SMD1_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 ... P62314	13 kDa		0.0095
98	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H2B2C_HUMAN Putative histone H2B type 2-C OS=Homo... Q6DM03	21 kDa	★	0.010
99	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NPM_HUMAN Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NP... P06748	33 kDa		0.011
100	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HSP74_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo ... P34932	94 kDa	★	0.011
101	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TCPO_HUMAN T-complex protein 1 subunit theta OS=H... P50990	60 kDa		0.012
102	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	R55_HUMAN 40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapie... P46782	23 kDa		0.012
103	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	POTEF_HUMAN POTE ankyrin domain family member F ... A5A3E0	121 kDa	★	0.012
104	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PCBP2_HUMAN Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sa... Q15366	39 kDa	★	0.012
105	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	CH10_HUMAN 10 kDa heat shock protein, mitochondria... P61604	11 kDa		0.016
106	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TBB6_HUMAN Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens ... Q9BUF5	50 kDa	★	0.016
107	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H4_HUMAN Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4... P62805	11 kDa		0.018
108	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	I433E_HUMAN 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapien... P62258	29 kDa	★	0.019
109	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	H15_HUMAN Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H... P16401	23 kDa	★	0.019
110	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HNRPL_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprot... P14866	64 kDa		0.020
111	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	I433T_HUMAN 14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens... P27348	28 kDa	★	0.021
112	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GDIR1_HUMAN Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Ho... P52565	23 kDa		0.022
113	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PTMA_HUMAN Prothymosin alpha OS=Homo sapiens G... P06454	12 kDa		0.023
114	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TCPB_HUMAN T-complex protein 1 subunit beta OS=Ho... P78371	57 kDa		0.023
115	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HNRPQ_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprot... O60506	70 kDa	★	0.024
116	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TBB4Q_HUMAN Putative tubulin beta-4q chain OS=Ho... Q99867	48 kDa	★	0.026
117	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HNRPM_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprot... P52272	78 kDa		0.026
118	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	MDHC_HUMAN Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS... P40925	36 kDa		0.026
119	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	SODC_HUMAN Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Hom... P00441	16 kDa		0.031
120	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	I433Z_HUMAN 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sa... P63104	28 kDa	★	0.031
121	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ROA3_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotei... P51991	40 kDa		0.034
122	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ILF2_HUMAN Interleukin enhancer-binding factor 2 OS... Q12905	42 kDa		0.034
123	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	R57_HUMAN 40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapie... P62081	23 kDa		0.036
124	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HMGB1_HUMAN High mobility group protein B1 OS=Ho... P09429	25 kDa	★	0.036
125	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=H... P08107	70 kDa	★	0.037
126	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	CAP1_HUMAN Adenylyl cyclase-associated protein 1 O... Q01518	52 kDa		0.037
127	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AJMX_HUMAN Alpha-internexin OS=Homo sapiens GN=... Q16352	55 kDa		0.038
128	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NEDD8_HUMAN NEDD8 OS=Homo sapiens GN=NEDD8 PE... Q15843	9 kDa		0.039

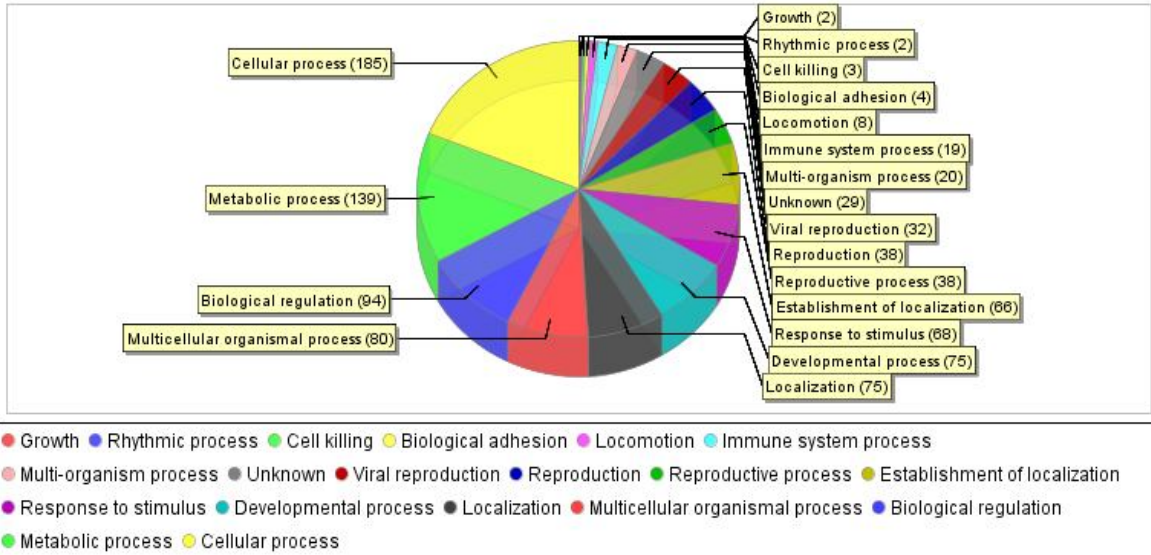
Şekil 4.27. Scaffold tablosu 4.

Scaffold 3 yazılımı, proteinlerin hücre içindeki dağılımlarını (Şekil 4.28), biyolojik olarak görev dağılımlarını (Şekil 4.29) ve moleküler fonksiyonlarını (Şekil 4.30) belirlemek için de kullanılmıştır.

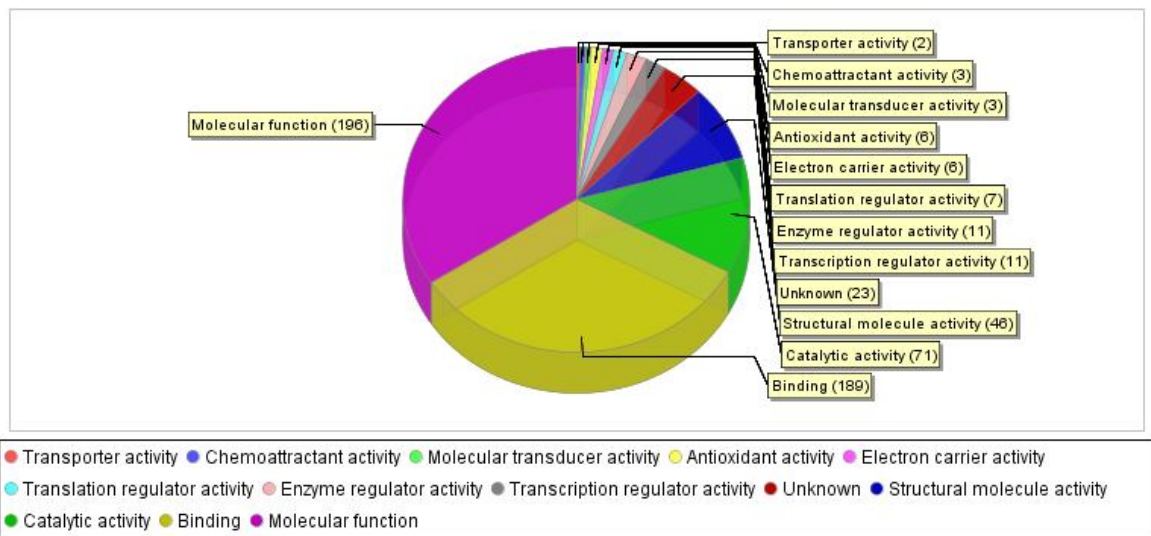




Şekil 4.28. Proteinlerin hücredeki yerine göre dağılımı.



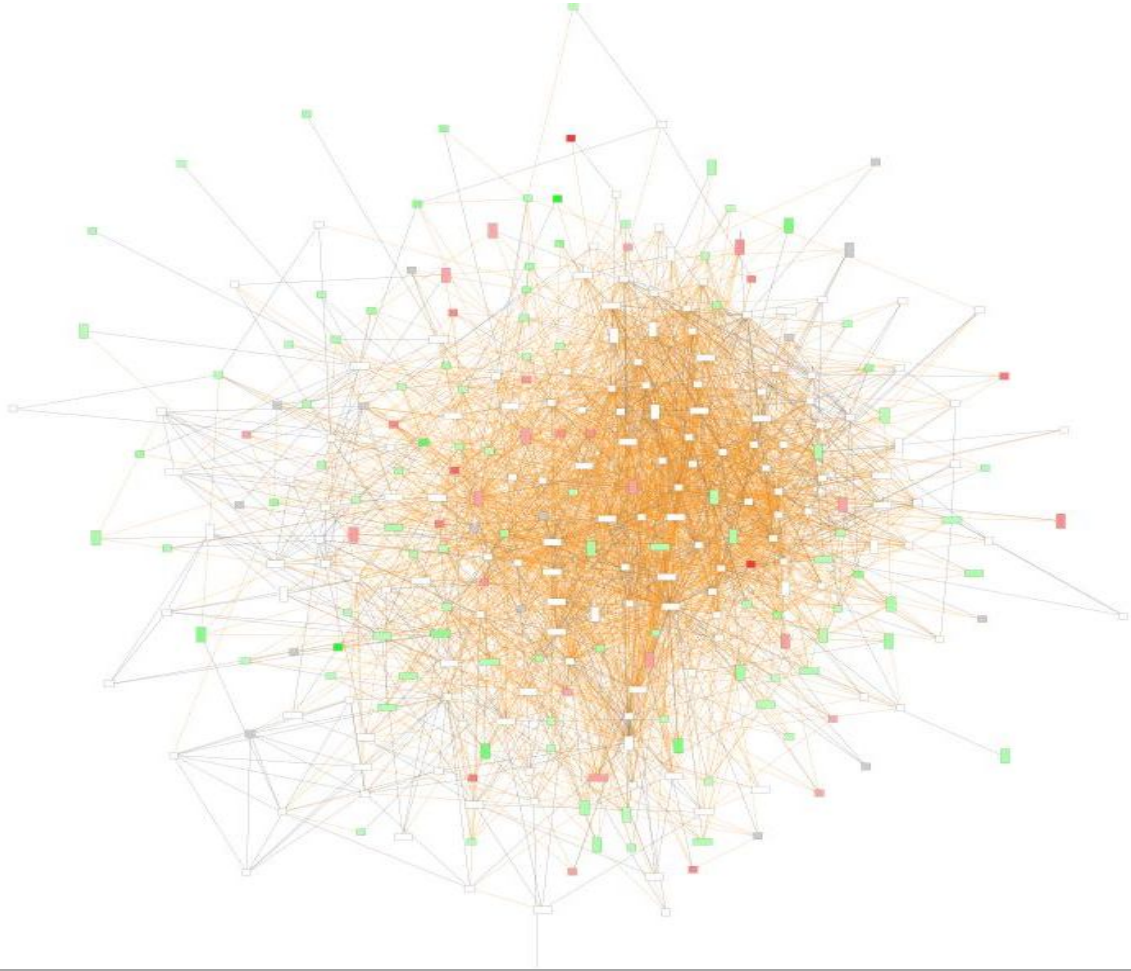
Şekil 4.29. Proteinlerin biyolojik görevlerine göre dağılımı.



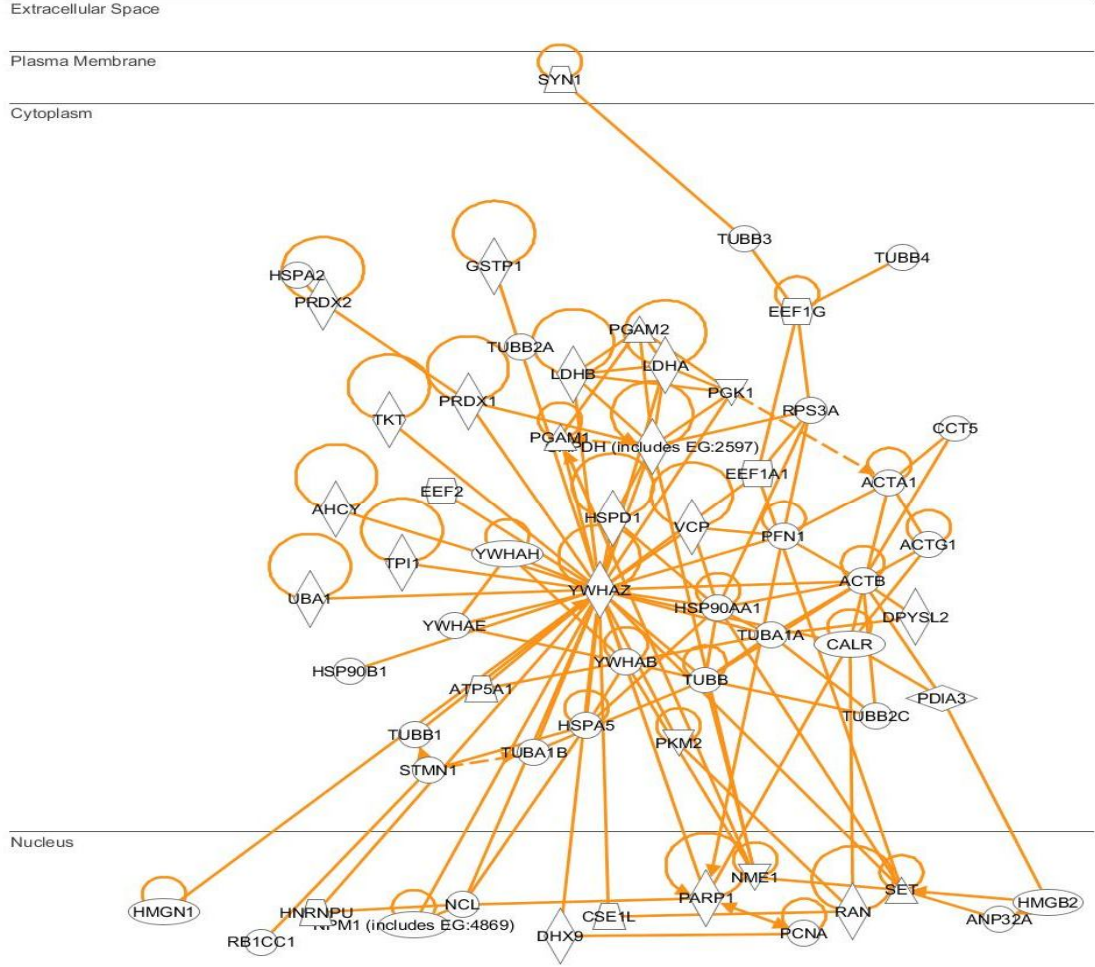
Şekil 4.30. Proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımı.

#### 4.5. IPA Yolak Analizi Sonuçları

IPA yolak analizleri sonucu, birbirleriyle bağlantılı birçok network bulunmuştur. Kontrole karşı nörotoksin uygulanmış olan grupların her birine ait yaklaşık on adet yolak haritası elde edilmiştir. Beş adet karşılaştırma yaptığımız için bu sayı yaklaşık elliye yükselmiştir. Datayı çok karmaşık hale getirdiği için bunları bulgulardan çıkarmayı uygun gördük. Tek bir gruba ait şematik bir protein yolak temasını (Şekil 4.31) ve yine tek bir gruba ait hastalık ilişkili protein network şemasını örnek olarak bıraktık. Hastalık bağlantılı proteinlerin network şemasında (Şekil 4.32) hangi proteinlerin hangileriyle ilişkili olduğu ve hücre içinde hangi bölümlerde yer aldıkları görülmektedir. Yolak analizleri ayrıntılı olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 4.31. Tüm protein birbirleriyle ilişkisinin şematik gösterimi.



Şekil 4.32. Hastalık bağlantılı protein network şeması.



## 5. TARTIŞMA

Proteomik çalışmalarda örnek ekstraksiyonu büyük önem arz etmektedir. Öncelikle ekstraksiyon aşamasında nitril eldiven kullanılması, önlük giyilmesi ve çalışmanın laminar akış kabini içinde gerçekleştirilmesi keratin kontaminasyonunu azaltacaktır. LC-MS/MS çalışmasında kütle spektrometresi ile uyumlu olan RapiGest deterjanı kullanılmıştır. Bu kimyasal, proteinlerin proteaz ile kesilmesi için iyi bir denaturanttır. Tripsinizasyon aşamasında proteinlerin iyonik etkileşimlerini kırarak açar ve tripsinin rahatça gelip lizin ve argininden sonra kesmesini sağlar. RapiGest kullanıldığı zaman daha fazla sayıda triptik peptit elde edilir. Analiz sonrası tanımlanacak proteinlerin sayısı elde edilecek peptitler ile orantılıdır. Hücreden proteinler ekstrakte edilemez ve tripsin ile parçalanamazsa daha sonrasında da tanımlanamaz.

Bu çalışmada proteomik alanında son dönemlerde yaygın olarak kullanılan LC-MS/MS yöntemi tercih edilmiştir. Proteinlerin ayrıştırılması için 2D-jel elektroforez ve ardından görüntü analizi ve ilgili protein spotlarının kesimi ve tanımlaması yerine LC-MS/MS kullanılmasıdaki ana neden çalışmada altı örnek grubunda dörder biyolojik tekrar olmak üzere toplam 24 örnek analiz edilecek olmasıdır. Teknik hataların elimine edilmesi için de üçer tekrarlı olarak gerçekleştirilen çalışmada toplam 72 analiz gerçekleştirilmiştir. Bu boyuttaki bir çalışma 2D-jel elektroforez ile çok zahmetli olurdu. Bununla beraber, 2D-jel çalışmalarında örnek başına en az 80 ug protein karışımı gerekli olacaktı. Fakat LC-MS/MS çalışmalarında kolona örnek başına 500 ng triptik peptit karışımı yeterli olmaktadır. Çalışmada anlamlı sonuçlar üretebilmek ve t-test hesaplamalarını yapabilmek için dört biyolojik tekrar ve üç teknik tekrar yapıldı. Böylece her örnek grubuna ait 12 data seti elde edildi.

Uyguladığımız proteomik tekniği “shotgun proteomics” ya da “bottom-up proteomics” olarak adlandırılan ve hücrelerden proteinlerin ekstraksiyonu, ardından tripsin ile parçalanıp elde edilen triptik peptitlerin ters faz kromatografisinde ayrıştırılmaları ve ayrıştırılan peptitlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için MS ve MS/MS deneylerinin gerçekleştirilmesini içermektedir. Bu aşamada uygulanabilecek iki yaklaşım vardır. Birincisi, “data dependent acquisition” olarak adlandırılan ve peptidin yüküne ve büyüklüğüne göre uygulanan çarpıştırma enerjisi ile sekans bilgisinin elde edilmesi. İkincisi ve bizim bu çalışmada kullandığımız yöntem ‘MS<sup>E</sup>’ olarak adlandırılan ve bütün peptitlerin önce düşük çarpıştırma enerjisinde m/z (kütle/yük) değerlerinin ölçüldüğü ve ardından da enerjinin artırılarak peptidin b ve y iyonu fragmanlarına parçalanıp sekans

bilgisinin elde edildiği yöntemdir. MS<sup>E</sup> yöntemi ile sonuçta her bir peptit için daha fazla b ve y iyonu elde edilmektedir ve bu iyonların fazlalığı sekans bilgisinin daha doğru olması anlamına gelmektedir. Ayrıca bu yöntemde her bir protein başına daha fazla peptit tanımlanmakta bu da protein tanımlama skorlarını artırmaktadır.

LC-MS/MS yönteminde protein ekstraksiyonu sonrasında elde edilen triptik peptitlerin ayrıştırılması için nano sıvı kromatografisi kullanılmaktadır. Bundaki neden düşük miktarda peptidin tekrar edilebilir bir şekilde gradient elüsyonunun gerçekleştirilmesi gereğidir. Kullandığımız ters faz kromatografisi yönteminde 90 dk'lık %3-35 ACN gradienti uygulanmıştır ve örnekler arası kromatografi kalitesi, farklı zamanlarda enjekte edilen QC (kalite kontrol) örneğindeki alıkonma zamanları kontrol edilerek yapılmıştır. Örnekler arası kromatografik ayrıştırmanın düzgün olduğuna karar verildiği zaman ham veri PLGS yazılımı ile analiz edilmiştir.

Protein tanımlamaları için Uniprot.org "homo sapiens reviewed" protein veribankası kullanılmıştır. Kullandığımız veri bankası 25,978 protein için sekans bilgisini içermektedir. NCBI veri bankası yerine Uniprot veribankasını tercih etmemizin nedeni fazlalıkların ve aynı proteine verilen birden fazla protein numarasının elimine edilmiş olmasıdır. Bu şekilde daha doğru bir tanımlama listesi elde etmiş oluyoruz.

Protein tanımlamalarının gerçekleştirilmesi için öncelikle peptitlerin belirlenmesi gerekmektedir ve bunun için Apex3D algoritması kullanılmıştır. Çizelge 5.1'de bu algoritma için kullanılan parametreler verilmiştir. Her bir kromatografik pikin tanımlanması için 0,2 dk pik kalınlığı belirlenmiştir. MS deneylerinde minimum 9000 TOF rezolüsyonu seçilmiştir. Rezolüsyon, doğru tanımlama ve peptit sayısı için önemli bir unsurdur.

72 örneğin analiz edildiği bu çalışma toplam 144 saat sürmüştür ve bu süre zarfında oda ısısı ~19C° olarak muhafaza edilmiştir ve odadaki nem oranı mümkün olduğu kadar minimum seviyede tutulmuştur. Sıcaklık ve nem kütle spektrometresini etkileyen ölçütlerdir.

Kütle spektrometresinde meydana gelebilecek sapmaların elimine edilmesi için sisteme her 45 sn'de bir dahili kütle kalibrantı olarak 'Glu fibrino peptide b' infüze edilmiştir. Bu kalibrantın çift yüklü hali olan 785,8426 m/z değeri belirlenerek sistemin kütle sapmaları kalibre edilmiş ve 144 saat boyunca doğru çalışması sağlanmıştır. Hangi sinyalin işleneceğinin belirlenmesi için düşük enerji alt limiti 150 iyon ve yüksek enerji alt limiti 50 iyon olarak belirlenmiş ve gürültü elimine edilmiştir. Bu Apex3D (Çizelge 5.1)

parametrelerine uygun olan, analiz süresince parçalanmış bütün peptitler tanımlanmaları için PLGS yazılımında işlenmiştir.

Attribute	Value
Chromatographic Peak Width	0.2
MS TOF Resolution	9000.0
Lock Mass for Charge 1	
Lock Mass for Charge 2	785.8426 Da/e
Lock Mass Window	0.25 Da
Low Energy Threshold	150.0 counts
Elevated Energy Threshold	50.0 counts
Retention Time Window	Automatic
Elution Start Time	
Elution End Time	
Intensity Threshold	1200 counts

**Çizelge 5.1.** Apex 3D Özellikleri ve Değerleri.

Apex3D algoritması tarafından belirlenen peptitlerin tanımlamaları, çizelge 5.2’de gösterilen “Databank Search Query” parametreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein tanımlamasının alt sınırı olarak peptit başına en az üç fragman iyon, protein başına en az yedi fragman iyon ve protein başına en az iki peptit belirlenmiştir. LC-MS/MS analizi öncesinde peptitler DTT ile indirgenmiş ve daha sonra da IAA ile metillenmiş olduğu için protein tanımlama parametreleri içinde ‘Carbamidomethyl C’ sabit modifikasyonu ve ‘Acyethyl N-TERM’, ‘Deamidation NQ’ ve ‘Oxidation M’ değişken modifikasyonları belirtilmiştir.

Bir protein tanımlanırken, MS/MS analizi sonucu elde edilen aminoasit sekansları kullanılır. Daha evvel de bahsedildiği üzere, bu tanımlamalar 3-7-2 kuralına göre yapılır. Tanımlama sırasında, bazen sekanslar tersinden okunabilir ve bu okuma sonucunda, gerçekte olandan farklı bir peptit tanımlanabilir. Bu tür tanımlamalara yanlış-pozitif (false positive) tanımlamalar denir. Bu tanımlamalar decoy database denilen bir tanımlama grubunu oluşturur. Apex 3D algoritmasında, yanlış pozitif tanımlamaların belirlenmesi için %4 değeri atanmıştır. Yani her 100 tanımlama içerisinde maksimum 4 adet yanlış-pozitif tanımlama oluyor. Daha sonrasında PLGS ile bu yanlış-pozitif tanımlamalar eleniyor.

72 örnekte grup analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için normalizasyonun yapılması gerekmektedir. Bu amaçla her örnek içerisine 50 fmol kadar alkol dehidrogenaz (P00924: uniprot) triptik peptitleri katılmıştır. Hem teknik hataların elimine edilmesi için hem de örnekler arası karşılaştırmanın yapılabilmesi için ADH kalibrantı gerekli olmaktadır. Örnek içerisine katılan kalibrantın en şiddetli üç peptit iyonu kullanılarak örnekteki

proteinlerden gelen triptik peptitlerin mutlak miktarları hesaplanmaktadır. Bu hesaplanan protein miktarları daha sonraki ifade farklılıklarının analizi için kullanılabilir.

Attribute	Value
Search Engine Type	PLGS
Databank	Uniprot_homo_sapiens_RANDO...
Taxonomy	
Peptide Tolerance	Automatic
Fragment Tolerance	Automatic
Min Fragment Ion Matches per P...	3
Min Fragment Ion Matches per P...	7
Min Peptide Matches Per Protein	2
Maximum Hits to Return	20
Maximum Protein Mass	250000
Primary Digest Reagent	Trypsin
Secondary Digest Reagent	None
Missed Cleavages	2
Fixed Modifications	Carbamidomethyl C
Variable Modifications	Acetyl N-TERM, Deamidation N, ...
Enriched Variable Modification	
Variable Glycosylation Modifications	
False Positive Rate	4
Calibration Protein	P00924
Calibration Protein Concentration	50
Manual Response Factor	
Monoisotopic or Average	Monoisotopic
Peptide Charge	1+
Instrument Type	ESI-QUAD-TOF

**Çizelge. 5.2.** Databank search query.

PLGS yazılımından elde edilen protein tanımlamalarının valide edilmesi gerekmektedir. Yukarıdaki parametreler bir proteinin tanımlanması için yeterli şart olarak belirlenmiş olsa da hatalı protein tanımlamaları elde edilebilmektedir. Scaffold 3 yazılımı “Protein Prophet” adındaki farklı algoritmaları kullanmaktadır ve PLGS tanımlamalarının onaylanması için kullanılabilir. Scaffold ve PLGS protein tanımlamaları tamamen farklı değildir. Sadece kullandıkları algoritmalarındaki sınır değerleri biraz farklı olduğu için PLGS’in doğru olarak tanımladığı bir protein Scaffold için yeterli olmayabilir ve aynı protein tanımlanmamış olabilir. Yapılabilecek en iyi şey, her iki arama motorunun protein tanımlamalarını birleştirmek ve ham veriden olabildiğince fazla protein tanımlaması elde etmek. Mümkünse X!Tandem, Mascot gibi diğer arama motorları sonuçları ile birleştirmek ki son dönemdeki eğilim bu yöndedir.

PLGS yazılımından elde edilen protein ifade farklılıkları ile Scaffold yazılımından elde edilen oranlar birebir aynı olmayabilir. Bunun iki nedeni vardır. Öncelikle PLGS analizinde 50 fmol dahili kalibrant kullanılarak protein miktarları hesaplanmakta ve ifade

farklılıkları, bu miktarlar üzerinden hesaplanmaktadır. Scaffold yazılımı ise ifade farklılıklarını hesaplarken 'spectral counting' denen bir yaklaşım kullanır ve toplam iyon şiddeti üzerinden oranları hesaplar. Bu farklılıktan ötürü PLGS ve Scaffold yaklaşımlarında kısmen farklı sonuçlar elde edilebilir. Diğer bir farklılık da her ikisinde normalizasyonun kalibranta göre ya da toplam iyon şiddetine göre yapılıyor olmasıdır. Bunun sonucunda görülen ise, PLGS ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan bazı oranların Scaffold yazılımında  $P < 0,05$  şartını sağlamıyor oluşu. Burada da yaklaşımımız bu tür anlaşmazlıklar durumunda ham veriye bakıp hangi sonucu kabul edeceğimize karar vermek şeklindedir.

PLGS ile mutlak miktarları belirlenen proteinler, PCA analiziyle değerlendirildikten sonra farklı grafikler elde edildi. Bunlardan ilki olan ve tüm grupların dahil edildiği skor teması (scores plot) grafiği, her biri farklı bir renk ile belirtilen mitokondriyal disfonksiyon gruplarının, birbirlerinden ne kadar farklı olup olmadığını göstermektedir (Şekil 4.1). Grafikte özellikle sodyum azit (Kompleks IV inhibitörü) ve MPTP (Kompleks I inhibitörü) ile muamele edilmiş nöroblastoma hücrelerinin, kontrol grubunun ve 3-NP (Kompleks II) ile muamele edilmiş nöroblastoma hücrelerinin grafikte yerleşimi belirgin bir farklılaşma göstermektedir. Bu farklılaşma, bahsedilen nörotoksinlerin sebep olduğu kompleks inhibisyonu sonucu oluşan her bir gruba ait proteomun kendine özgü olduğunu gösterir. Bu nedenle, bu nörotoksinler ile ilgili olduğunu vurdulduğumuz, AH, PH ve HH'nin patolojileri sonucu oluşan proteomlarının birbirlerinden farklı olduğu düşünülmektedir. Grafikte antimisin a ve oligomisinle muamele edilen grupların birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. Bu da bu grupların spesifik olarak farklı hastalıkların modellenmesi için kullanılabilir olacak nörotoksinler olmadığını ama oksidatif stres modeli olarak birbirlerine çok benzediğini düşündürmektedir. Fakat nörodejeneratif hastalıkların moleküler düzeyde birbirleriyle ortak olan birçok özelliğe sahip olmaları, semptomların benzerliği, hatta bazı hastalara bu yüzden tanı koymakta zorlanması, bize grafikte görülen grupların neden çakıştığını açıklayabilir. Grafikte normal değerlerin dışında görülen birkaç adet gözlem bulunmaktadır. Bu ekstrem durumların belirlenebilmesi için Hotelling's T2 grafiğinin değerlendirmesi yararlı olmuştur (Şekil 4.3) Bu grafikte, gözlemlerden sadece dört tanesinde diğer gözlemlere nazaran aykırılık görülmektedir. Bunlar aynı örneğin üçlü tekrarlarında görüldüğünden, hata LC-MS/MS analizi sırasında cihazın o anki durumundan kaynaklanmıştır ve bu cihazın hassas ölçümler yapmasından dolayıdır. Bununla beraber bu

aykırı gözlemlerin sayısının az olması, deneysel aşamanın yüksek düzeyde kararlı olduğunu gösterir.

Data tanımı tablolarında belirtilen gürültü seviyelerinin düşüklüğü sınıflandırmanın doğruluğunu göstermektedir (Çizelge 4.8., 4.9., 4.10., 4.11., 4.12.).

Her bir grubun kontrole karşı olan skor teması grafiğinde, grupların kontrolden açıkca farklı konumlandığı görülmektedir. Bu iki grubun istatistik olarak da proteomlarının birbirlerinden farklılaştığını, sonuç itibariyle mitokondriyal disfonksiyon durumundaki protein ekspresyonunun daha farklı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7., 4.11., 4.15., 4.19., 4.23).

Tüm grupları kapsayan tahmini değişken önemi (VIP) grafiğinde (Şekil 4.5), grupların birbirlerinden ayrılmasına en çok sebep olan, farklılaşmaya en çok katkısı olan proteinler belirlenmiştir. Bu proteinlerin çoğu PLGS ile elde edilen sonuçlarda da karşımıza çıkmıştır. Farklı iki inforatik yazılımdan aldığımız çoğunlukla ortak sonuçlar, dataların güvenilirliğine işaret etmektedir fakat elbette iki farklı biyoinforatik yazılımın verileri değerlendirilme şekli ve kapsamı aynı olamayacağından, verileri daha geniş bir şekilde değerlendirebilmek için daha çok PLGS sonuçlarına önem verdik. Daha sınırlı olan PCA analizine ait VIP grafiğiyle ortak olan proteinleri ise, açıklamalarına daha geniş yer vererek değerlendirdik. Proteinleri, nörodejenerasyona mevcut veya olabilecek katkıları ve biyobelirteç olarak değerlendirilebilmeleri ile ele aldık.

Alfa-enolaz, enolaz enziminin alt ünitelerinden biri olup, glikolizde görevlidir. Analiz sonucu oligomisinle muamele edilmiş grupta kontrole göre %39, 3-NP grubunda %20, Antimisin A grubunda %30 azalmıştır. Alfa enolazın nörodejenerasyondan etkilenen bir protein olduğu yaşlı fare beyinde yapılan proteomik analizlerde gösterilmiştir (Poon et al., 2005). Merkezi sinir sisteminde oksidatif stresin artması ve yaşlılıkla bağlantılı disfonksiyon üzerine, fare modellerinde yapılmış olan proteomik çalışmada, striatum bölgesinde 5 proteinde belirgin miktarda azalma görülmüştür. Kütle spektrometresi, immunohistokimya ve western blot tekniğiyle, azaldığı kanıtlanmış bu proteinlerden biri de alfa-enolazdır (Poon et al., 2006). Bizim mitokondriyal ETS'de kompleks V, kompleks II ve kompleks III'ün bozulmasıyla alfa enolazın azaldığını görmemiz, alfa-enolazın nörodejenerasyon ve mitokondriyal disfonksiyonla ilgili olan bir protein olduğunu göstermektedir.

Gama enolaz, sadece nöronlarda ve nöroendokrin hücrelerinde bulunan bir proteindir (Schmechel et al., 1987). Merkezi sinir sistemi üzerinde nörotrofik ve nöroprotektif etkileri vardır. Hücre kültürü çalışmalarında, stres gibi negatif durumları

mütakiben, neokortikal nöronların kurtarılmasını destekler. Merkezi sinir sistemi tümörlerinde (Cras et al., 1988; Jitavi et al., 1988; Nakajima et al., 1985), nöroblastomalı kişilerin serumlarında (Osborn et al., 1986; Zeltzer et al., 1986) ve fare beyininde oluşan mekanik lezyonlarda görülmesi (Hardemark et al., 1988; Steinberg et al., 1984), gama enolazın nöronal hasarın göstergesi olarak düşünülmesine sebebiyet vermiştir. Gama enolaz, nörodejeneratif hastalığa sahip kişilerde genel olarak beyin omurilik sıvısında (BOS) artmış olarak bulunur (Forooghian et al., 2007). Fakat gama enolaz seviyelerinin nöronal hasar durumunda, birbirine zıtlık içeren sonuçlar gösterdiği çalışmalar da mevcuttur. Bizim çalışmamızda, sadece sodyum azit grubunda %26 lık bir artış varken, diğer gruplarda %20 ile %40 arasında azalma gözlemlendi. Mevcut çalışmalarda da görülen fikri çatışmaları ve gama enolazın hücre içi birçok olayda yer aldığını göz önüne alarak, sentezini etkileyen faktörlerin karmaşık olduğunu ve tek başına nöronal hasarın göstergesi olamayacak bir protein olduğunu düşünmekteyiz. Sadece sodyum azit grubunda artmış olmasının ikinci bir nedeni de diğer nörodejeneratif hastalıklara nazaran, AH patolojisine özgü bir protein olabileceğidir.

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) enzimi antimitozin A grubu dışındaki gruplarda, ortalama %32 oranında azalmıştır. GAPDH klasik bir glikolitik enzim olup, oksidatif stres durumunda hücre ölümünde ve apoptozda aracı olup ayrıca nöropsikiyatrik durumlarla bağlantılıdır (Chuang et al., 2005). Her yerde setezlenen bir enzim olduğundan dahili standart olarak da kullanılır (Huggett et al., 2005). Normal durumlarda glikoliz görevi mevcutken AH, HH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda nükleusa lokalize olur ve nöron apoptozuna katılır (Huang et al., 2009). Oksidatif stres artışıyla beraber GAPDH agregatlaşması artar ve bu hücre ölümüne neden olur. Ayrıca AH'deki agregatlarda ve PD'deki Lewy body cisimciklerinde de GAPDH agregatları bulunmuştur (Tsuchiya et al., 2005) A $\beta$  ve huntingtin proteinleriyle sıkı bir ilişkisi vardır (Schulze et al., 1993). GAPDH'nin agregatlaşmaya meyilli mutant halinin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres indüklü hücre ölümünü çoğalttığı bulunmuştur (Nakajima et al., 2009). Rotenon (Kompleks I inhibitörü) indüklü oksidatif stres modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, GAPDH miktarının arttığı görülmüştür (Huang et al., 2009). Bir başka çalışmada ise AH olan kişilerde GAPDH mRNA ekspresyonunun belirgin bir şekilde azaldığı görülmüş ve GAPDH'in AH çalışmalarında RT-PCR'da kullanılabilecek bir housekeeper (hücrede temel fonksiyonlara katılan, DNA, RNA ve protein işlemlerine katılan proteinler) olmadığını göstermişlerdir (Brooks et al., 2007). Başka bir çalışmada ise, AH'li kişilerde oksidatif modifikasyon sonucu GAPDH

dehidrogenaz aktivitesinde ciddi bir azalma görülmüştür (Butterfield et al., 2010). Bu çalışmada belirlenen GAPDH aktivitesindeki azalmanın, translasyonel bir azalmadan kaynaklanabileceğini düşündük. Hücre içindeki seviyelerinin azalmasının çok farklı sebepleri olabilir. Her ne kadar oksidatif stres ve hasar, AH taşıyan beyinlerde ortak bir fenomen olsa da, glikolitik enzimlerin aktivitelerinde azalma, AH patolojisindeki nöronda, hücre büyümesinin ve canlılığın devam etmesini etkileyen bir yol da olabilir. Oksidatif stresle beraber gelen modifikasyonla, enzimler yapılarını bozacak hasarlar alıp, hücre için zararlı olan yollara katılıyor olabilir ve belki de bu yüzden hücre içi savunma mekanizmalarınca tanınıp inhibe ediliyor olabilirler. Onun için bu durumda diyebileceğimizden biri, oksidatif stres ve mitokondriyal bozukluk durumunda bu protein seviyesinde görülen azalmadır. Fakat aşırı oksidasyona uğramış olan proteinlerin LC-MS/MS sisteminde tanımlanamama ihtimalini göz önüne alırsak, GAPDH miktarında görülen azalma bundan da kaynaklanıyor olabilir.

14-3-3 proteinleri ilk olarak beyinde bolca bulunan asidik bir protein olarak tanımlanmıştır (Moore and Perez, 1967) ve tüm ökaryotlarda sentezlenen, korunmuş, düzenleyici bir familyaya ait proteinlerdir. En önemli özellikleri, kinazlar, fosfatazlar ve transmembran reseptörleri gibi birbirinden farklı görevleri olan sinyal proteinlerine bağlanıyor olmasıdır. 14-3-3 proteinlerinin çok fazla etkileşim halinde olması, bu proteinleri mitojenik sinyal iletimi, nöronal büyüme, apoptotik hücre ölümü ve hücre döngüsü kontrolü gibi çok önemli düzenleme işlemlerinde önemli role sahip kılmaktadır (Fu et al. 2000). AH'deki nörofibriler düğümlerde (Layfield et al., 1996) Creutzfeld-Jakob hastalığında (Zerr et al., 1998) ve paraneoplastik nörolojik hastalıklarda BOS'da bulunmuşlardır (Saiz et al., 1999). Daha sonraki çalışmalarda PH'deki Lewy cisimciklerinde bulunmuşlardır (Ubl et al., 2002). 14-3-3 proteininin apoptozu bloke ettiği ve MAPK basamaklarında regülasyon görevi olduğu bulunmuştur (Xing et al., 2000). Biz de bu proteinleri AH ve PH modeli olarak sunduğumuz sodyum azit ve MPTP grubunda, sırasıyla %50 ve %20 kadar arttığını gördük. 14-3-3 proteinin özellikle AH ve PH için yapılan çalışmalarda dikkat çektiğini göz önüne alarak, bu proteinin bu iki grupta artmış olmasını, AH ve PH'de nöronal hücre ölümünü önlemek için olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca 14-3-3 zeta proteinin agregat oluşumunda görev alıp, katlanmamış proteinleri ortadan kaldırması, nöronları koruma amacıyla olduğu düşünüldüğünden (Kaneko., 2006), MPTP ve sodyum azit gruplarında artmış olan 14-3-3 zeta-delta, teta ve gama proteinlerinin, oksidatif stres sonucu oluşan yanlış katlanmaları engellemek için arttığını düşünmekteyiz. IPA yolak analizi sonucu elde ettiğimiz haritada (Şekil 4.32),



YWHAZ sembolüyle 14-3-3 proteini en çok göze çarpan proteindir. Hastalık-bağlantılı olan bu şema, 14-3-3 proteininin nörodejeneratif mekanizmalarla bağlantılı olduğunun bir başka göstergesidir.

Nörodejeneratif hastalıkların erken teşhisi için kullanılabilecek biyobelirteçler gerekmektedir. AH için şimdiye kadar ortaya konulmuş en umut verici biyobelirteçler, beyin omurilik sıvısında bulunan tau, amiloid-B proteinidir. Creutzfeld-Jakob hastalığı için ise 14-3-3 proteindir ve bunama için de bu protein biyobelirteç olarak görülmektedir (Green, 2002). Aβ ile muamele edilmiş primer rat kortikal nöron kültüründen elde edilen mitokondriyalarda yapılan, proteomik bir yöntem olan ICAT analizinde, 14-3-3 zeta/delta proteininde %42lik, 14-3-3 teta proteininde ise %50 lik bir artış gözlemlenmiştir (Lovell et al., 2004). Bu bulgular çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara oldukça benzerlik göstermektedir. Biz bu bilgiye ek olarak 14-3-3 gama proteininde de %25'lik bir artış gözlemledik.

Profilin-1 proteini, nöronal büyüme, nöronal farklılaşma ve sinaptik plastisite için gerekli olan bir proteindir (Birbach, 2008). 3-NP, oligomisin ve antimosin A gruplarında %40 oranında azalmıştır. İnsan beyin endoteli hücrelerinin oksidatif strese uğratılmasından sonra, membran komponentlerinden özellikle üç adet proteinde azalma gözlenmiştir ve bunlardan biri de profilin-1 proteindir (Ning et al., 2010). Bu yüzden Profilin-1 oksidatif stres durumundan etkilendiğini ve azalışının mitokondriyal disfonksiyon belirtici olduğunu düşündüğümüz proteinlerden biridir.

Laktat dehidrogenaz (LDH), piruvatı laktata dönüştüren, glikolitik bir enzimdir. Sodyum azit grubunda L-laktat dehidrogenaz B zinciri %38 artmıştır. AH'li kişilere ait beyin örnekleri üzerinde yapılan transkripsiyonel bir çalışmada, laktat dehidrogenaz miktarında bir değişime rastlanmamıştır (Chandrasekaran, 1994). Yakın zamanda yaşlanmaya bağlı beyindeki mitokondriyal disfonksiyona yönelik değişimlerin, farelerin beyni üzerinde, proton manyetik rezonans spektroskopisi ve HPLC ile incelendiği bir çalışmada, laktat seviyelerinin iki kat kadar arttığı görülmüştür. Spektroskopik incelemeler sonucu, LDH aktivitesinin artışı, piruvat-laktat dönüşümünün artmış olmasıyla belirlenmiştir. Bu durumun açıklamasını ise, beyinde mitokondriyal disfonksiyonun, aerobik solunumdan glikolitik metabolizmaya kayarak bir metabolik değişime neden olması şeklinde açıklamışlardır. Bunun sonucunda ise LDH genlerinde (LDH-A ve LDH-B) ekspresyon değişimi olup, beyindeki laktat miktarı artıyor (Ross, 2010). Bu, bizim de sodyum azit grubunda bulduğumuz sonucu onaylıyor. Bahsedilen çalışmada artan laktat miktarı, laktatın oluşumunu sağlayacak enzimin, yani LDH'nin artışıyla ilişkilendirilebilir.

Ayrıca yine bahsedilen metabolik kayma, yani gen ekspresyonunda LDH-B'nin artışı, biz proteomik çalışmamızda direk LDH-B zincirinin artmış olmasıyla göstermiş olduk. Ross ve ark. (2010) yaptıkları çalışma sonucunda, yaşlanmanın presemptomatik dönemlerinde dahi laktat miktarının, mitokondriyal yaşlanmada bir belirteç olmasının muhtemel olduğundan bahsetmiştir. Fakat biz çalışmamızda sadece, sodyum azit grubunda bu artışı gördük. 3-NP, antimisin a ve oligomisin gruplarında ise LDH miktarında ortalama %25'lik bir azalma gördük. Bunun için laktat metabolizmasında görevli olan LDH enziminin, sadece AH'de (soydam azit modeli AH için yapılmıştı) semptom öncesi bir biyobelirteç olabileceğini ve AH'ye ait bir durum olduğunu düşünüyoruz. Ayrıca 3-NP ve oligomisin gruplarında, LDH-A ve LDH-B zincirlerinin ikisinde neredeyse eşit yüzde azalma görmüş olmamız, LDH metabolizmasındaki kaymanın yine sadece AH'ye özel bir mitokondriyal bozuklukta görülmüş olabileceğini düşünüyoruz.

Malat dehidrogenaz (MDH), malatı oksaloasetata ve oksaloasetatı malata dönüştüren, sitrik asit döngüsündeki bir enzimdir. Çalışmamızda, sodyum azit grubunda MDH seviyesinin kontrole göre % 68 oranında artmış olduğu gözlemledik. AH modeli olarak seçtiğimiz soydam azit grubundaki bu artışın birçok çalışmayla ortaklık gösterdiğini gördük. AH'de mitokondriyal anormalliklerin araştırıldığı bir çalışmada, MDH ve sükkinat dehidrogenaz enzimlerinin oksidasyon seviyesinde ciddi düşüşler saptanmıştır (Korolainen et al., 2006). Daha ileriki yıllarda yapılan çalışmalarda ise MDH'nin AH'de artış gösterdiği tespit edilmiştir (Korolainen and Pirttila, 2009). AH'li kişilerde yapılan otopsik çalışmalarda, malat dehidrogenaz aktivitesinde %54'lük bir artış gözlenmiştir (Bubber et al., 2005). 2010 yılında yayınlanan bir patentte, MDH hedefli terapinin nörodejeneratif hastalıklar için tedavi yöntemi olabileceğinden de bahsedilmiştir (Nava and Yael, 2008). MDH'daki değişimlerin baskın geldiği bir diğer çalışma da erken Alzheimer hastalığı (EAH) üzerine yapılan çalışmalardır. Hafif kognitif bozukluk ile ileri derece AH arasında bulunan bu AH basamağında görülen proteomik değişimler incelenmiş ve EAH'de spesifik olarak bulunan 6 protein görülmüştür. Enerji metabolizması sınıfında, alfa enolazın ve malat dehidrogenazın AH patolojisinde rol oynadığını öne sürmüşlerdir ve oksidatif stresin AH gelişiminde erken bir olay olduğunu savunmuşlardır (Reed et al., 2009). En yeni çalışmalardan birinde, AH patolojisini tespit etmek için, transgenik fareler kullanılmış ve mitokondriyal değişimlerin, farelerin beyninde henüz amiloid plakların ve nörofibriller düğümlerin oluşmadan meydana geldiği görülmüş ve mitokondriyal disfonksiyonun AH patolojisinde erken bir olay olduğu savunulmuştur. Bu mitokondriyal değişimlerin içinde artmış MDH seviyesi de tespit edilmiştir (Choua et al., 2011). MDH seviyesindeki artma

in-vitro modelimiz dahil diğer birçok çalışmada da görüldüğünden, özellikle erken AH'de oksidatif stres temelli mitokondriyal bozuklukta etkilenen bir protein olduğunu ve AH erken teşhisinde de kullanılabileceğini düşünüyoruz.

Hücre iskeletinde meydana gelen değişimler AH ve PH' de belirlenmiş hatta bu yüzden bu hastalıklar hücre iskeletsel rahatsızlıklar olarak da adlandırılmıştır (Calne et al., 1989). Birçok kanıtı dayanarak, nörodejeneratif ve psikiyatrik durumlarda, nöronlarda değişmiş bir hücre iskeleti organizasyonu ve yapısı görülmüş, sinaptik bağlarda bozulma, aksonal bilgi iletiminde değişim gibi durumlar bununla ilişkilendirilmiştir.

Hücre iskeletine has değişimler nörodejeneratif hastalıklarda ve bunamada histopatolojik belirteç olarak belirlenmiştir (Pollak et al., 2003). Hücre iskeleti, nöronların asimetric şekillerini ve yapısal polaritelerini korunmasında önemli role sahiptir. Hücre şeklinin ve yapısal polaritenin, nöronal fizyoloji için önemi çoktur (Friendrich, 1990; Cid-Arregui et al., 1995) Tübülünlerin tekrar organize olmaları ve iletişim kurdukları proteinlerin değişimini sağlayan dinamik instabiliteleri, özellikle nörit büyümesi ve geri çekilmesi işlemlerinde yararlı bir döngüdür (Reinsch et al., 1991). Sinaptogenez ve nörotransmitter madde salınımında da rol oynarlar (Trifaro et al., 1993). Yapı itibarıyla bozulmuş tubulinler hem PH'deki Lewy cisimciklerinde (Galloway et al., 1988) hem de AH'deki nörofibriler yumaklarda bulunmaktadır. AH'de nörofibriler düğümlerin çoğu mikrotübül asosiy protein olan tau'dan oluşmaktadır. Normal koşullarda tau, mikrotübüle bağlanarak nöron yapısını ve sağlamlığını stabilize eder fakat aşırı fosforlandığı durumda nöronların asimetric polaritesini koruyamamaya başlar (Brandt et al., 1994; Mickey et al., 1995).

Mikrotübüller, oluşum hızlarından çok daha hızlı bir şekilde depolimerize olabilirler (Desai et al, 1997). Bunun aksonal rejenerasyonda önemi büyüktür (Pellier-Monnin, 2001). Mikrotübüllerin stabilizasyonunu bazı kimyasal modifikasyonlar sağlayabilir. Nöron kültürlerinde, mikrotübüllerdeki alfa tübülünlerin asetillenerek ya da tirozinlenerek stabilize olduğu görülmüştür. Bunun yanında, mikrotübül düzenleyici proteinlerin (MAPs) mikrotübüllere stabil ve mekanik özelliklerini kazandırdığı bilinmektedir (Matus et al., 1991). MAPs'lerden biri de mikrotübülleri, çözünür tübülün dimerlerine ayırarak destabilizasyonlarını sağlayan Statmin proteindir (Sobel, 1991). Bu protein sodyum azit grubunda %55 kadar artış göstermiştir. Bu, sodyum azit grubundaki mikrotübüllerin mekanik olarak yıkıldığına dair kanıt olabilir. Fakat diğer gruplarda bu proteinin azalmış olması, mikrotübül depolimerizasyonunun diğer gruplarda, başka bir proteinle gerçekleştiğini düşündürmektedir.

AH'nin proteomik incelenmesi için, iki boyutlu jel elektroforeziyle yapılan çalışmada belirlenen tübülün miktarlarında da düşüş gözlenmiştir (Shiozaki et al., 2004). Çalışmamızda, mikrotübüllere ait yaklaşık 10 kadar protein bulunmuştur ve tüm gruplarda tübülün proteinlerde %20-52 arasında bir azalma gözlenmiştir. Nörodejenerasyon modelleri olarak düşündüğümüz gruplarda görülen sonuçlar, mevcut bilgilerle paralellik göstermektedir.

Oksidatif stresin hücre iskeletinde meydana getirdiği değişimlerin önemi büyüktür. Bir toksin olan menandin ile indüklendmiş oksidatif stres, mikrotübül depolimerizasyonuna neden olmuş ve GTP-indüklü mikrotübül organizasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca oksidasyonun, hücre iskeleti proteinlerinin elektroforetik hareketliliğini etkilediği belirlenmiştir (Bellomo et al., 1990). İnsan kortikal HCN2 nöronal hücrelerine, bir nörotoksin olan butilhidroperoksit ile muamele edildiğinde, mikrotübüllerin, mikrofilamentlerin ve vimentin filamentlerinin yıkıldığı görülmüştür (Allani et al., 2004). Bu bilgiler ile mikrotübül yapılarının, nöronların canlılığını ve işlevselliğini devam ettirebilmeleri için gereken önemli yapılar olduğunu ve mikrotübül yapılarına has azalmanın hem nörodejeneratif hastalıklarda hem de oksidatif stres sonucu oluştuğunu görüyoruz. Bu durum oksidatif stresin mitokondriyal disfonksiyon ve nörodejenerasyonla ile iç içe olduğunu gösterir. Bunun yanında, in-vitro gruplarımız ile oksidatif stres modelini yapabildiğimizin bir göstergesi olabilir.

Bunamadan muzdarip kişilerde, hafıza ve bilişsel kayıp varlığı bilinmektedir. Bunun üzerine hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, mikrotübül bozucu bir kimyasal olan kolşisin kullanılmış ve yeni edinilmiş hafızada kayıp görülmüştür. Yine kolşisin, bir günlük civcivlere kaçınma davranışı öğretildikten önce ve sonra, civcivlerin ön beyinlerine enjekte edildiğinde geçici hafıza kaybı yaşadıkları görülmüştür. (Bell et al., 1981). Mikrotübül bozunmasının bunamadaki bilişsel yitirime doğrudan sebep olduğu, ratlarda kolşisinin öğrenme kabiliyetinde bozulmaya yol açması, son yakın hafızanın yok olması, geçici hafıza kaybı gibi AH'deki semptomların görülmesiyle anlaşılmıştır (Bensimon et al., 1991). Bizim bu değişimi tüm gruplarda görüyor olmamız, nörodejeneratif hastalıkların hücre iskeleti değişimleri bakımından birbirlerine benzediğini göstermektedir.

Aktin filamentleri de hücre iskeletinin bir diğer önemli unsurudur. Mikrotübüller gibi polariteleri vardır. Nöronlarda hücre polarlığının sağlanmasında, nörit ve akson uzantılarının oluşumunda, akson geri çekilmesinde aktinlerin rolü büyüktür (Gallo et al., 2002). Hücre içinde, polimerize olmamış aktinin konsantrasyonu daha fazladır. Bunun sağlanabilmesi için depolimerize edici proteinler bulunur. Bunlardan bazıları, kofilin ve

profilidir (Bamburg, 1999). Beyin endoteli üzerinde oksidatif stres uygulaması üzerine yakın bir zamanda yapılan proteomik bir çalışma sonucunda profilin seviyesinde azalma görülmüştür (Ning et al., 2011). Bunun yanında, uzun dönemli hafızada oluşan değişimler ve çoğu aktin mikrofilamenlerinden oluşan dentritik spinlerde azalma, kolçisin ile muamele görmüş farelerin hipokampuslerinde bulunmuştur (Avila-Costa et al., 1999). Çalışmamızda saptanan tüm aktin ve aktin benzeri proteinler %20 ile %80 arasında azalma göstermişlerdir. Ayrıca aktin stabile edici profilin ve kofilin proteinlerinde de azalma görülmüştür. Bu bize mitokondriyal disfonksiyonun ve oksidatif stresin, mikrotübül ve aktin seviyelerine etki ettiğini göstermektedir.

Acyl CoA dehidrogenaz aile üyesi 9 (ACAD9) proteini, sadece kontrol gruplarında görülmüştür. Mitokondriyal bir enzim olan ACAD9, oksidasyon redüksiyon süreçlerinde rol alır ve birçok dokuda eksprese edilmekle beraber, kalp, iskelet kası, beyin, böbrek ve karaciğer dokularında yüksek oranda eksprese edilir. ACAD9 eksikliği olan hastalarda karaciğer ve böbrek rahatsızlıkları ile beraber nörolojik disfonksiyonlara rastlanmıştır. Yine ACAD9 mutasyonları, mitokondriyal yağ asidi zinciri oksidasyonu hastalıklarında gözlenmiştir (He et al., 2007). ACAD9, Acyl Coa esterlerinin  $\alpha$ - $\beta$ -dehidrogenezini kataliz eder. Uzun zincirli yağ asitlerinin  $\beta$  oksidasyonuna katılır ve oksidatif fosforilasyon aktivitesi olduğu da öne sunulmuştur (Zhang et al., 2002). Fakat bu bilgi, ACAD9'un  $\beta$ -oksidasyonundan ziyade, mitokondriyal kompleks I'in toplanmasında rolü olduğu şekilde değişmiştir. Ayrıca hafif kronik nörolojik bozukluğu olan hastalarla da çalışıldığında, aynı sonuçlar alınmıştır (Nouws et al., 2010). Bu enzimin diğer gruplarda bulunmaması, oksidatif stres ile ekspresyonunun inhibe edilmiş olmasından ya da nörotoksinler ile oluşan yeni proteomdaki bazı proteinlerin yoğunluğuyla sinyalinin bastırılmasından kaynaklanabilir.

MPTP' ye ait olan grubun VIP grafiğinde (Şekil 4.14) tanımlanan ve farklılaşmaya en çok neden olan proteinlerden biri DJ-1 proteindir. Bu protein şaperon proteindir ve mitokondriye özgüdür. Bu proteini kodlayan gende oluşan mutasyonlar PH hastalarında gözlenmiştir ve aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Bonifati et al., 2003). Bu proteinin görevi hakkında birçok yorum vardır. Bunlar arasında oksidatif strese ve hücre ölümüne karşı koruma, mitokondriyal proteinlerde düzenleme ve redoksa özgü şaperon görevleri sayılabilir (Lev et al., 2006). Kontrole nazaran hücredeki seviyesinin önemli bir şekilde değişmiş olması, bu proteinin VIP grafiğinde yer almasına sebep olmuştur. Bu, SH-SY5Y hücrelerinde MPTP nörotoksini uygulamasının geçerli bir PH modeli olmasını gösterebilecek bir bulgudur. Fakat bu protein PLGS sonuçlarında gözlenmemiştir. Bunun iki

sebebi olabilir. Biz PLGS sonuçlarını belirlerken, protein seviyelerinde en az %20 değişim gösterenleri tarattık. DJ-1 proteini bu sınırın altında kalmış olabilir. İkinci bir ihtimal olarak da yine PLGS sonuçları için, spesifik bir proteinin tanımlandığı örneğin, üçlü analiz tekrarlarından en az iki tanesinde gözlemlenmesini istedik. DJ-1 proteini sadece bir enjeksiyonda gözlemlenmiş olabilir. Bu ise LC-MS/MS analizi sırasında değişebilecek birçok etkenden biri tarafından kaynaklanmış olabilir. Bu açıklama iki farklı informatik yazılım tarafından gerçekleştirilen ve ortak olmayan tüm proteinler için geçerlidir.

Peptidil prolil izomeraz her dokuda bolca bulunan (ubiquitously) ve denaturasyona uğramış olan proteinlerin tekrar katlanma sürecini hızlandıran bir proteindir (Fischer et al., 1984). Bu protein sodyum azit dışındaki gruplarda %20 ile %50 arasında azalma göstermiştir. Bu halde bu proteinin, yanlış katlanma mekanizmalarını engellemek amacıyla gruplarda artması beklenirdi. Beklenene zıt olan bu sonuç, aşırı oksidasyonun katlanma mekanizmalarına olumsuz etki edebileceğini gösterebilir.

Peroksiredoksinler, yaygın olarak görülen antioksidan enzimlerdir ve sitokin-indüklü peroksit seviyelerini kontrol ederler. Nöronlarda bolca bulunup, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerini kontrol ederek ROT kaynaklı hasarı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>O'ya dönüştürerek önlerler (Rhee et al., 2005). Hücrede redoks düzenleyici olarak görev yaparlar ve radikallere karşı hassas olan enzimleri oksidatif strese karşı korurlar (Masaki et al., 2003). Canlılığın devam etmesinde rolleri büyüktür. Peroksiredoksin-1-knockout farelerdeki yaşam süresinin %15 kısaldığı görülmüştür (Neuman et al., 2003). Çalışmamızda, 3-NP grubunda görülen peroksiredoksin 1 ve peroksiredoksin 2, sırasıyla %40 ve %30 kadar azalmıştır. Ayrıca antimisin a ve oligomisin gruplarında da ortalama %40 oranında azalma gördük. HH üzerine yapılan beyin otopsi çalışmalarında, striatum ve kortekste peroksidaz 1 ve peroksidaz 6 seviyelerinde artış gözlenmiştir (Soralla et al., 2008). Bununla beraber peroksiredoksinlerin seviyece az sentezlendiği görülen çalışmalarda, az sentezlenen bölgenin ekzitotoksik hasarsa karşı daha hassas olabileceği de düşünülmüştür (Candelario et al., 2001). Bizim çalışma sonucumuz genel olarak açıklanan sonuçlara uymamaktadır. Bu peroksiredoksinlerin aşırı oksidasyona uğramasından ve LC-MS/MS sisteminde görünmemiş olmasından kaynaklanabilir.

Tioredoksine bağlı peroksit redüktaz, diğer adıyla Peroksiredoksin III, çalışmamızda sadece 3-NP grubunda ortaya çıkmıştır. Mitokondriyal bir peroksiredoksindir. İn-vivo ortamda, hipokampüsteki nöronlarda, ekzitotoksik hasara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Hattori et al., 2003). Bizim bu proteini kontrol grubunda görmememiz, kontrol grubunda çok az miktarda olup, gölgelenmesinden kaynaklanabilir.

Bu yüzden bu proteinin 3-NP grubunda artış gösterdiğini kabul ettik. Şimdiye kadar elde edilen sonuçların çalışmamızla karşıt olması bu çalışmaların gen bazında yapılmış olup, Prx3'ün oluşturulacağı mRNA baz alınarak yapılmış olmasından kaynaklanabilir. Proteinlerin gen bazında ve translasyon sonrasındaki durumları birbirleriyle aynı olmayabilir.

Uzama faktörü (EF) proteinleri, tüm mitokondriyal disfonksiyon gruplarında EF-1, EF-2, EF-Tu olarak tanımlanmış ve tüm gruplarda kontrole göre %65-30 kadar azalma göstermiştir. Uzama faktörü 2 mRNA translasyonu sürecinde, uzama basamağında görevli olan önemli bir proteindir (Merrick and Nyborg, 2000). Bu nedenle, gözlemlenen azalma oksidatif stres ile protein sentez hızının yavaşladığının bir göstergesi olabilir. Ayrıca hücrenin kendini koruma mekanizmalarından biri olabilir. Ef-2 proteini HH üzerine yapılan bir çalışmada, protein agregatlarında rastlandığından, poliglutamin hastalıkların patolojisiyle ilişkilendirilmiştir (Mitsui et al., 2002). Bizim gruplarımızda da Ef-2 proteini soydum azit ve MPTP gruplarında görülmemiş, 3-NP grubunda (HH modeli) görülmüştür. Mitokondriyal disfonksiyon HH için de tanımlandığından, bu proteinin HH mitokondriyal disfonksiyon belirteci olabilir.

Glutation S transferaz proteinleri (GSTs), tüm hücre gruplarında sentezlenen, hücre sel detoksifikasyonda rol oynayan bir proteindir. Bu enzimler hücredeki toksinleri glutationa bağlayarak toksinlerin elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve toksinleri suda çözünür hale getirir (Mannervik et al., 1985). Bu halde, nörotoksin uygulanmış nöroblastoma hücrelerinde miktarca artmaları beklenirdi. Fakat PLGS sonuçlarında sodyum azit grubunda %36 kadar artmış, diğer gruplarda azalmış olduğu görüldü. GSTP tüm gruplara ait VIP grafiğinde de tanımlanmıştır. Grupların ayrılması için önemli olduğu belirlenmiş proteinlerden biridir. Bu protein, PH ile ilişkilendirilmiş ve PH durumunda arttığı ayrıca AH hastalığında da PH'de olduğu kadar olmasa da arttığı gözlemlenmiştir. GSTP1'in overeksprese edildiği nöron kültürlerinde, rotenon indüklü (kompleks I inhibitörü) oksidatif stres durumunda koruma sağladığı, oksidatif stresi azalttığı gözlemlenmiştir (Shi et al., 2009). Mevcut bilgilere göre GSTP'nin soydum azit grubunda artışı (AH grubu) bir anlam ifade ediyor. Hem AH hastalarında artmış olması hem de in-vitro mitokondriyal disfonksiyon grubumuzda artması, GSTP seviyelerinin AH ile ilişkilendirilebilceğini göstermektedir. Bununla beraber diğer gruplarda azalması mevcut bilgilerle uyum göstermemektedir. Araştırmalarda redüksiyona uğramış glutationun, merkezi sinir sisteminde en çok bulunan intraselüler tiollerden ve önemli hücre sel antioksidanlardan olduğu belirtilmiştir (Meister, 1983). Glutation S-transferaz aktivitesi ve

redüksiyona uğramış glutation arasında da doğru orantı tespit edilmiştir (Goto et al., 1992). Glutation azalması hücrenin oksidatif stresle başa çıkma kapasitesini azaltarak nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı öne sunulmuştur (Jenner et al., 1994). Dolaylı olarak bu enzimin azaldığı durumlarda da aynı fikrin geçerliliği söz konusu olabilir. Antimisin a, oligomisin ve 3-NP nörotoksinleri, hücrenin antioksidan sistemine zarar vermiş olabilir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Nörodejeneratif hastalıklar alanında yapılan çalışmalarda, mitokondriyal disfonksiyonun ve oksidatif stresin önemi sıklıkla belirtilmiştir. AH, HH ve PH bu yüzden moleküler olarak birbirlerine birçok noktada benzemektedirler. Bu hastalıkların oluşum mekanizmalarını aydınlatmak amacıyla *in-vitro* ve *in-vivo* olarak çok çeşitli modeller kullanılmıştır. Biz de SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde elektron taşıma sistemindeki (ETS) kompleksleri, bu komplekslere özgü inhibitörler ile inhibe ederek AH, HH ve PH'ye ait mitokondriyal disfonksiyon hücre modellerini ürettik. Hem *in-vivo* hem de *in-vitro* çalışmaların geneliyle ortak sonuçlara vardık. Bulgularda gördüğümüz proteoma has değişimlerle, *in vitro* ortamda oksidatif stres modelleri elde edebildiğimizi gördük.

Çalışmamızdaki tüm gruplar ETS'deki komplekslerin inhibe edilmesi sonucu oluşan oksidatif stresten etkilendiği halde, her bir gruba ait proteomun kendine has şekillendiğini görmemiz, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin farklı nörodejeneratif hastalıklarda farklı yolları tetiklediğini göstermektedir.

Elde edilen PLGS analizleriyle belirlenen, gruplardaki değişen protein miktarları, oksidatif stresin; apoptoza, protein sentezine, protein katlanmasına, hücre iskeleti bileşenlerine etki ettiğini göstermiştir. Gruplara göre farklılaşmış olan proteomun daha ayrıntılı çalışılmasıyla mitokondriyal disfonksiyonun nörodejenerasyona etkisi daha iyi açıklanabilir.

*In-vivo* ve *in-vitro* ortamda yürütülmüş çalışmalarda yöntemlerin farklı olmasına rağmen benzer sonuçlar bulmamız, bize LC-MS/MS analizinin proteomik araştırmalarda kullanılabilecek güçlü bir yöntem olduğunu ve SH-SY5Y hücrelerinin bu gibi çalışmalarda tercih edilebilecek istikrarlı hücreler olduğunu göstermektedir.

İnsana ait moleküler hücre biyolojisi çok karışıktır ve özellikle beyne ait mekanizmalar, bozunmalar, değişimler de araştırılması karmaşık ve zorlayıcı konulardandır. Bu mekanizmaları aydınlatılabilmek için birçok yöntem başvurulabilir.

Yaptığımız çalışma sonucunda şimdiye kadar SH-SY5Y üzerinde yapılmış proteomik çalışmalara kıyasla eşit ya da daha çok protein tanımlaması gerçekleştirdik. Fakat hücre içinde, özellikle insana ait hücrelerde proteinlerin bulunma yoğunlukları çok değişken olduğundan tüm proteinleri tek bir yöntemle tanımlamak mümkün olmamaktadır. Bu sorun, aynı deneyin birkaç yöntemle beraber yürütülmesiyle aşılabılır. Bizim kullandığımız sistem 1D LC-MS/MS yöntemi idi. Bu, biraz daha ileri götürülerek şu an mevcut olan 2D LC-MS/MS yöntemiyle, iki boyutta peptit ayrıştırılması yapıp, protein

sayısının artması sağlanabilir. Yine bir başka yöntem olan, offgel sıvı izoelektrik peptit fraksiyonlaması ile tanımlanabilen proteom genişletilebilir ve ardından İTRAQ grup analizi yapılabilir.

Çalışmamızda, mitokondriyal disfonksiyon sonucu oluşmuş oksidatif strese maruz kalmış proteinler vardır. Bunlar bizim sistemimizde tam olarak tanımlanamamaktadır. Bunun için ICAT stres proteomik yöntemi kullanılıp, oksidatif stres altında regüle olan proteinlerin tanımlaması yapılabilir. Hücre içindeki değişimlerin iletiminde en çok bilinen modifikasyonlardan biri de fosforlanmadır. Sinyal iletim yollarının araştırılabilmesi için fosfoproteomik tekniği kullanılabilir ve IPA analizinde birbirleriyle etkileşim halinde olan proteinler ve iletişim mekanizması daha iyi anlaşılabilir. Bir başka modifikasyon olan nitrozilasyona uğramış proteinlerin de nörodejeneratif mekanizmalarla bağlantıları vardır. Bunlar Biotin-Switch yöntemiyle belirlenebilir.

Nörodejeneratif hastalıklarda ortak görülen semptomlardan birtanesi, bahsettiğimiz üzere proteinlerin kümelenerek hücre içi ya da dışına yerleşmeleri idi. Buna neden olan mekanizmalardan biri de protein katlanmalarıyla alakalı olan mekanizmalardır. Katlanmadan sorumlu ubiquitin mekanizması, terapötik umutlar vadeden mekanizmalardan biridir. Proteinlerin agregatlaşması konusunda çalışmalar yapabilmek için ubiquitin analizleri uygulanabilir.

Metabolom ve proteom verileri birleştirilerek daha kapsamlı mekanistik analizler yapılabilir. Yine IPA yazılımıyla elde edilen yollar daha derinlemesine çalışılabilir. Tabii proteomik yöntemin en temel tekniklerinden biri olan Western Blot tekniği ile idda edilen protein ifade farklılıkları onaylanabilir.

Spesifik olarak çok önemli görülen proteinler olursa, bu proteinlerin siRNA gen knockdown hücre modelleriyle hücredeki rolü araştırılabilir.

Her ne kadar *in-vitro* çalışmalar ile şimdiye kadar önemli sonuçlar elde edilmiş olsa da bu çalışma ve evvelinde bahsedilen yapılabilecek çalışmalar *in-vivo* modellerde çalışılarak daha ileri taşınabilir.

## KAYNAKLAR

- Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, Wood NW. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosciences*:7 207-219.
- Allani, P.K.; Sum, T.; Bhansali, S. G.; Mukherjee, S. K.; Sonee, M. A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, 196, 1.
- Alston, T. A., Mela, L., and Bright, H. J. (1977) Inhibition of succinate dehydrogenase by nitroacetate and by the toxic antibiotic nitraminoacetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3767–3771
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 161(1):41–54
- Anandatheerthavarada HK, Devi L (2007) Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 13(6):626–638
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H (2004) Aβ Directly Links Aβ to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease *Science* 304 (5669):448–452
- Aylward E.H., B.F. Sparks, K.M. Field, V. Yallapragada, B.D. Shpritz, A. Rosenblatt, J. Brandt, L.M. Gourley, K. Liang, H. Zhou, R.L. Margolis, C.A. Ross. (2004) Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63 66–72.
- Bamburg JR. *Rec. Cell. Dev. Biol.* (1999) 15: 185.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R., and Hyman, B. T. (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionyl asit. *J. Neurosci.* 13, 4181–4192
- Bell, G.A.; Morgan, I. G. The effects of colchicine and vinblastine on memory in chicks. *Behav. Brain Res.*, 1981, 2, 301.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552–1555.
- Bennett, M. C., Diamond, D.M., Stryker, S.L., Parks, J.K., Parker, W.D. (1992) Cytochrome Oxidase Inhibition: A Novel Animal Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Geriatr Psychiatry Neurology.* vol. 5 no. 2 93-101
- Bennett, M. C., Mlady, G. W., Kwon, Y.-H. and Rose, G. M. (1996), Chronic In Vivo Sodium Azide Infusion Induces Selective and Stable Inhibition of Cytochrome c Oxidase. *Journal of Neurochemistry*, 66: 2606–2611.
- Bensimon, G.; Chermat, R. *Pharmacol. Microtubule disruption and cognitive defects: Effect of colchicine on learning behavior in rats.* *Biochem. Behav.*, 1991, 38, 141.
- Bereiter-Hahn J and Vöth M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27: 198-219.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (November 1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33 (11): 2643–52.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones". *Cancer Res.* 38 (11 Pt 1): 3751–7.
- Birbach A (2008) Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *Bioessays* 30, 994–1002.

- Blass, J.P., Brown, A.M., (2000). Lower activity of Krebs cycle enzymes than electron transport in human brain: disease implications. *Neurobiol. Aging* 21, 81.
- Bonifati V., Rizzu P., J. van Baren M., Schaap O, Breedveld GJ., Krieger E., Dekker MCJ., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen JW., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M.,
- Oostra B.A, and Heutink P. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256–259
- Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., and Sanberg, P. R. (1997) 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 289–293
- Bossy-Wetzel E, Borsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R ve Lipton SA. (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15: 706-716.
- Bossy-Wetzel E, Petrelli A and Knott AB. (2008) Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 31: 609-616
- Brandt, R.; Lee, G. (1994) Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 28, 143.
- Brooks WM, Lynch PJ, Ingle CC, Hatton A, Emson PC, Faull RL, Starkey MP. (2007) Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1127:127–35.
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., and Beal, M. F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41, 646–653
- Bubber P., Haroutunian V., Fisch G., Blass JP., Gibson G.E. (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications. *Annals of Neurology* 57 :695-703
- Butterfield D.A., Sarita S. Hardas, Miranda L., Lange B. (2010) Oxidatively Modified Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's Disease: Many Pathways to Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 20 369-393.
- Calne, D.B.; Eisen, A. The relationship between Alzheimer's disease, Parkinson's disease and motor neuron disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, 1989, 16, 547.
- Candelario-Jalil E., Al-Dalain S. M., Castillo R., Martinez G. And Fernandez O. S. (2001) Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions. *J. Appl. Toxicol.* 21, 403–407.
- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* 80(1):91–100
- Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppasamy P, Zewier ZL, Reddy PH, Beal MF (2008) *Trends Mol Med* 14(2):45–53
- Castellani, R., Hirai, K., Aliev, G., Drew, K.L., Nunomura, A., Takeda, A., Cash, A.D., Obrenovich, M.E., Perry, G., Smith, M.A. (2002). Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70, 357– 360.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6:919–30.
- Chandrasekaran K., Giordano T., Brady D.R., Stoll J., Martin L.J., Rapoport S.I. (1994). Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease. *Molecular Brain Research* 24 (1994) 336-340

- Chen H and Chan DC. (2009) Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18: R169-176
- Chuang D.M., Hough C., Senatorov V.V. (2005) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 269–290.
- Choua JL.,1, Shenoya DV., Thomasa N., Choudharyb PK., LaFerlac FM., Goodmana SR., Breena GAM. (2011) Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a Mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Proteomics* 74: 466-479
- Cid-Arregui A, De Hoop M., Dotti, C.G. Mechanisms of neuronal polarity. *Neurobiol. Aging.*, 1995, 16, 239.
- Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M. & Lansbury, P. T. Jr. (2001) Kinetic stabilization of the  $\alpha$ -synuclein protofibril by a dopamine- $\alpha$ -synuclein adduct. *Science* 294, 1346–1349
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC. (1993) Gene dose of apolipoprotein-E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921–23
- Cras P, Martin JJ, Gheuens J.  $\alpha$ -enolase and Glial fibrillary acidic protein in nervous system tumors. *Acta Neuropathol* 1988;75:377-384.
- Dauer W and Przedborski S: Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* (2003) 39: 889-909.
- Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2006) Mitochondrial Import and Accumulation of  $\alpha$ -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease *Brain J Neurosci* 26(35):9057–9068
- Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med* 14(10):1097–1105
- Dodson MW and Guo M. (2007) Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 17: 331-337
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58:39–46. doi: 10.1016/j.biopha.2003.11.004
- Estabrook RW. (1957) Kinetic Properties of a Reduced Diphosphopyridine Nucleotide Cytochrome "c" Reductase from Heart Muscle. *Biol. Chem.* 227: 1093.
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR. (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262:2551–56
- Extner N, Treske B, Paquet D Holmstrom K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Krüger R, Winklhofer KF, Vogel F, Reichert AS, Auburger G, Kahle PJ, Schmid B and Haass C. (2007) Loss-of-function of human PINK1 result in mitochondrial pathology an can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27: 12413-12418
- Feany MB, Mattiace LA, Dickson DW. (1996) Neuropathologic Overlap of Progressive Supranuclear Palsy, Pick's Disease and Corticobasal Degeneration. 55: 1
- Fischer G, Bang H, Mech C. (1984) Determination of enzymatic catalysis for the cis–trans-isomerization of peptide bonds in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta*, 43: 1101-1111.
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B. M. & Chinopoulos, C. (2003) Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 991, 111–119
- Forooghian, F., Adamus, G., Sproule, M., Westall, C., and O'Connor, P. (2007). Enolase autoantibodies and retinal function in multiple sclerosis patients. *Graefes Arch Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 1077-1084.

- Friedrich, P. Protein structure: The primary substrate for memory *Neurosci.*, 1990, 35, 1.
- Galante YM, Wong SY and Hatefi Y. (1979) Composition of complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol. Chem.* 254: 12372-12378.
- Gallo, G.; Yee, H.F.; Letourneau, P.C. Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility *J. Cell. Biol.*, 2002, 158, 1219.
- Galloway, P.G.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Perry, G. J. Lewy bodies contain epitopes both shared and distinct from Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neuropathol.*, 1988, 47, 654.
- Gibson, G.E., Sheu, K.F., Blass, J.P. (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J. Neural Transm.* 105, 855–870.
- Gibson GE, Zhang H, Sheu KF, Bogdanovich N, Lindsay JG, Lannfelt L, Vestling M, Cowburn RF (1998)  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation. *Ann Neurol* 44(4):676–681
- Glennner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120 (3):885–890
- Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704–6
- Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, Squitieri F. (1993) Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat Genet*;5:174–9.
- Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH (2005) Intraneuronal A $\beta$  accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26 (9):1235–1244
- Green DE and Hatefi Y. (1961) The Mitochondrion and Biochemical Machines. *Science*, 133, 13.
- Haian Fu, Romesh R. Subramanian and Shane C. Masters. (2000). 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 40: 617-647
- Hardemark HG, Persson L, Bolander HG, Hillered L, Olsson Y, Pahlman S. Neuron-specific enolase is a marker of cerebral ischemia and infarct size in rat cerebrospinal fluid. *Stroke* 1988;19:1140-1144.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis *Science* 256(5054):184–185
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353–356
- Hatefi Y, Haavik A and Griffiths DE. (1962) Studies on the Electron Transport System XXXII. Reduction of Coenzyme Q by DPNH. *J.Biol. Chem.* 237: 1681.
- Hattori F, Murayama N, Noshita T. and Oikawa S. (2003) Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry from excitotoxic injury in vivo.* 86, 860–868
- He, M., Rutledge, S.L., Kelly, D.R., Palmer, C.A., Murdoch, G., Majumder, N., Nicholls, R.D., Pei, Z., Watkins, P.A., and Vockley, J. (2007). A new genetic disorder in mitochondrial fatty acid beta-oxidation: ACAD9 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 87–103.
- Hersch SM, Rosas HD. (2008) Neuroprotection for Huntington's disease: ready, set, slow. *Neurotherapeutics*;5:226–36.

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 21(9):3017-23.

Huang Li-shar, Gang Sun, David Cobessi, Andy C. Wang, John T. Shen, Eric Y. Tung, Vernon E. Anderson, and Edward A. (2006) 3-Nitropropionic Acid Is a Suicide Inhibitor of Mitochondrial Respiration That, upon Oxidation by Complex II, Forms a Covalent Adduct with a Catalytic Base Arginine in the Active Site of the Enzyme. *The Journal Of Biological Chemistry* 281, No. 9, pp. 5965–5972

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. *Genes Immun*;6:279–84.

Inoka S, Balasooriya and K. Wimalasena. (2007) Are SH-SY57 and MN9D cell lines truly dopaminergic? *The FASEB Journal*. 21:912.9

Jitawi SA, Co&ran AJ, Cancilla PA, Wen D. The expression of S-100 protein and neuron specific enolase in meningiomas. *Disease Markers* 1988;6:109-117.

Ito S, Ohta S, Nishimaki K, Kagawa Y, Soma R, Kuno SY, Komatsuzaki Y, Mizusawa H, Hayashi JI. (1999) Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease. *PNAS*: 96 2099-2103.

Kaneko K, Hachiya N.S., (2006) The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions, *Med. Hypotheses* 67 169–171.

Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. (1994) *The Lancett* 344 796-798

Kasap M, Akpınar G. (2011) Proteomics Approaches to Parkinson's Disease and Search for Potential Biomarkers: Review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2011;31(3): 691-701

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608

Kopito RR, Ron D (2000) Conformational disease. *Nat Cell Biol* 2:E207–E209.

Korolainen MA, Goldstein G, Nyman TA, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttila T. (2006) Oxidativemodification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 27:42–53.

Korolainen M. A. and Pirttila T. (2009) Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 119, 32–38.

Kremer,B., Goldberg,Y.P., Andrew,S.E., Theilmann,J., Telenius,H., Zeisler,J., Squitieri,F., Lin,B., Bassett,A., Almqvist,E., Bird,T.D. and Hayden,M.R. (1994) A worldwidedstudy of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med*;330:1401–6.

Kurosinski P, Guggisberg M and Götz J. (2002) Alzheimer's and Parkinson's disease – overlapping or synergistic pathologies? *Trends in Molecular Medicine*. 8: 1. 3-5.

Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. & Irwin, I. (1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979–980

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D M, Oshima J, Pettingell W H, Yu C-e, Jondro P D, Schmidt S D, Wang K, Crowley A C, Fu Y-H, Guenette S Y, Galas D, Nemens E, Wijsman E M, Bird T D, Schellenberg G D, Tanzi R E. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973–977

Lev N., Roncevic D, Ickowicz D, Melamed E, Offen D. Role of DJ-1 in Parkinson disease. (2006) *J. Mol. Neuroscience*. 29(3):215-225.

- Lin, M. T., Simon, D. K., Ahn, C. H., Kim, L. M. & Beal, M. F. (2002) High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* 11, 133–145
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795.
- Lipton SA (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5:160–170.
- Lovell M.A, Xiong S., Markesbery W.R. And Lynn B.C. (2004) Quantitative Proteomic Analysis of Mitochondria from Primary Neuron Cultures Treated with Amyloid Beta Peptide. *Neurochemical Research* 30: 113-122
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304 (5669):448–452
- Manetto, V.; Perry, G.; Tabaton, M.; Mulvihill, P.; Fried, V. A.; Smith, H. T.; Gambetti, P.; utilio Gambetti, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 4501.
- Manfredi G, Beal MF (2000) The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases *Brain Pathol* 10(3):462–472
- Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD and Schapira AH. (1999) Complex 1, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol* 46: 598-605.
- Mannervik, B., Ålin, P., Guthenberg, C., Jansson H, Tahir MK, Warholm M., Jörnvall H. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 7202-7206
- Markesbery WR. 1998. Pick's disease. See Ref. 113a, 7:142–57
- Masaki M., Ikeda A., Shiraki E., Oka S., Kawasaki T. *Eur. J. Biochem.* 270: 76-83 (2003) . Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease *Nature* 430(7000):631–639
- Matus. A. *Trends.* (1988) Neurofilament protein phosphorylation--where, when and why. *Neurosci*, 11, 291-292.
- Matus, A. J. Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis. *Cell. Sci. Suppl.*, 1991, 15, 61-67.
- Maurer I., Zierz S., Möller H.J. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. (2000) *Neurobiology of Aging*. 21; Issue 3; 455-462
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, et al. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939–44
- Meister A, Anderson M, Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983. 711–760.
- Merrick WC, Nyborg J. (2000) The protein biosynthesis elongation cycle In *Translational Control of Gene Expression*, Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB (eds) Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 89–126.
- Mickey, B.; Howard, J. J. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein *Cell. Biol.*, 1995, 130, 909.



- Milakovic T, Johnson GV. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem.* 2005;280(35):30773–30782.
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K.A., Foster, N.L., Kuhl, D.E. (1997). Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 42, 85– 94.
- Mitsui K, Nakayama H, Akagi T, Nekooki M, Ohtawa K, Takio K, Hashikawa T and Nukina N. (2002) Purification of Polyglutamine Aggregates and Identification of Elongation Factor-1 and Heat Shock Protein 84 as Aggregate- Interacting Proteins. *The Journal of Neuroscience*, 22(21):9267–9277
- Murphy, N. P., Vaughan, P. F. T., Ball, S. G. and McCormack, J. G. (1991) The Cholinergic Regulation of Intracellular Calcium in the Human Neuroblastoma, SH-SY5Y. *Journal of Neurochemistry*, 57: 2116–2123.
- Nakajima T, Kato K, Tsumuraya M, Kodama T, Shimosato Y, Kameya T. The levels of three enolase subunits in human tumors: a low  $\alpha$ - $\gamma$ -subunit ratio as indicator of tumors of neuronal and neuroendocrine tumors. *Neurochem Int* 1985;7:615-619.
- Nakamura T, Lipton SA (2009) Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases *Apoptosis* 14:455–468
- Nava and Yael. Cytoplasmic malate dehydrogenase (mdh1) targeted treatment for neurodegenerative diseases. (2008) United States Patent Application 20100279943
- Neumann C.A, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson TR, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA. (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424 (6948): 561–5.
- Nicklas, W. J., Vyas, I. & Heikkila, R. E. (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36, 2503–2508
- Ning MM., Sarracino DA., Kho AT., Guo S., Lee SR., Krastins B., Buonanno FS., Vizcaíno J.A., Orchard S., McMullin D., Wang X. and Lo E.H.. (2011) Proteomic Temporal Profile of Human Brain Endothelium After Oxidative Stroke;42:37-43
- Nouws J., Nijtmans L., Houten SM., Brand M., Huynen M., Venselaar H., Hoefs S., Gloerich J., Kronik J., Hutchin T., Willems P., Rodenburg E., Wanders R., Heuvel L., Smeitink J. And Vodel OR. *Cell metabolism* 12, 283-294.
- Nukina N, Ihara Y (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau proteins. *J Biochem* 99(5):1541–1544
- Olshansky SJ, Carnes BA, Cassel CK. (1993) The aging of the human species. *Sci. Am.* 268:46–52
- Osborn M, Kaser TDH, Weber K, Altmannsberger M. Immunohistochemical localization of neurofilaments and neuron-specific enolase in 29 cases of neuroblastoma. *AJP* 1986;122:433-442.
- Patrick M. Abou-Sleiman, Miratul M. K. Muqit and Nicholas W. Wood. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews, Neuroscience* Vol7, 207-208
- Pellier-Monnin, V.; Astic, L.; Bichet, S.; Riederer, B.M.; Grenningloh, G. J. Expression of SCG10 and stathmin proteins in the rat olfactory system during development and axonal regeneration *Comp. Neurol.*, 2001, 433, 239-254.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Gibson, P.H., (1980). Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic decompartment of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci. Lett.* 18, 105– 110.

- Pleasure SJ. (2010) Therapeutic Progress in Neurodegenerative Disease: Neurodegenerative Disease Therapy: What the Future Holds. Medscape Neurology & Neurosurgery
- Pollak, D.; Cairns, N.; Lubec, G. J. Cytoskeleton derangement in brain of patients with Down Syndrome, Alzheimer's disease and Pick's disease. *Neural Transm.Suppl.*, 2003, 67, 149.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047
- Poon H.F., Radhika A. Vaishnav, Thomas V. Getchell, Marilyn L. Getchell, Butterfield D.A., (2006) Quantitative proteomics analysis of differential protein expression and oxidative modification of specific proteins in the brains of old mice. *Neurobiology of Aging* 27 1010–1019
- Poon H.F., Shepherd, H.M., Reeda T.T., Calabrese V., Stella A.M.G., Pennisi G., Cai J., Pierce W.M., Klein J.B., Butterfield D.A. (2006) Proteomics analysis provides insight into caloric restriction mediated oxidation and expression of brain proteins associated with age-related impaired cellular processes: Mitochondrial dysfunction, glutamate dysregulation and impaired protein synthesis. *Neurobiology of Aging* 27 1020–1034
- Poon LH, Kang GA, Lee AJ. (2010) Role of tetrabenazine for Huntington's disease-associated chorea. *Ann Pharmacother* ; 44:1080–9.
- Reddy PH, Beal MF (2005) Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 49(3):618–632
- Reddy PH, Beal MF Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. (2008) *Trends Mol Med* 14(2):45–53
- Reed TT., Pierce WM., Markesbery WR., Butterfield DA. (2009) Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brainresearch*1274 66-76
- Reinsch, S.S.; Mitchison, T.J.; Kirschner, M.W. J. Microtubule polymer assembly and transport during axonal elongation. *Cell. Biol.*, 1991, 15, 365.
- Rhee S, Chae H, Kim K (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38 (12): 1543–52.
- Rieske JS and Zaugg WS. (1962). The inhibition by antimycin A of the cleavage of one of the complexes of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8: 421.
- Rieske JS, Lipton SH, Baum H and Silman HI. (1967) Factors affecting the binding of antimycin a to complex II of the mitochondrial Respiratory chain. *The Journal of Biological Chemistry.* 242: (21), 4888-4896.
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71: 741-7.
- Ross JM., Öberg J., Brene S., Coppotelli G., Terzioğlu M., Pernold K., Gojny M., Sitnikov R., Kehr J., Trifunovic A., Larsson NG., Hoffer BJ. (2010). High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *PNAS* vol. 107 no. 46 20087-20092
- Saiz A., Graus F., Dalmau J., Pifarre A., Marin C., Tolosa E. (1999). Detection of 14-3-3 brain protein I the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Ann. Neurol.* 46 774-777.
- Schmechel DE, Marangos PJ, Martin BM, Winfield S, Burkhart DS, Roses AD, et al. Localization of neuron-specific enolase (NSE) mRNA in human brain. *NeurosciLett* 1987;76: 233–8.

- Schofield P, Mayeux R. (1998). Alzheimer's disease: clinical features, diagnosis and epidemiology. See Ref. 113a, 4: 89–105
- Schulze H., Schuler A., Stùeber D., DoÈbeli H., Langen H. and Huber G. (1993) Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's b-amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 60, 1915±1922.
- Selkoe DJ. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81(2):741–766
- Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M., Seo B.B., Richardson J.R., Kim J.H., Miller G.W., Yagi T. , Matsuno-Yagi A. and Greenamyre J.T. (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 23, 10756–10764.
- Shi M, Bradner J, Bammler TK, Eaton DL, Zhang JP, Ye ZC, Wilson AM, Montine TJ, Pan C and Zhang J. (2009) Identification of Glutathion S-transferase Pi as a Protein involved in Parkinson Disease. *The American Journal of Pathology*, 175: 1
- Shiozaki A., Tsuji T., Kohno R. et al. (2004) Proteome analysis of brain proteins in Alzheimer's disease: subproteomics following sequentially extracted protein preparation. *J. Alzheimers Dis.* 6, 257–268.
- Sobel, A. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem. Sci.*, 1991, 16, 301.
- Sorbi S, Bird ED, Blass JP. Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain (1983) *Ann Neurol* 13(1):72–78
- Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J , Cabiscol E. (2008) Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 28; 388(6645):839-40.
- Steinberg R, Scarna H, Keller A, Pujol JF. Release of neuron specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid following experimental lesions of the rat brain. *Neurochem Int* 1983;5:145-151.
- Thomas J. (2011) Montine Prevalence Estimates for Latent Neurodegenerative Disease. *Toxicol Pathol* January. 39: 1 99-102.
- Trifaró, J.M.; Vitale, M.L. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release . *TINS.*, 1993, 16, 466.
- Tsuchiya K., Tajima H., Kuwae T., Takeshima T., Nakano T., Tanaka M., Sunaga K., Fukuhara Y., Nakashima K., Ohama E., Mochizuki H., Mizuno Y., Katsube N., Ishitani R. (2005) Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions, *Eur. J. Neurosci.* 21 317–326.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304 (5674):1158-60.
- Ubl A., Berg D., Holzmann C., Kruger R., Berger K., Arzberger T., Bornemann A., Riess O. (2002). 14-3-3 protein is a component of Lewy bodies in Parkinson's disease—Mutation analysis and association studies of 14-3-3 eta. *Molecular Brain Research* 108 33–39
- Vander Borght, T., Minoshima, S., Giordani, B., Foster, N.L., Frey, K.A., Berent, S., Albin, R.L., Koeppe, R.A., Kuhl, D.E., (1997). Cerebral metabolic differences in Parkinson's and Alzheimer's diseases matched for dementia severity. *J. Nucl. Med.* 38, 797– 802.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T,

- Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440):735–74
- Wanjek, Christopher (2002). *Bad Medicine: Misconceptions and Misuses Revealed, from Distance Healing to Vitamin O*. Wiley. pp. 70–71.
- Witte ME, Geurts JJG, Vries HE, Valk PVD, Horssen JV. (2010) Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion*:10 411–418.
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G, Stanyer L, Hargreaves I, Klupsch K, Deas E, Downward J, Mansfield L, Jat P, Taylor J, Heales S, Duchen MR, Latchman D, Tabrizi SJ and Wood NW. (2008) PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PloS One* 3: e2455.
- Xiao-Jian Han, Kazuhito Tomizawa, Atsushi Fujimura, Iori Ohmori, Tei-ichi Nishiki, Masayuki Matsushita and Hideki Matsui: Regulation of Mitochondrial Dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta Medica Okayama* Vol.65, No. 1, pp. 1-10.
- XIE Hong-rong, HU Lin-sen, LI Guo-yi. (2011) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 2010, Vol. 123 No. 8:1086-1092
- Xing H., Zhang S., Weinheimer C., Kovacs A., Muslin A.J., (2000). 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *Embo J.* 19: 349-358
- Zerr I., Bodemer M., Gefeller O., Otto M., Poser S., Wiltfang J., Windl O., Kretschmar H.A., Weber T., (1998) Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease, *Ann. Neurol.* 43 32–40.
- Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider SA. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. *Cancer* 1986;57:1230-1234.
- Zhang, J., Zhang, W., Zou, D., Chen, G., Wan, T., Zhang, M., and Cao, X. (2002). Cloning and functional characterization of ACAD-9, a novel member of human acyl-CoA dehydrogenase family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 1033–1042.
- Zhang K, Kaufman RJ (2006) The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66:S102–S109.
- Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao *Acta Academiae Medicinae Sinicae* (2000). Effect of sodium azide on mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y human neuroblastoma cells Volume: 22, Issue: 5, Pages: 436-439

## 5. ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Betül Baykal
- Doğum yeri ve tarihi: İstanbul, 13.09.1987
- Uyuşu: T.C.
- Medeni Durumu: Bekar
- İletişim Adresi ve Telefonu: Bağcılar Yolu. Ahmet Haşim Cad. No:9/4 Bahçelievler, İstanbul. Gsm: 05062175919

### 2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

- Fikret Yüzatlı İlköğretim Okulu (1993-2001)
- Dede Korkut Anadolu Lisesi (2001-2005)
- Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2005-2009)
- Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Bölümü (Yüksek Lisans) (2009-2011)
- Yabancı Dili: İngilizce

### 2. Bilimsel Etkinlikler

- Poster Sunumu, 'Differential protein expression analysis of SH-SY5Y cell models to elucidate neurodegenerative mechanisms'. 10. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İstanbul Üniversitesi (9-12 Nisan, 2011).
- Sözlü Sunum, 'Differential protein expression analysis of SH-SY5Y cell models to elucidate neurodegenerative mechanisms'. 4. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi, Yeditepe Üniversitesi (27-30 Haziran, 2011).
- Kısa dönem eğitim bursu (1 Eylül-1 Aralık, 2011) International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology, Protein Networks Laboratory, Trieste-İtalya
- Doktora eğitimi bursu (2011-2014) International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology, Protein Networks Laboratory, Trieste-İtalya