

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SH-SY5Y HÜCRE HATTINDA SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 VE LRRK2 GEN  
ÜRÜNLERİNİN NÖROJENİK FARKLILAŞMA SIRASINDA  
TRANKRİPSİYONEL VE TRANSLASYONEL DÜZEYDE GÖSTERDİKLERİ  
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Eylül Ece İŞLEK CAMADAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI / DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2020



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SH-SY5Y HÜCRE HATTINDA SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 VE LRRK2 GEN  
ÜRÜNLERİNİN NÖROJENİK FARKLILAŞMA SIRASINDA  
TRANKRİPSİYONEL VE TRANSLASYONEL DÜZEYDE GÖSTERDİKLERİ  
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

Eylül Ece İŞLEK CAMADAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI / DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2018/093)  
ve TUBİTAK Hızlı Destek Programı (Proje No: 118S806) Tarafından Desteklenmiştir.

KOCAELİ

2020

## ÖZET

SH-SY5Y Hücre Hattında SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 ve LRRK2 Gen Ürünlerinin Nörojenik Farklılaşma Sırasında Transkripsiyonel ve Translasyonel Düzeyde Gösterdikleri Değişimlerin İncelenmesi

**Amaç:** Bu tez çalışmasının amacı nörojenik farklılaşmaya tabi tutulmuş SH-SY5Y hücrelerinde SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 ve LRRK2 genlerinin ifade seviyelerindeki değişiklikleri farklılaşma süreci boyunca mRNA ve protein düzeyinde takip etmektir. Bu amaçla, literatürde yayınlanmış olan bilgiler doğrultusunda kısa fakat oldukça etkili bir nörojenik farklılaşma protokolü geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Ayrıca, global bir bakış açısı ile protein düzeyinde meydana gelen değişiklikleri izlemek için 2-D jel elektroforezi ve nLC-MS/MS proteom analizleri yapıldı. Genel olarak, bu tez çalışmasında, farklılaşan SH-SY5Y hücrelerinin Parkinson hastalığı (PH) ile ilişkili çalışmalar için model olarak kullanılmasının etkinliğini anlamayı ve PH ile ilişkili olarak seçilen bazı genlerin mRNA ve protein seviyelerinde meydana gelen değişiklikler hakkında ayrıntılı bilgi sağlamayı amaçladık.

**Yöntem:** Nispeten kısa ancak etkili bir nöronal farklılaşma protokolü geliştirilmiş ve SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmak için kullanılmıştır. Nöronal farklılaşmanın başarısı, İmmünofloresan mikroskopisi (IF) yöntemi kullanılarak seçilen bazı nöron markörlerindeki (Nestin, Nurr1, NeuroD1, NeuN ve TH) artışların gösterilmesiyle doğrulanmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında nöronal farklılaşma markörlerinin (Nestin, Nurr1, NeuroD1, NeuN), dopaminerjik nöron markörlerinin (TH, DAT, DRD1 ve DRD2) ve PH ile ilişkili genlerin (SNCA, PARK2, DJ1, LRRK2 ve PINK1) ekspresyon seviyeleri mRNA (qRT-PCR) ve protein (WB) düzeylerinde izlendi. Farklılaşma sırasında meydana gelen proteom farklılıklarına küresel bir bakış açısı sağlamak için 2-D jel elektroforezi ve nLC-MS/MS çalışmaları da gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Nörojenik farklılaşma sürecinde hücreler nöron benzeri yapılar oluşturdu, akson ve dendrit benzeri uzantılar geliştirdi. IF mikroskopisi ile gösterildiği gibi farklılaşma işleminin başlangıcı ve sonu sırasında alınan numuneler arasında karşılaştırma yapıldığında,

NeuN, Nurr1 ve TH markörlerinin ekspresyon seviyelerinde artışlar gözlemlenmiştir. Farklılaşma sürecinde nörojenik farklılaşma ve dopaminerjik nöron markörlerinin (Nestin, Nurr1, NeuroD1, NeuN, TH, DAT, DDC, DRD1 ve DRD2) ve PH ile ilgili genlerin (SNCA, PARK2, DJ1, LRRK2, VPS35 ve PINK1) ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler de WB deneyleri ile belirlendi. Sonuçlar SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik nöron benzeri hücrelere farklılaştığını imâ etti. Ek olarak, nörojenik farklılaşma sürecini proteom düzeyinde takip edebilmek için yapılan 2-D jel elektroforez bazlı proteom analizi örnekler arası regülasyona uğrayan 13 adet proteininin varlığını gösterdi. nLC-MS/MS bazlı proteom analizi yapıldığında, MAP2 proteini sadece farklılaşmış hücrelerde tespit edildi. Farklı şekilde düzenlenmiş olan proteinlerin biyoinformatik analizleri enerji metabolizmasındaki ve katekolaminerjik yolaktaki değişikliklere işaret etti.

Sonuç: Nörojenik farklılaşmaya maruz kalan SH-SY5Y hücreleri dopaminerjik nöron benzeri bir fenotipe farklılaşmıştır. Bu nedenle, bu hücreler *in vitro* PH ile ilişkili çalışmalarda kolaylıkla model olarak kullanılabilirler.

Anahtar Kelimeler: SH-SY5Y hücreleri, Nörojenik farklılaşma, SNCA, PARK2, DJ-1, LRRK2, PINK1, 2-DE, nLC-MS/MS ve Proteomik.

## ABSTRACT

Investigation of the Changes Occurring at Transcriptional and Translational Levels in SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 and LRRK2 Gene Products during Neuronal Differentiation of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line

**Objective:** The aim of this thesis study was to investigate the changes at the expression levels of SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 and LRRK2 genes at both mRNA and protein levels during neurogenic differentiation of SH-SY5Y cells. For this purpose, a short yet highly effective neurogenic differentiation protocol was developed and optimized using the published information available in the literature. In addition, 2-D gel electrophoresis and nLC-MS/MS proteome analysis were performed to monitor the changes taking place at the protein level on a global scale. In overall, in this thesis study, we aimed at understanding the efficacy of using differentiated SH-SY5Y cells as a model for Parkinson's disease (PD)- associated studies and provide detailed information as to the changes occurring at the mRNA and protein levels of some of the selected PD-associated genes.

**Method:** A relatively short but efficient neuronal differentiation protocol was developed and used to differentiate SH-SY5Y cells. The success of neuronal differentiation was verified by demonstrating the increases in some selected neuronal markers (Nestin, Nurr1, NeuroD1, NeuN and TH) using immunofluorescence microscopy (IF). The expression levels of neuronal differentiation markers (Nestin, Nurr1, NeuroD1, NeuN), dopaminergic neuron markers (TH, DAT, DRD1 and DRD2) and PD related genes (SNCA, PARK2, DJ1, LRRK2 and PINK1) were monitored at the mRNA (qRT-PCR) and protein (WB) levels at determined time intervals. The 2-D gel electrophoresis and nLC-MS/MS studies were also carried out to provide a global perspective to the proteome differences occurring during the differentiation.

**Results:** During neurogenic differentiation process, the cells formed neuron like structures and developed axon and dendrite like extensions. As demonstrated by IF microscopy, there were increases in the expression levels of NeuN, Nurr1 and TH when comparisons were made between the samples taken during the onset and end of the differentiation process. During the differentiation process, changes in the expression levels of neurogenic

differentiation and dopaminergic neuron markers (Nestin, Nurr1, NeuroD1, NeuN, TH, DAT, DDC, DRD1 and DRD2) and PD related genes (SNCA, PARK2, DJ1, LRRK2, VPS35 and PINK1) were also determined by WB experiments. The results implicated that SH-SY5Y cells differentiated into dopaminergic neuron like cells. In addition, monitoring of the changes during neurogenic differentiation process at the proteome level indicated the presence of 13 differentially regulated proteins when 2-D gel electrophoresis-based proteome analysis was performed. When nLC-MS/MS based proteome analysis was performed, MAP2 unique proteins were detected only in the differentiated cells. Bioinformatics analysis of the differentially regulated proteins pointed to the changes in energy metabolism and catecholaminergic pathway.

Conclusions: SH-SY5Y cells subjected to neurogenic differentiation have differentiated into a dopaminergic neuron like phenotype. Therefore, these cells can be readily used as a model for *in vitro* PD-associated studies.

Keywords: SH-SY5Y cells, Neurogenic differentiation, SNCA, PARK2, DJ-1, LRRK2, PINK1, 2-DE, nLC-MS/MS and Proteomics.

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilimsel ve sosyal hayattaki tecrübelerinden yararlandığım, ihtiyaç duyduğum her alanda sonsuz desteğini gördüğüm ve birçok konuda kendisini örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a çalışmanın planlanmasından sunulmasına kadar geçen süreçteki yol göstericiliği, motive edici yaklaşımı ve sonsuz desteği için teşekkür ederim.

Doktora eğitim hayatım boyunca tecrübelerini benimle paylaşan ve fikirleriyle bana yol gösteren Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a teşekkür ederim. Tez İzleme Komitesi'ndeki değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI ve Doç. Dr. Gökhan DURUKSU'ya çalışmaya olan desteklerinden ötürü teşekkürü borç bilirim. Tez jürimdeki değerli hocalarım Prof. Dr. Gönül KANIGÜR ve Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e destekleri için şükranlarımı sunarım.

Sevgili mesai arkadaşlarım Mehin ZÜLFİGAROVA, Kübra KARAOSMANOĞLU YÖNETEN, Abula AYIMUGU ve Mehmet SARIHAN'a dostlukları, sonsuz ve paha biçilmez destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca, Proteomiks laboratuvar üyesi arkadaşlarım Merve Gülsen BAL ALBAYRAK ve Sevinç YANAR'a da tüm destekleri için minnettarım.

Şu an aramızda olmayan ancak yol göstericiliği ve bütün çocuklarına aşıladığı iyimser yaklaşımları ile hep yanımda olduğunu hissettiğim canım dedem Ali Kemal KÖROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Gösterdikleri insanüstü fedakârlık ve hoşgörü ile bugünlere gelmemi sağlayan, koşulsuz desteklerini hep arkamda hissettiğim, motivasyon kaynaklarım sevgili annem Yeşim İŞLEK, sevgili babam Hakan İŞLEK ve sevgili anneannem Necla KÖROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca, her an desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Abdullah Yunus CAMADAN'a zorlu doktora eğitim hayatım boyunca gösterdiği sınırsız anlayış, destek ve sevgi için teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde sağladıkları maddi destekleri için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No:2018/093) ve TÜBİTAK Hızlı Destek Programı'na (Proje No: 118S806) ayrıca teşekkür ederim.



## ORIJİNALLIK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı / Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'SH-SY5Y Hücre Hattında SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 ve LRRK2 Gen Ürünlerinin Nörojenik Farklılaşma Sırasında Transkripsiyonel ve Translasyonel Düzeyde Gösterdikleri Değişimlerin İncelenmesi' başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir / hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... / ..... / 20....

Eylül Ece İŞLEK CAMADAN

İmza

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER .....	xv
TABLolar .....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar .....	1
1.2. İnsan Nörodejeneratif Hastalıklarını Çalışmak için Kullanılan Hayvan Modelleri 2	
1.2.1. Nörotoksinler Aracılığı ile Oluşturulan Hayvan Modelleri .....	2
1.2.2. Transgenik Hayvan Modelleri.....	4
1.3. Alzheimer Hastalığı Hayvan Modelleri .....	4
1.4. Amyotrofik Lateral Skleroz Hayvan Modelleri .....	5
1.5. Frontotemporal Demans Hayvan Modelleri.....	6
1.6. Huntington Hastalığı Hayvan Modelleri .....	6
1.7. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri .....	7
1.8. Nörodejeneratif Hastalıklarda Kullanılan Hücre Modelleri .....	12
1.8.1. İnsan Kökenli Nöroblastoma Hücre Hattı, SH-SY5Y .....	16
1.9. SH-SY5Y Hücre Hattında Nöronal Farklılaştırma Protokollerinde Kullanılan Ajanlar .....	18
1.10. Nöronal Markörler .....	26
1.11. Farklılaştırılan SH-SY5Y Hücre Hattı ile Gerçekleştirilen Proteomik Çalışmaları	31
2. AMAÇ .....	35
3. YÖNTEM .....	38

3.1. Nöroblastoma Hücrelerinin (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırılması .....	38
3.1.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Çözülmesi ve Kültüre Edilmesi.....	39
3.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması .....	40
3.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması .....	40
3.1.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörojenik Farklılaşma İşlemine Tabi Tutulması.....	41
3.2. Nöroblastoma Hücrelerinin (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırılması .....	43
3.3. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yapılması .....	45
3.3.1. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	45
3.3.2. qRT-PCR Yöntemi Kullanılarak Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, PINK1, DJ-1, VPS35 ve Aktin Gen Seviyelerindeki Değişimlerin İncelenmesi .....	46
3.4. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden Protein Özütlelerinin Hazırlanması ve Örneklerin Çöktürülerek Temizlenmesi .....	48
3.4.1. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden Protein Özütlelerinin Hazırlanması .....	48
3.4.2. Protein Özütlelerinin Çöktürülerek Temizlenmesi .....	49
3.5. Western Blotlama Yöntemi Kullanılarak Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, PINK1, DJ-1, SNCA, VPS35 ve Aktin Protein Seviyelerindeki Değişimlerin İncelenmesi .....	50
3.6. İki Boyutlu Jel Elektroforezi, (2-DE).....	52
3.7. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS) İçin Örnek Hazırlama ve Analizleri.....	55
3.7.1. Jel-İçi Triptik Kesim ve MALDI-TOF/TOF Analizi .....	55
3.7.1.1. Jel-İçi Triptik Kesim.....	55
3.7.1.2. MALDI-TOF/TOF Analizi .....	56
3.7.2. Solüsyon İçi Triptik Kesim ve nLC-MS/MS Çalışması.....	57
3.7.2.1. Solüsyon-İçi Triptik Kesim .....	57
3.7.2.2. Hazırlanan Örneğin nLC-MS/MS Cihazı ile Analiz Edilmesi .....	57
3.8. MS/MS Veri Analizi .....	59

3.8.1. MALDI-TOF/TOF Veri Analizi .....	59
3.8.2. nLC-MS/MS Veri Analizi .....	59
4. BULGULAR.....	61
4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörojenik Farklılaşma İşlemine Tabi Tutulması.....	61
4.2. Nörojenik Farklılaşmanın IF Yöntemi İle Analiz Edilmesi .....	66
4.3. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yapılması .....	69
4.3.1. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	69
4.3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi Kullanılarak Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, PINK1, DJ-1, VPS35 ve Aktin Gen Seviyelerindeki Değişimlerin İncelenmesi.....	69
4.4. Nörojenik Farklılaşma Sırasında Markör Proteinlerin İfade Düzeylerinde Meydana Gelen Değişimlerin WB Yöntemi Kullanılarak Takip Edilmesi .....	73
4.5. Farklılaşma Sürecinin Protein/Proteom Düzeyinde İncelenmesi .....	79
4.5.1. 2-DE Çalışması ve 2-DE'den Elde Edilen Protein Spotlarının MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlanması.....	79
4.5.2. Farklılaşma Sürecinde Toplanan Protein Örneklerinden nLC-MS/MS Kütle Spektrometresi ile Proteinlerin Tanımlanması.....	86
5. TARTIŞMA .....	90
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....	99
7. KAYNAKLAR .....	101
8. ÖZGEÇMİŞ .....	112
9. EKLER.....	117

## SİMGELER ve KISALTMALAR

6-OHDA: 6-hidroksidopamin

BDNF: Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör

DAT: Dopamine Transporter Geni

DDC: Aromatik-L-aminoasid Dekarboksilaz

DJ-1: Parkinson protein 7

DMSO: Dimetil sulfoksit

DRD1: Dopamin Reseptör 1

DRD2: Dopamin Reseptör 2

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

ESCs: Embryonik Kök Hücreler

FBS: Fetal Sığır Serumı

FDR: Yanlış Keşif Oranı

GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz

IAA: İyodo Asetamid

IEF: İzoelektrik Fokuslama

IF: İmmünFloresan Mikroskopi

IPG: Sabit pH Gradyanı

IPSCs: İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücreler

Kda: Kilo Dalton

LB: Lewy cismi

LRRK2: Lösin Bakımından Zengin Tekrar Kinaz 2 Geni

MALDI-TOF/TOF: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu/Uçuş Zamanı-Uçuş Zamanı-Kütle Spektrometresi

MAP-2: Mikrotübül ile ilişkili protein 2 Geni

MATH: Metamfetamin

MPP<sup>+</sup>: 1-metil-4-fenil Piridinyum İyonu

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

MS: Kütle spektrometresi

MSCs: Mezenkimal Kök Hücreler

NeuN: Nöronal çekirdekler Geni

NeuroD1: Nörojenik farklılaşma 1 Geni

NGF: Nöron Büyüme Faktörü

nLC-MS/MS: Nano-Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

NSCs: Nöral Kök / Progenitör Hücreler

Nurr1: Nükleer reseptöre bağlı 1 protein Geni

PARK2: Parkin Geni

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

PH: Parkinson Hastalığı

PINK1: PTEN-İndüklenmiş Kinaz 1 Geni

qRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROS: Reactive Oksijen Türleri

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat –Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SH-SY5Y: İnsan Kökenli Nöroblastoma Hücre Hattı

SNCA: Alfa Sinüklein

SNpc: Substantia Nigra pars Kompakta

TBS: Tris-Tamponlu Salin

TBS-T: Tris-Tamponlu Salin, 0.1% Tween 20

TEMED: Tetrametilendiamin

TFA: Trifloroasitik Asit

TH: Tirozin Hidroksilaz

TPA: 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat

WB: Western Blotlama

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. MPTP Metabolizmasının Şematik Gösterimi .....	3
Şekil 1.2. PH'ya neden olan moleküler yolların şematik gösterimi .....	8
Şekil 1.3. Dopaminerjik yolak.....	17
Şekil 1.4. SH-SY5Y hücre hattının PH çalışmalarında farklılaştırılarak ya da farklılaştırılmadan kullanıldığı çalışmalara ilişkin dilim grafiği.....	25
Şekil 1.5. Kütle spektrometresi ile protein analizi .....	32
Şekil 3.1. Projede gerçekleştirilen deneylere ait yöntemsel akış şeması.....	38
Şekil 3.2. IF boyama protokolüne ait akış şeması.....	44
Şekil 3.3. Hücrelerin Bullet Blender cihazında +4°C'de çelik boncuklar ile parçalanması .....	49
Şekil 3.4. Laboratuvarımızdaki AB SCIEX TOF/TOF 5800 cihazı .....	56
Şekil 4.1. SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik nöronlara farklılaşma sürecinin inverted mikroskop ile takip edilmesi. ....	61
Şekil 4.2. SH-SY5Y hücrelerinin dokuz günlük iyileştirilmiş protokol uygulanarak nöron-benzeri hücelere farklılaştırılma süreci. ....	65
Şekil 4.3. Nörojenik farklılaşmanın 9. gününde nöron benzeri yapılar oluşturan SH-SY5Y hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü. ....	66
Şekil 4.4. SH-SY5Y hücrelerinin nörojenik farklılaşma sürecinin IF yaklaşımı ile analiz edilmesi.....	68
Şekil 4.5. Nörojenik farklılaşma sürecinde 9. günün sonunda izole edilen RNA'nın %1'lik formaldehit RNA agaroz jel elektroforezi ile analizi. ....	69



<b>Şekil 4.6.</b> Her bir gen için yapılan qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen ifade düzeylerine ait grafikler ve günlere göre SE dağılımları.....	72
<b>Şekil 4.7.</b> qRT-PCR çalışması sonucunda her bir gene ait amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için yürütülen %2'lik agaroz jele ait görüntü. ....	72
<b>Şekil 4.8.</b> Nöronal farklılaştırmaya tabi tutulan SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen protein özütlerinin protein profillerine ait görüntü. ....	80
<b>Şekil 4.9.</b> Nörojenik farklılaşma sürecinde SH-SY5Y proteomunda meydana gelen değişikliklerin proteom düzeyinde 2-DE kullanılarak takip edilmesi. ....	81
<b>Şekil 4.10.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin yakın çekimlerinin QuantityOne (Bio-Rad, ABD) yazılımı ile değerlendirilmesi. ....	84
<b>Şekil 4.11.</b> 2-DE ile tanımlanan ve farklı şekilde regülasyona uğrayan proteinlerin STRING analizlerine ait vektör grafiği .....	86
<b>Şekil 4.12.</b> nLC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen verilerin sınıflandırılması için yapılan PCA analizi. ....	87
<b>Şekil 4.13.</b> nLC-MS/MS analizi sonucunda ara zaman noktalarına göre tanımlanan proteinlere ait Venn şemaları.....	88

## TABLÖLAR

<b>Tablo 1.1.</b> PH'da rol oynayan genler, kromozomal lokasyonları ve ilişkili buldukları yollar. ....	9
<b>Tablo 1.2.</b> PH'da rol oynayan aday genler, kromozomal lokasyonları ve işlevleri.....	11
<b>Tablo 1.3.</b> Nörodejeneratif hastalıkların modelleme çalışmalarında kullanılan hücre tipleri. ....	12
<b>Tablo 1.4.</b> Nöronal farklılaştırma ajanları.....	18
<b>Tablo 1.5.</b> Bazı nöronal farklılaşma markörleri ve bu markörlerin hücre içi görevleri.....	26
<b>Tablo 3.1.</b> Hücre kültüründe kullanılan kimyasal ajanlar.....	39
<b>Tablo 3.2.</b> Farklılaşma sürecinde kullanılan besiyerlerinin içerikleri.....	41
<b>Tablo 3.3.</b> Nörojenik farklılaşmayı takip etmek için kullanılan markörlere ait primer ve sekonder antikor bilgileri.....	45
<b>Tablo 3.4.</b> qRT-PCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri. ....	46
<b>Tablo 3.5.</b> WB deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile pozitif kontrol bilgileri. ....	51
<b>Tablo 3.6.</b> pH 3-10, NL, 7 cm'lik IPG stripler için kullanılan odaklama programı. ....	53
<b>Tablo 3.7.</b> Kera-free SDS-PAGE jel içerikleri. ....	53
<b>Tablo 3.8.</b> Sypro Ruby ile jel boyama prosedürü. ....	55
<b>Tablo 3.9.</b> nHPLC'de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradientleri. ....	58
<b>Tablo 4.1.</b> SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmak için kullanılan çeşitli nöronal farklılaştırma protokolleri ve ilgili makaleler.....	62

<b>Tablo 4.2.</b> IF yönteminde kullanılan nörojenik farklılaşma markörlerine ait parametreler ve elde edilen sonuçlar .....	67
<b>Tablo 4.3.</b> qRT-PCR çalışması sonucu elde edilen regülasyon oranları. ....	70
<b>Tablo 4.4.</b> Nöronal farklılaşma sürecinde kullanılan nörojenik markör proteinlerin ve PH ile ilişkili proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin WB ile analizi. ....	73
<b>Tablo 4.5.</b> Seviyelerinde farklılaşma görülen protein spotlarına ait MALDI-TOF/TOF analiz sonuçları. ....	82
<b>Tablo 4.6.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin 0. gün'e göre regülasyon oranları.....	85
<b>Tablo 4.7.</b> Ara zaman noktalarına göre nLC-MS/MS analizi ile tanımlanan proteinler.....	88

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar ileri derecede bilişsel fonksiyon kaybı ile tanımlanan, ilerleyen ve hatta ölümlü sonuçlanabilen nörodejeneratif bozukluklardır. Nörodejeneratif hastalıklara örnek olarak; Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Frontotemporal Demans, Huntington hastalığı, Spinocerebellar ataksiler ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi hastalıklar verilebilir. Bilim insanları uzun yıllardır nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için etkili yöntemler üzerine araştırmalar yapmaktadırlar. Nörodejeneratif hastalıklarda etkili tedavi stratejileri geliştirebilmek için hastalıkların patogenezi, moleküler mekanizmaları ve sebepleri iyi tanımlanmış olmalıdır. Nörodejeneratif hastalıkların oluşumu birçok unsura bağlıdır yani 'multifaktöriyel bozukluklar' olarak da nitelendirilebilirler. Bu nedenle, bilim insanları bu problemin üstesinden gelebilmek için insan beynini ve ilgili hücreleri taklit edebilen deneysel modeller geliştirmeye çalışmaktadırlar.

Hayvan ve hücre hastalık modelleri nörodejeneratif hastalıkların patogenezi mekanizmalarını kavrayabilmek için uzun süredir başvurulan yollar arasındadır. Bu bağlamda yapılan literatür taramasında ilk hayvan model çalışmalarının 1950'li yıllara kadar uzandığını söylemek mümkündür. Örneğin, Carlson ve ark., 1957 yılında yapmış oldukları çalışmada 'reserpin' kullanarak Parkinson hayvan modeli oluşturmaya çalışmış ve kısmen de başarılı olmuşlardır (Carlsson, Lindqvist, & Magnusson, 1957). Fare ve sıçan modellerinin yanı sıra primatlar da memeli hayvan modelleri olarak kullanılmışlardır. Tüm modellere ek olarak her ne kadar aynı filogenetik nodda bulunmasa da yuvarlak solucan (*Caenorhabditis elegans*), meyva sineği (*Drosophila melanogaster*) ve Zebra balığı (*Danio rerio*) da hayvan modellerine örnek olarak verilebilmektedirler (Gitler, Dhillon, & Shorter, 2017). Bugüne kadar yapılan sayısız çalışma göstermiştir ki hiçbir model sistem insanda oluşan nörodejeneratif hastalıklar ile birebir benzerlik göstermemektedir. Bazı modeller insanda görülen nörodejeneratif bozukluğa daha fazla benzeyen bir nörodejeneratif kaskad geliştirebilseler de hastalığın patogeneziindeki olayların tüm dizisinin tamamen yakalanıp yakalanamadığı belirsizliğini korumaktadır. Tüm bu dezavantajlara rağmen hayvan modelleri nörodejeneratif hastalıklar

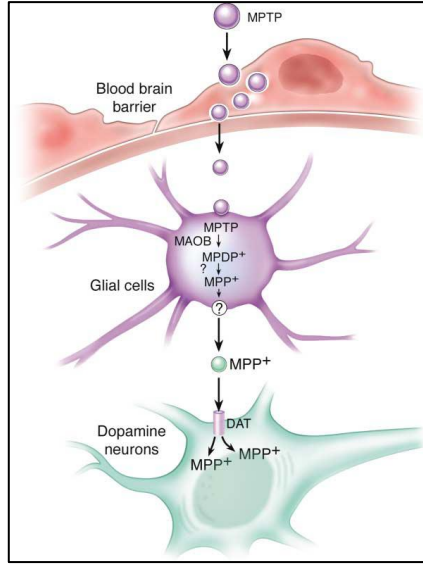
ile ilgili çalışmalarda moleküler ve hücresele mekanizmaları tanımlamak açısından oldukça önemlidirler.

## **1.2. İnsan Nörodegeneratif Hastalıklarını Çalışmak için Kullanılan Hayvan Modelleri**

İnsanda görülen nörodegeneratif hastalıkları taklit etmek için genellikle iki tip hayvan modeli kullanılmaktadır.

### **1.2.1. Nörotoksinler Aracılığı ile Oluşturulan Hayvan Modelleri**

Nörotoksinler aracılığı ile oluşturulan modellerde hayvan çeşitli nörotoksinlere maruz bırakılarak beyninin belirli bölgelerindeki nöronların zarar görmesi hedeflenmektedir. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ve aktif metaboliti olan 1-metil-4-fenil piridinyum iyonu (MPP<sup>+</sup>), 6-hidroksidopamin (6-OHDA), Rotenon, Parakuat ve Metamfetamin (MATH) sıklıkla kullanılan nörotoksinlere örnek olarak verilebilir. MPTP; elektron taşıma sistemindeki kompleks I'ı inhibe ederek Parkinson Hastalığı'na benzer bir fenotip oluşturmaktadır. Kompleks I'in inhibisyonu mitokodriyal elektron taşıma zincirini ve dolaylı olarak da glikolitik yolağı yavaşlatmakta ve hücreleri enerji ihtiyaçlarını karşılayamaz hale getirmektedir. (Diedrich ve ark., 2008). MPTP kan-beyin bariyerini geçerek sadece nigrostriatal yola zarar vermekle kalmaz, aynı zamanda ventral tegmental bölge (VTA)'deki, retrorubral çekirdekdeki ve striatumdaki gabaminerjik nöronların kaybına yol açarak reaktif glial hücre artışına (gliosis) neden olur (Şekil 1.1) (Hernandez-Baltazar, Zavala-Flores, & Villanueva-Olivo, 2017).



**Şekil 1.1.** MPTP Metabolizmasının Şematik Gösterimi (Açıklamalar: Blood brain barrier, Kan beyin bariyeri; Glial cells, Glial hücreler; Dopamine neurons, Dopaminerjik nöronlar) (Dauer & Przedborski, 2003).

6-OHDA'nin 1968 yılında etkilerinin anlaşılması ile Parkinson hastalığı çalışmalarında altın standart model olarak kabul edilmiştir. Bu model aynı zamanda 'Hemiparkinson' model olarak da adlandırılmaktadır (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). 6-OHDA oksitlenebilir bir dopamin analogudur. Dopamin taşıyıcısı tarafından hücre içerisine alınarak katekolaminerjik nöronlarda, Substantia nigra pars kompakta (SNpC) bölgesindeki dopaminerjik nöronlar gibi, seçici hasara yol açmaktadır (Blandini & Armentero, 2012). 6-OHDA maruziyeti ile Parkinson hastalığı patogenezinde oksidatif stres, nörodejenerasyon, nöroinflamasyon, hidrojen peroksit üretimi ve apoptoz ile nöron ölümü gibi ana hücrel süreçler gözlemlenebilmektedir (Hernandez-Baltazar ve ark., 2017). 6-OHDA'nin diğer modellerden en önemli farkı bu ajanın *Substantia nigra pars kompakta (SNpC)* bölgesine tek taraflı olarak verilebilir olması ve verildiği bölgenin her bir bileşenine ulaşabilir olmasıdır. 6-OHDA modelinde, diğer modellerden farklı olarak, aynı hayvandan hem çalışma grubu hem de kontrol grubu için örnek temin edilebilmektedir (Kasap, Akpınar, & Kanlı, 2017). Bir diğer nörotoksin ise Metamfetamin (MATH)'dir. MATH de diğerleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna ve kompleks I'in aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır (Thrash-Williams ve ark., 2016). MATH'e maruz bırakılan sıçanlarda oksidatif hasar, lizozomal degradasyon ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilgili proteinlerin

regülasyona uğradıkları saptanmıştır (Iwazaki, McGregor, & Matsumoto, 2006). Nörotoksinler ile hayvan modeli tasarlamak Parkinson hastalığının motor semptomlarına yönelik semptomatik tedaviler açısından etkili olmasına rağmen, bugüne kadar bu bağlamda geliştirilen terapötik yaklaşımlar hastalığı modifiye edici tedavilerin tanımlanmasında herhangi bir fayda sağlayamamıştır (Athauda & Foltynie, 2016).

### **1.2.2. Transgenik Hayvan Modelleri**

İnsanda görülen nörodejeneratif hastalıkları taklit etmek için kullanılan bir diğer model ise transgenik hayvan modelleridir. Bu modelleme çalışmaları ile nöron dejenerasyonu hedeflenmektedir. Transgenik hayvan modellerinde nörodejeneratif hastalıklara sebebiyet veren ve önceden tanımlanmış olan mutasyonlardan yararlanılmaktadır.

### **1.3. Alzheimer Hastalığı Hayvan Modelleri**

Demansın önde gelen nedeni olan Alzheimer hastalığı tipik olarak erken ilerleyen hafıza kaybı ile karakterize edilmektedir. Ardından yürütücü işlevlerdeki bozukluklar, ajitasyon ve paranoya gibi davranışsal bozuklukları da beraberinde getirmektedir. Hastalığın erken safhalarında beyinin entorhinal korteks ve hipokampüsün CA1 bölgesi takiben limbik yapılar ve daha sonraki aşamalarda izokortikal alanların hepsi etkilenmektedir (Braak & Braak, 1991). Alzheimer hastalığı özellikle senil plakları, nörofibriler düğümler (NFT) ve hipokampal ve kortikal nörodejenerasyon ile tanımlanmaktadır (Jack ve ark., 2016). Senil plaklarının fibriler yapıdaki ana bileşenleri A $\beta$  agregatlarıdır. Nörofibriler düğümlerinin ise esas bileşenleri hiperfosforile ve fibriler formdaki Tau proteinleridir. Amiloid öncüsü protein (APP), presenilin-1 (PSEN1) ve presenilin-2 (PSEN2)'deki mutasyonlar otozomal dominant erken başlangıçlı Alzheimer hastalığının en belirgin sebepleridir (Lanoiselee ve ark., 2017). APOE $\epsilon$ 4 alleli geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için en önemli risk faktörünü oluşturmaktadır (Carmona, Hardy, & Guerreiro, 2018). Bunların yanı sıra en az 25 farklı genetik lokus Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla Alzheimer hastalığı hayvan modelleri bu mutasyonlardan yararlanılarak tasarlanmaktadır. Örneğin; A $\beta$  agregatlarının birikimine sebebiyet veren transgenik kemirgenler bazı serebrovasküler amiloidlerdeki ve senil plaklardaki amiloid birikimi modellerini oluşturmaktadır. Transgenik farelerde oluşturulan APP, PSEN1 ve PSEN2'deki Alzheimer hastalığı bağlantılı

insan mutasyonları insanlardaki etkinin aynısını yaratmaktadırlar (Ashe & Zahs, 2010; LaFerla & Green, 2012). Siklin D1'in ekspresyonunun Alzheimer hastalığında artış gösterdiği bilinmektedir (Arendt, 2000). Bu nedenle, FAD bağlantılı mutant presenilin (P117L)'in Siklin D1 transkripsiyonunu indüklemesi ile nöronlar uyarılabilir ve tekrar hücre döngüsüne girmelerine sebep olarak dejenerasyona yatkınlık yaratılabilmektedir (Uemura ve ark., 2003). Bunların yanı sıra, MAPT gen nakavtı ile taupati geliştirebilen transgenik fareler de Alzheimer hastalığı ile ilişkili hayvan modellerine örnek olarak verilebilmektedir. Alzheimer hastalığı hayvan modelleri, transgenik hayvan modellerinin haricinde, çeşitli ilaçlar ile indüklenerek de oluşturulabilmektedir. Hipokampusu etkileyen kolşisin, skopolamin, okadaik asit, streptozotosin ve trimetilkalay ile ağır metaller, etanol ve lipopolisakkarit gibi kanıtlanmış nörotoksositeye sahip kimyasallar kemirgenlerde Alzheimer hastalığı benzeri bilişsel bozukluğu indüklemek için kullanılmıştır (Chiroma ve ark., 2019).

#### **1.4. Amyotrofik Lateral Skleroz Hayvan Modelleri**

Amyotrofik Lateral Skleroz hastalığı (ALS), tipik olarak 1 ile 5 yıl içinde solunum yetmezliği ile ölümcül felce yol açan üst ve alt motor nöronların erken kaybı ile tanımlanmaktadır (Andersen & Al-Chalabi, 2011). ALS hastalarının çoğu sporadik formdadır. Ancak spesifik genlerdeki mutasyonlar, bakır/çinko süperoksit dismutaz 1 (SOD1) genindeki gibi, ALS'ye sebebiyet verebilmektedir. Bu nedenle ALS hastalık modelleri SOD1 genindeki mutasyonlardan faydalanılarak oluşturulur. Mutant SOD-1 genlerini aşırı eksprese eden transgenik fare ve sıçan modellerinde nöromüsküler bağlantıların kesilmesi, kortikal ve spinal motor nöron kaybı, glial aktivasyon, yanlış katlanmış SOD1 proteininin birikmesi gibi hasarlar meydana gelir. Bu hasarlar hastanın zaman içinde felç geçirerek ölmesine sebep olurlar (Gurney ve ark., 1994; Philips & Rothstein, 2015). Sitoplazmik inklüzyonların ana bileşeni olarak TDP-43 geninin bulunması ile sporadik ALS ve Frontotemporal Demans hastalıklarının araştırılması kolaylaşmıştır (Neumann ve ark., 2006). Bu genlerin yanı sıra FUS proteininin mutant ya da yabancı tip formlarının aşırı ekspresyonu ve UBQLN2 genindeki mutasyonlar da transgenik hayvan modellerinde kullanılmaktadır.



## 1.5. Frontotemporal Demans Hayvan Modelleri

Frontotemporal Demans; frontal ve temporal lobların ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize edilmektedir. Frontotemporal Demans hastalarının çoğu sporadik formda meydana gelmektedir. Ancak Progranulin ve MAPT genlerindeki mutasyonların Frontotemporal Demans'a neden olabilecekleri de bilinmektedir (Snowden ve ark., 2006). ALS ve Frontotemporal Demans hastalıkları klinik olarak birbirlerinden farklı olsalar dahi hastalar veya ailelerde motor nöron dejenerasyonu ve bilişsel bozukluklar benzerlik göstererek örtüşmektedir. Frontotemporal Demans hastalığını modelleyebilmek için mikrotübül ilişkili tau proteinini kodlayan MAPT genindeki mutasyonlardan faydalanılmaktadır (Hutton, Lewis, Dickson, Yen, & McGowan, 2001). ALS ve Frontotemporal Demans hastalıkları ile ilişkili 20'den fazla genin tanımlanması ile yeni hayvan modellerinin geliştirilmesine devam edilmektedir.

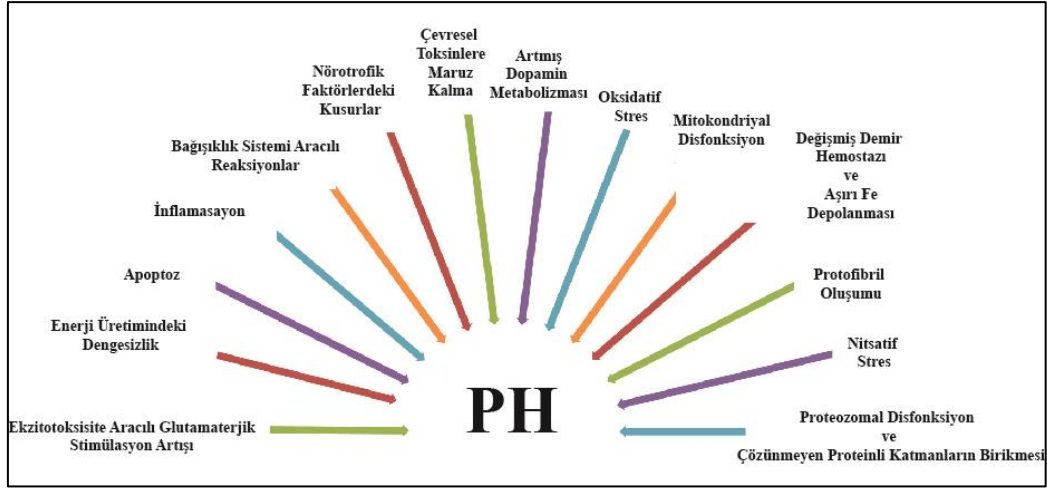
## 1.6. Huntington Hastalığı Hayvan Modelleri

Huntington hastalığı ilerleyen motor anormallikler, psikiyatrik belirtiler ve bilişsel gerileme ile karakterize olan otozomal dominant kalıtsal bir nörodejeneratif bir hastalıktır. Huntington hastalığının temel nedeni Huntingtin genindeki CAG tekrarlarıdır. Bu tekrarlar Huntingtin (Htt) proteininde uzun poliglutamin (PolyQ) dizilerinin oluşumuna neden olmaktadır (Landles & Bates, 2004). 36-40 glutamin tekrarları Huntington hastalığı gelişimi ve patolojisinin yavaş seyri için artmış risk olarak kabul edilmektedir. Mutant Huntingtin proteini (mHtt) 40'tan fazla glutamin tekrarı içermektedir. Huntington hastalığı özellikle striatal ve kortikal nöronların dejenerasyonları ile tanımlansa da beyinin diğer bölgeleri de etkilenebilir (Bano, Zanetti, Mende, & Nicotera, 2011). Huntington hastalığı hayvan modellerinde çeşitli kemirgenler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan transgenik R6/2 fareleridir. R6/2 fareler, Huntingtin geninin ekson 1 bölgesinde CAG tekrarları içeren (~125 tekrar) N-terminal'den kesilmiş mHtt içermektedir. Böylece hastalık hızla oluşarak ilerleyebilmektedir (Morton & Howland, 2013). Transgenik hayvan modelleri yanında kimyasal ajanlar kullanılarak da Huntington hayvan modeli oluşturmak mümkündür. Örneğin; 3-nitropropiyonik asit ve kinolinik asit (QA) eksitotoksik ajanlarının Huntington modeli oluşturulmasında kullanılması gibi. 3-nitropropiyonik asit bir

mitokondriyal toksindir ve mitokondrinin iç membranında bulunan süksinat dehidrogenaz enziminin geri dönüşümsüz inhibisyonuna ve bu yolla da nörotoksositeye neden olmaktadır. Diğer taraftan, QA, N-metil d-aspartat tip glutamat reseptörlerinin bir agonistidir (Colle, Hartwig, Soares, & Farina, 2012). Bu ajanlar tarafından indüklenen eksitotoksosite çalışmaları organotipik striatal, kortikostriatal, sagittal hipotalamik dilim kültürleri ve transgenik R6/2 farelerinden elde edilen hipokampal dilimler ile gerçekleştirilmektedir (Pallier ve ark., 2007; Smith ve ark., 2001).

### **1.7. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri**

Parkinson hastalığı (PH) progresif olarak ilerleyen ve Alzheimer hastalığından sonra en yaygın görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık dopaminerjik nöronların kaybıyla ortaya çıkmaktadır. Klinik olarak ele alındığında, Parkinson hastaları motor ve motor olmayan belirtilerle karakterize edilmektedirler. Motor belirtiler; motor olmayan belirtilere oranla daha keskin ve tanı koymaya yardımcı olan belirtilerdir. Kaslarda sertlik, titreme, hareketlerde yavaşlama (bradikinezi), duruş bozuklukları (postural instabilite) motor belirtilere örnek olarak verilebilir. Bu belirtilerin ortaya çıkış nedeni ise orta beyinin SNpC bölgesinde dopamin üreten ve hareketlerin kontrolünden sorumlu olan dopaminerjik nöronların %60-80'inin zaman içerisinde ölmesinden kaynaklanmaktadır (H. C. Cheng, Ulane, & Burke, 2010). PH uyku, motivasyon ve düşünme ile ilgili problemlerin ortaya çıkmasına da sebep olabilmekte ve SNpC bölgesinin yanında beyinin diğer bölgelerindeki sinir hücrelerini de etkileyebilmektedir. PH tanısında depresyon, bilişsel işlevsizlik, acı ve uyku bozuklukları gibi motor olmayan belirtilerin de saptanabilmesi klinik açıdan oldukça önemlidir, çünkü bu belirtiler motor belirtilerden çok daha önce ortaya çıkmaya başlamaktadırlar (Chaudhuri, Healy, Schapira, & National Institute for Clinical, 2006). PH multifaktöriyel bir hastalıktır. Yani hem çevresel hem de genetik faktörler hastalık oluşumunda rol oynamaktadır (Şekil 1.2). Ancak PH'ya yol açan pek çok patojenik mekanizma olmasına rağmen hastalığın patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir.



**Şekil 1.2.** PH'ya neden olan moleküler yolların şematik gösterimi (Kasap ve ark., 2017).

Beyinde oluşan alfa-sinüklein ve ubikitince zengin lipid ve protein agregatlarının PH patolojisindeki önemi uzun yıllardır bilinmektedir. Bu agregatlara 'Lewy cisimcikleri' adı verilmektedir (Licker, Kovari, Hochstrasser, & Burkhard, 2009; Werner, Heyny-von Haussen, Mall, & Wolf, 2008). Ailesel PH'nın %30'unu ve sporadik PH'nın %3–5'ini oluşturan genetik faktörler üzerinde çalışmalar yapılarak bugüne kadar en az 41 farklı gen lokusunun PH ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Li, Wong, Humphrey, & Raj, 2019). Bu lokuslarda yer alan ve PH ile ilişkili genlerin bir kısmı tespit edilmiş ve bu genlerin hangi metabolik yollarda rol aldıkları da gösterilmiştir (Chang ve ark., 2017). Çalışılan genler arasında bazılarının PH oluşumdaki etkileri net olarak belirlendiği için bu genler birçok çalışmanın odak noktasını oluşturmuştur. Örneğin; Alfa Sinüklein (SNCA) ve Lösün Bakımından Zengin Tekrar Kinaz 2 (LRKK2) genlerindeki mutasyonlar otozomal dominant PH'ya sebebiyet verirken, Parkin, PTEN-İndüklenmiş Kinaz 1 (PINK1) ve Parkinson protein 7 (DJ-1) genlerindeki mutasyonlar otozomal resesif PH'ya yol açmaktadır (Scott, Dawson, & Dawson, 2017). ATPaz Katyon Taşımacılığı 13A2 (ATP13A2), F kutu proteini 7 (FBX07), DnaJ Isı Şok Protein Ailesi (Hsp40) Üye C1 (DNAJC1), Sinaptojanin 1 (SYNJ1), Fosfolipaz A2 grup VI (PLA2G635), Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4 Gama 1 (eIF4G1), VPS35 Retromer Karmaşık Bileşen (VPS35) ve Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain İçeren 2 (CHCHD2) genlerindeki mutasyonlar da PH'nın nadir formlarına sebebiyet vermektedir (Tablo 1.1). Bunların yanı sıra son dönemlerde TMEM230

geni de PH ile ilişkilendirilmiş olup, daha keşfedilecek pek çok moleküler yolağın varlığını bize işaret etmektedir (Deng ve ark., 2016).

**Tablo 1.1.** PH’da rol oynayan genler, kromozomal lokasyonları ve ilişkili buldukları yolaklar, (Genecards.org).

<b>GENİN ADI</b>	<b>LOKASYONU</b>	<b>İLİŞKİLİ YOLAKLAR</b>
SNCA, Alfa Sinüklein (Synuclein, alpha)	4q21	Sinaptik fonksiyon; mitokondriyal fonksiyon, otofaji\lizozomal degradasyon
PARK2, Ubikitin protein ligaz (Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase)	6q25.2-q27	Mitokondriyal fonksiyon\mitofaji; ubikitinasyon, sinaptik fonksiyon
PINK1, PTEN-İndüklenmiş Kinaz 1 (PTEN-induced putative kinase 1)	1p36	Mitokondriyal fonksiyon\mitofaji
PARK7/DJ-1, Parkinson protein 7 (Parkinson disease protein 7)	1p36.23	İnflamasyon\bağışıklık sistemi; Mitokondriyal fonksiyon
LRRK2, Lösin Bakımından Zengin Tekrar Kinaz 2 (Leucine-rich repeat kinase 2)	12q12	Sinaptik fonksiyon; inflamasyon\bağışıklık sistemi; otofaji\lizozomal degradasyon
PLA2G6, Fosfolipaz A2 grup VI (Phospholipase A2, group VI)	22q13.1	Mitokondriyal fonksiyon
FBXO7, F Kutu Proteini 7 (F-box protein 7)	22q12.3	Ubikitinasyon; mitokondriyal fonksiyon\mitofaji

VPS35, VPS35 Retromer Karmaşık Bileşen (VPS35 Retromer Complex Component)	16q12	Otofaji\lizozomal degradasyon; endositoz
ATP13A2, ATPaz Katyon Taşımacılığı 13A2 (ATPase type 13A2)	1p36	Mitokondriyal fonksiyon; otofaji\lizozomal degradasyon
DNAJC6, DnaJ Isı Şok Protein Ailesi (Hsp40) Üye C1 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6)	1p31.3	Sinaptik fonksiyon; endositoz
SYNJ1, Synaptojanin 1	21q22.2	Sinaptik fonksiyon; endositoz

PH için tasarlanacak olan hayvan modelleri Tablo 1.1'deki genleri ve ilişkili mutasyonları içinde barındıracak şekilde tasarlanmaktadır. Farelerin yanı sıra *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* de PH için model hayvan çalışmalarında kullanılmışlardır. PH ile ilişkili genlerin nakavt edildiği transgenik fare modellerinde Tablo 1.1'de listelenen genlerden faydalanılmaktadır. Örneğin; Parkin geni nakavt edilmiş farelerde yapılan proteom çalışmalarında mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif hasar ve sinaptik fonksiyonda sorunlar gözlemlenmiştir (Palacino ve ark., 2004; Periquet, Corti, Jacquier, & Brice, 2005). Bir diğer çalışmada ise SNCA'daki mutasyonların PH'nın patofizyolojisini nasıl etkilediğini anlamak için SNCA (A53T, A30P and E46K) mutasyonu eksprese eden transgenik fareler kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda da mitokondriyal disfonksiyon saptanmıştır (Poon ve ark., 2005). LRRK2 genine ait G2019S ya da R1441C/G mutant formlarının aşırı ekspresyonu transgenik farelerde dopamin bağımlı metabolik sistemde problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Daniel & Moore, 2015). Parkin, PINK1 ve DJ-1 genlerindeki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar kullanılarak oluşturulan hayvan modelleri ile nörodejenerasyonun moleküler mekanizmaları anlaşılmasına çalışılmaktadır. Tablo 1.1'de listelenen genlerin yanı sıra dopamin biyosentezinde görev alan TH (Tirozin hidroksilaz) ve

DDC (Aromatik-L-aminoasid dekarboksilaz) genleri ile dopamin reseptör genleri olan DRD1 (Dopamin Reseptör 1) ve DRD2 (Dopamin Reseptör 2) genleri de bu çalışmanın diğer aday genleri arasında yer almaktadır (Tablo 1.2).

**Tablo 1.2.** PH’da rol oynayan aday genler, kromozomal lokasyonları ve işlevleri (Constantinescu, Constantinescu, Reichmann, & Janetzky, 2007).

GENİN ADI	LOKASYONU	İŞLEVİ
TH (Tirozin hidroksilaz, Tyrosine hydroxylase)	11p15.5	Katekolaminlerin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim
DDC (Aromatik-L-aminoasid dekarboksilaz, Aromatic-L-amino-acid decarboxylase)	7p12.1	L-3,4-dihidroksifenilalanin’in (DOPA) dopamine dekarboksilasyonunu katalize eder
DRD1 (Dopamin Reseptör 1, Dopamine Receptor 1)	5q35.2	Dopamin reseptörü
DRD2 (Dopamin Reseptör 2, Dopamine Receptor 2)	11q23.2	Dopamin reseptörü

Hayvan modellerinin yanı sıra saflaştırılmış rekombinant proteinlerin, hücre kültürü modellerinden elde edilen protein agregatlarının, insan hastalığı lizatlarının veya fare beyni lizatlarının intraserebral enjeksiyon çalışmaları da tohumlanmış ‘seeded’ modeller olarak kullanılmaktadır. Böylece bu modeller transgenik ve bazı yabancı tip kemirgenlerin beyinlerinde A $\beta$ , tau,  $\alpha$ -sinüklein ve diğer inklüzyon patolojilerini canlandırmak için kullanılmaktadırlar (A. K. Walker ve ark., 2015; L. C. Walker, Diamond, Duff, & Hyman, 2013).

En yaygın *in vivo* modeller kemirgenler ve primatlardır. Bununla birlikte, bu modeller doğal olarak pahalıdır, türler arası değişkenlik ve ayrıca hayvandan hayvana spesifik nörotoksinlere ve kullanılan ilaçlara karşı duyarlılık gösterebilmektedirler (Bove, Prou, Perier, & Przedborski, 2005). Genel olarak bakıldığında insan nörodejeneratif hastalıklarının fare modellerinden elde edilen sonuçlarla hedefe yönelik tedavilere dönüştürülmesinde

sınırlı sayıda başarı elde edilmiştir. Bugüne kadar, bir hayvan modelinde başarı gösteren terapötiklere dayanan Alzheimer hastalığı, ALS hastalığı, Frontotemporal Demans hastalığı ve PH'daki klinik çalışmalar büyük ölçüde başarısız olmuştur. Bu başarısızlık özellikle altta yatan patolojileri hedefleyen veya nörodejeneratif değişiklikleri yavaşlatmaya çalışan hastalığı modifiye edici tedaviler için geçerlidir (Dawson, Golde, & Lagier-Tourenne, 2018). Ayrıca hayvan modelleme çalışmaları oldukça pahalı pre-klinik çalışmalardır. Bu açıdan ele alındığında hücre kültürü modelleri en basit modeller olmalarına karşın, nöro bilim çalışmalarındaki önemleri yadsınamaz (Kasap ve ark., 2017).

### 1.8. Nörodejeneratif Hastalıklarda Kullanılan Hücre Modelleri

Nöronal hücre fizyolojisini anlayabilmek için hayvan modellerinin yanı sıra hücre kültürü modellerinden de ciddi anlamda faydalanılmaktadır. Hücre kültürü modelleri çoğunlukla moleküler yollar arasındaki etkileşimlerin çalışılması amacıyla kullanılmaktadırlar. Hücresel modeller, hayvan modelleri ile mukayese edildiğinde, daha kolay temin edilebildikleri için daha çok tercih edilmektedirler. Ayrıca, hücresel modeller ile yapılan çalışmalar maliyetleri düşük çalışmalar olup bu çalışmalar için etik onay da gerekmemektedir. Aşağıdaki tabloda (Tablo 1.3) bazı nörodejeneratif hastalıklar ve kullanılan bazı hücre tipleri özet olarak verilmiştir.

**Tablo 1.3.** Nörodejeneratif hastalıkların modelleme çalışmalarında kullanılan hücre tipleri.

Nörodejeneratif Hastalık	Kullanılan Hücre Tipleri
Alzheimer Hastalığı	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ölümsüzleştirilmiş sıçan feokromositoma (PC12)</li> <li>İnsan embryonik böbrek 293 hücreleri (HEK293)</li> <li>Ölümsüzleştirilmiş insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y)</li> <li>Primer kortikal ve hipokampal kültürler</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikroglial hücreler</li> <li>• Astrosit hücreleri</li> </ul>
Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığı	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fare nöronal hibrid hücre hattı (MN-1)</li> <li>• Fare motor nöron hibridoma hattı (NSC-34)</li> <li>• Nöroblastoma hücreleri ile farelerin omurilik hücrelerinin füzyonundan türetilen hibridoma hücre hattı</li> <li>• Farelerin primer omurilik hücre kültürlerine benzeyen primer kültürler</li> <li>• Mikroglial hücreler</li> <li>• Astrosit hücreleri</li> </ul>
Frontotemporal Demans Hastalığı	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genellikle İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSCs)</li> </ul>
Huntington Hastalığı	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PC12</li> <li>• iPSCs</li> <li>• Fare Neuro2A (N2A)</li> <li>• SH-SY5Y</li> <li>• ST14A hücreleri</li> <li>• Fare-sıçan nöroblastoma-glioma hibrid hücre hattı (NG108-15)</li> <li>• Ölümsüzleştirilmiş sıçan hipokampal nöronal hücre hattı (HN33)</li> <li>• Huntington hastası transgenik farelerden izole edilen primer nöronlar</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"><li>• HeLa hücreleri</li><li>• İnsan embryonik böbrek hücre hattı (HEK293T)</li><li>• Maymun böbrek hücre hattı (COS-7)</li></ul>
<p>Parkinson Hastalığı</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• SH-SY5Y</li><li>• PC12</li><li>• HEK293</li><li>• İnsan embriyonal tetrakarsinom hücre hatları (NT2, hNT)</li><li>• H4 insan nörogloma hücre hattı</li><li>• Ölümsüzleştirilmiş fare hibrit mezensefalik hücreleri (MN9D)</li><li>• Ölümsüzleştirilmiş Sıçan Embriyonal Mezensefalon (CSM14.1)</li><li>• Ölümsüzleştirilmiş 8 haftalık insan mezensefalonu (MESC2.10)</li><li>• Ölümsüzleştirilmiş Lund insan Mezensefalik Hücreleri (LUHMES; MESC2.10 hücrelerinin alt klonu)</li><li>• Primer orta beyin kültürleri</li><li>• Embriyonik kök hücreler</li><li>• Nöronal kök hücreler</li><li>• Mezenkimal kök hücreler</li><li>• IPSC'lerden türetilen dopaminerjik nöronlar</li><li>• Mikroglial hücreler</li><li>• Astrosit hücreleri</li></ul>

Tablo 1.3'te de görüldüğü gibi nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* modelleme çalışmalarında pek çok farklı tip hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücre hatlarının da kendi içlerinde birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Örneğin; PH için *in vitro* modelleme çalışmaları ele alındığında insan fibroblast hücrelerinden yönlendirilmiş olan indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden türetilen dopaminerjik nöronlar ideal hücre modeli olarak görünse de bu hücrelerin eldesi maliyetlidir ve çok emek ister. (Takahashi & Yamanaka, 2006). Beynin orta kısmında bulunan dopaminerjik nöronlardan primer hücreleri kültüre etmek oldukça zor, zaman alan ve maliyetli bir iştir. Diğer taraftan HEK293, İnsan embryonik böbrek 293 hücreleri, hücre hattı kolay transfekte edilebilmektedir ve alfa sinüklein ( $\alpha$ -SYN) ve diğer PH ile alakalı mutasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Tabrizi ve ark., 2000). Ancak bu hücre hattının dezavantajı ise nöronal kökenli hücrelerden oluşmamasıdır. İnsan embriyonal tetrakarsinom hücre hatları (NT2, hNT) da *in vitro* modelleme çalışmalarında kullanılmalarına rağmen kısıtlı seviyede nöronal fenotip gösterebilmektedirler (Podrygajlo, Song, Schlesinger, Krampf, & Bicker, 2010). Bir başka seçenek olarak LUHMES ölümsüzleştirilmiş hücre hattı karşımıza çıkmaktadır ve bu hücrelerin pek çok açıdan PH çalışmaları için uygun olduğu bilinmektedir. LUHMES hücreleri glial hücre hattından türetilen nörotrofik faktör (GDNF) ve cAMP ile indüklendiklerinde dopaminerjik nöron benzeri hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir (Lotharius ve ark., 2005). Farklılaştırılan LUHMES hücreleri nöronal elektrik aktivitesi ve dopamin salınımı gibi özellikler sergileyerek yüksek ölçüde dopaminerjik bir fenotip oluşturabilmektedirler. Bu nedenle dopamin ile ilişkili hücre ölüm mekanizmalarını çalışmak için kullanılmaktadırlar (Schildknecht ve ark., 2009). Yukarıdaki avantajlara rağmen bu hücrelere gen transfekte etmekte yaşanan zorluklar nedeni ile bu hücrelerin kullanımında da sınırlamalar yaşanmaktadır. Ayrıca ölümsüzleştirilen hücre hatlarının çabuk replike olmaları avantaj gibi gözükse de kronik bir model oluşturmak için elverişli değildirler. Benzer şekilde primer hücre hatlarıyla da kronik hastalık modeli oluşturmak imkânsızdır çünkü primer hücreler de pasaja maruz bırakıldıklarında replikatif yaşlanma problemi ile karşı karşıya kalırlar ve uzun süre kültüre edilemezler (Blander, de Oliveira, Conboy, Haigis, & Guarente, 2003). Ayrıca, insan primer nöronlarının izole edilmesi ve kültürde çoğaltılması oldukça zordur. Primer hücreler izole edilseler bile çalışma yapılmadan önce mutlaka karakterize edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan GFAP

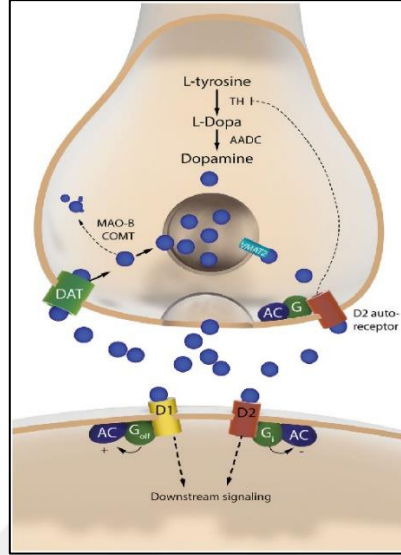
ve Vimentin gibi proteinlerin ileri teknolojiler kullanılarak (Western Blotlama, qRT-PCR ve akım sitometrisi) bu hücre hatlarındaki düzeyleri tanımlanmalıdır (Kimelberg, 2004). Aksi takdirde karakterize edilmemiş bir hücre popülasyonu ile çalışmak durumunda kalınacağı için elde edilen verilerin yorumlanmasında zorluklar yaşanacaktır. Tüm bu bahsetmiş olduğumuz hücre hatlarının yanı sıra literatürde en sık kullanılan hücre hatlarından biri olarak insan kökenli SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri karşımıza çıkmaktadır. Bu hücreler özellikle PH'nın oluşumunda rol oynayan moleküler mekanizmaların açığa çıkartılmasında oldukça faydalı bir model hücre tipi olmuştur. SH-SY5Y hücreleri de yukarıda bahsedilen diğer bazı hücre tipleri gibi gerekli uyarıcı ajanlara maruz bırakılırsa nöron benzeri hücrelere dönüşebilmektedirler. Bu hücrelerin, özellikle, post-mitotik olgun dopaminerjik nöron benzeri hücrelere farklılaştırılabilme yetenekleri çalışmalar için tercih edilme sebeplerinden olmuştur (Constantinescu ve ark., 2007).

Hücresel modeller nörodejeneratif hastalıkların moleküler mekanizmalarını incelemek için uygun ve bilgilendirici modellerdir. Bu nedenle de ilaç tedavilerini geliştirebilmek için bir araç olarak kullanılmaktadırlar. Bu tez kapsamında yapılan deneylerde laboratuvarımızda bulunan SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı model olarak kullanılmıştır.

### **1.8.1. İnsan Kökenli Nöroblastoma Hücre Hattı, SH-SY5Y**

SH-SY5Y hücre hattı SK-N-SH parental nöroblastoma hücre hattından köken almıştır. SK-N-SH hücreleri metastatik nöroblastoma hastası dört yaşındaki kız çocuğunun kemik iliğinden izole edilmiştir. SK-N-SH hücre hattı üç farklı fenotipte hücre içermektedir; nöronal (N-tip), Schwannian (S-tip) ve aracı (I-tip) (Joshi, Guleria, Pan, DiPette, & Singh, 2006). SH-SY5Y hücreleri daha çok N-tip hücrelerdir. SH-SY5Y hücreleri 47 kromozoma sahip olmasına rağmen göreceli olarak stabil bir karyotipe sahiptirler (Xie, Hu, & Li, 2010). SH-SY5Y hücre hattı tümör kaynaklı bir hücre hattı olduğu için sürekli bölünerek farklı deneyler için yeterli miktarda ve kendi içinde büyük varyasyonlar göstermeyen hücre yoğunluğuna ulaşabilmektedirler. SH-SY5Y hücreleri orta derecede dopamin- $\beta$ -hidroksilaz aktivitesi; göz ardı edilebilecek derecede kolin asetil-transferaz, asetil-kolinesteraz ve bütiril-kolinesteraz; bazal düzeyde ise nor-adrenalin salınımı ve tirozin hidroksilaz (TH) aktivitesi göstermektedirler (Nagatsu, Levitt, & Udenfriend, 1964; Ross & Biedler, 1985).

TH, katekolamin sentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olup tirozini dopamin öncülü olan L-dopa'ya çevirmektedir (Şekil 1.3) (Levin, Levenberg, & Kaufman, 1960). L-dopa daha sonrasında dopamin-β-hidroksilaz enzimi aracılığıyla nor-adrenaline dönüştürülmektedir.



**Şekil 1.3.** Dopaminerjik yolak (Kısaltmalar: AADC, Aromatik L-aminoasit dekarboksilaz; AC, Adenilat siklaz; COMT, Katekol-O-metil-transferaz; DAT, Dopamin taşıyıcısı; MAO-B, Monoamin oksidaz B; TH, Tirozin hidroksilaz; VMAT-2, Veziküller monoamin taşıyıcısı 2) (Cenci, 2014).

SH-SY5Y hücreleri dopamin ve nor-adrenalin sentezleyebilen yollara sahip oldukları için katekolaminerjik bir fenotip göstermektedirler. Ayrıca, sadece merkezi sinir sistemindeki dopaminerjik nöronlarda eksprese olan dopamin transporter (DAT) ifadesi düşük seviyede de olsa bu hücrelerde görülmektedir. Tüm bu özelliklerine rağmen SH-SY5Y hücrelerini dopaminerjik nöron benzeri hücreler olarak sınıflandırmak doğru değildir. Buna rağmen bu hücreler literatürde en sık kullanılan PH hücre modeli olarak dikkat çekmektedirler (Kasap ve ark., 2017). Bu hücrelerde PH'nın patogenezinde etkili olduğu bilinen birçok gen ve yolak bozulmamış durumdadır (Krishna ve ark., 2014). Dolayısıyla kısmi katekolaminerjik özelliklere sahip olan bu hücre hattının PH'da model olarak kullanıldığı çok sayıda çalışmayı literatürde bulmak mümkündür.

SH-SY5Y hücrelerini hastalık modeli olarak kullanan bilim insanları tarafından bu hücrelerin çeşitli kimyasal ajanlar yardımı ile nöron benzeri hücrelere farklılaştırılabileceği

anlaşmıştır. Daha sonra, SH-SY5Y hücrelerinin nöron benzeri hücelere farklılaştırılmış hallerinin farklılaştırılmamış hallerine göre nörodejeneratif hastalıklar için daha iyi bir model olup olmayacağı tartışılmıştır. Bu amaçla çok sayıda çalışma yapılmış ve SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşmasını tetikleyen ajanlar bulunmuştur. Bu ajanlardan bazıları ve karakteristik özellikleri Tablo 1.4'te verilmiştir. Yapılan çalışmalarda SH-SY5Y hücrelerini dopaminerjik ya da katekolaminerjik nöronlara farklılaştırmanın mümkün olduğu gösterilmiştir. Dolayısı ile kullanılan farklılaştırma ajanına göre istenilen hücre tipini elde etmek mümkündür. SH-SY5Y hücreleri *in vitro* ortamda retinoik asit (RA), Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF) ya da folbiol ester (12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat, TPA) gibi ajanlar aracılığıyla farklılaşmaya tabi tutulduklarında, nöron benzeri bir fenotipin elde edildiği görülmüştür (Kovalevich & Langford, 2013; Pahlman, Ruusala, Abrahamsson, Mattsson, & Esscher, 1984).

### **1.9. SH-SY5Y Hücre Hattında Nöronal Farklılaştırma Protokollerinde Kullanılan Ajanlar**

SH-SY5Y hücre hattının nöronal farklılaştırmaya tabii tutularak nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* modelleme çalışmalarında kullanılması uzun yıllardır araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Literatürde nöroblastoma hücrelerinin kültürleriyle alakalı oldukça fazla sayıda yayınlamış makale bulunmaktadır. Bu çalışmalarda farklılaştırılan nöroblastoma hücreleri de sıklıkla kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri birbirinden farklı nöronal farklılaştırma ajanları ile farklılaştırma protokolüne tabii tutulabilmektedir (Tablo 1.4)

**Tablo 1.4.** Nöronal farklılaştırma ajanları

<b>Farklılaştırma Ajanı</b>	<b>Tanım</b>
Retinoik Asit, RA	RA bir vitamin A metabolitidir. RA ajanı nöronal farklılaştırmayı nörotrofin reseptör genlerinin transkripsiyonlarının düzenlemesi ile Wnt sinyali yolağı ve tip II protein kinaz A (PKA)'yı içeren yolaklar ile indüklemektedir (Xie ve ark., 2010). RA ile farklılaşan hücreler genellikle kolinerjik bir nöronal fenotip

sergilemektedirler (yüksek kolin asetil transferaz, ChAT ekspresyonu). RA, SH-SY5Y hücrelerinin nörotoksinlere ve nöroprotektif ajanlara karşı duyarlılığını arttırmaktadır. Dolayısıyla RA ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücreleri deneysel PH çalışmalarında nörotoksisite (özellikle MPP<sup>+</sup>) ve nöroprotektivite çalışmak için çok elverişli değildir (Presgraves, Ahmed, Borwege, & Joyce, 2004). RA ayrıca dopaminerjik reseptörlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. RA'ya maruz kalındıkça hücrelerde akson boyu uzamaktadır. Ayrıca, nörosesifik enzimlerin (asetilkolinesteraz gibi), nörotransmitterlerin (dopamin gibi katekolaminler) sentezleri artarken, hücre iskeletinde değişiklikler (nörofilamentler) ile normal nöronlarda görüldüğü gibi elektrofizyolojik modifikasyonlar gözlemlenmektedir (Melino, Thiele, Knight, & Piacentini, 1997). RA ile farklılaştırılan hücreler, hücre döngüsünün G1 fazında yakalanarak büyüme durdurulmaktadır ve DNA sentezi inhibe edilmektedir. RA ile muamele edilen hücrelerde Tropomiyosin reseptör kinaz B (TrkB) ve B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) transkripsiyonları aktif hale gelmektedir (Jamsa, Hasslund, Cowburn, Backstrom, & Vasange, 2004). Bu da hücreleri BDNF'e karşı duyarlı hale getirmektedir (Kaplan, Matsumoto, Lucarelli, & Thiele, 1993). RA ve BDNF ile, sırasıyla, nöronal farklılaştırma protokolüne tabii tutulan SH-SY5Y hücreleri yuvarlak morfolojilerinden ziyade nöron benzeri yapılar ve akson uzantıları sergilemektedirler (Encinas ve ark., 2000). Ayrıca, RA'nın SH-SY5Y hücrelerini kısmen proteazom inhibitörlerine karşı koruduğu tespit edilmiştir (B. Cheng ve ark., 2013).

Tetradekanoilforbol asetat, TPA (forbol-12-miristat-13-asetat, PMA)	TPA, Protein kinaz C aracılı yolağa (PKC) etki etmektedir. TPA ile muamele edilen hücrelerde nörotransmitter sentezi adrenerjiktir (Pahlman ve ark., 1984). RA'nın ardından TPA'ya maruz kalan hücrelerde dopaminerjik nöronal bir fenotip gözlenirken, nörotoksinlere ve nöroprotektif ajanlara karşı duyarlılığın azaldığı görülmektedir (Xie ve ark., 2010). TPA ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde, RA ile muamele edilen hücrelere kıyasla, nor-adrenalin seviyesi oldukça fazladır.
Dibütiril siklik adenzin monofosfat, dbcAMP	dbcAMP, cAMP'ye bağlı PKA sinyal yolağını etkileyerek nöronal farklılaştırmaya yardımcı olmaktadır. dbcAMP, adrenerjik fenotipe farklılaştırmayı sağlayarak noradrenalin üretimi ile TH ekspresyonunun artmasını sağlamaktadır (Kume ve ark., 2008).
Vanadat	Vanadat bir tirozin fosfataz inhibitörüdür. Vanadat'ın SH-SY5Y hücrelerinde NGF gibi akson uzamasını tetiklediği saptanmıştır (Rogers, Buensuceso, Montague, & Mahadevan, 1994). Vanadat maruziyeti ile birçok proteinde fosfotirozin birikimi meydana gelmektedir. Bunun sonucu olarak da birçok hücre tipinde mitojenik ve farklılaşma sinyalleri etkilenmektedir (Gordon, 1991).
Storosporin	Storosporin seçici olmayan protein kinaz inhibitörüdür. SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaştırılmasında kullanılan güçlü bir farklılaştırma ajanıdır. Storosporin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde katekolamin konsantrasyonu artmaktadır. Storosporin olgun bir adrenerjik nöronal fenotipin oluşmasını indüklerken TH ve DAT'ın aktivitelerinin de arttığı gözlemlenmektedir (Jalava, Heikkila, Lintunen, Akerman, & Pahlman, 1992). Storosporin de TPA gibi Protein kinaz C aracılı yolağa (PKC) etki etmektedir. TPA bir PKC aktivatörü iken, Storosporin güçlü bir PKC inhibitörüdür ve nöronal

	<p>farklılaşma sırasında farklı PKC izoformları için farklı roller üstlenmektedirler. Storosporin, SH-SY5Y hücrelerinde proliferasyon inhibisyonunda oldukça etkilidir (Filograna ve ark., 2015).</p>
<p>Apoptoz İlişkili Tirozin Kinaz, AATYK</p>	<p>AATYK bir sitosolik kinazdır. Bilindiği üzere, IGF-I nöronal hayatta kalabilmede rol oynamaktadır. AATYK'nın da İnsülin-benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) ve reseptörü (IGF-IR) ile homolojisi bulunmaktadır. AATYK'nın da ilk kez nöronal farklılaştırmayı indüklediği ve ayrıca SH-SY5Y hücrelerinde diğer ajanlar (RA ve TPA) tarafından uyarılmış farklılaştırmayı da teşvik ettiği gösterilmiştir (Raghunath ve ark., 2000).</p>
<p>Nörotrofinler (NGF, BDNF, Nörotrofin 3 ve Nörotrofin 4\5, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF1), glial hücre hattan türetilen nörotrofik faktör (GDNF) ve siliyer nörotrofik faktör (CNTF) gibi)</p>	<p>Nörotrofinler farklı türdeki nöronların <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> ortamlarda hayatta kalmalarını teşvik etmektedirler (Encinas ve ark., 2000). Nörotrofinler, tirozin kinaz reseptörlerine ve nörotrofin reseptör p75 (NTR) bağlanarak ve onları aktive ederek görevlerini yapmaktadırlar (Kaplan &amp; Miller, 2000). RA ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin besiyerine BDNF eklendiği zaman, sırayla, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-K) ve ekstraselüler düzenlenmiş kinaz (ERK) yolları aktive olarak hayatta kalma ve niritogenezis tetiklenmektedir (Encinas, Iglesias, Llecha, &amp; Comella, 1999). <i>In vitro</i> ortamda kültür yapıldığında görülmüştür ki; kullanılan nörotrofik faktörlere bağlı olarak nöronal hücre tiplerinin hayatta kalma cevapları da değişkenlik göstermektedir. Böylece hücrenin homeostaziyi sağlamak için normal şartlar altında gerçekleştirdiği 'programlanmış hücre ölümü' konsepti, nörotrofik faktörlerin ortamdan çekilmesi ile apoptozis aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Parrow, Nanberg, Heikkila, Hammerling, &amp; Pahlman, 1992).</p>

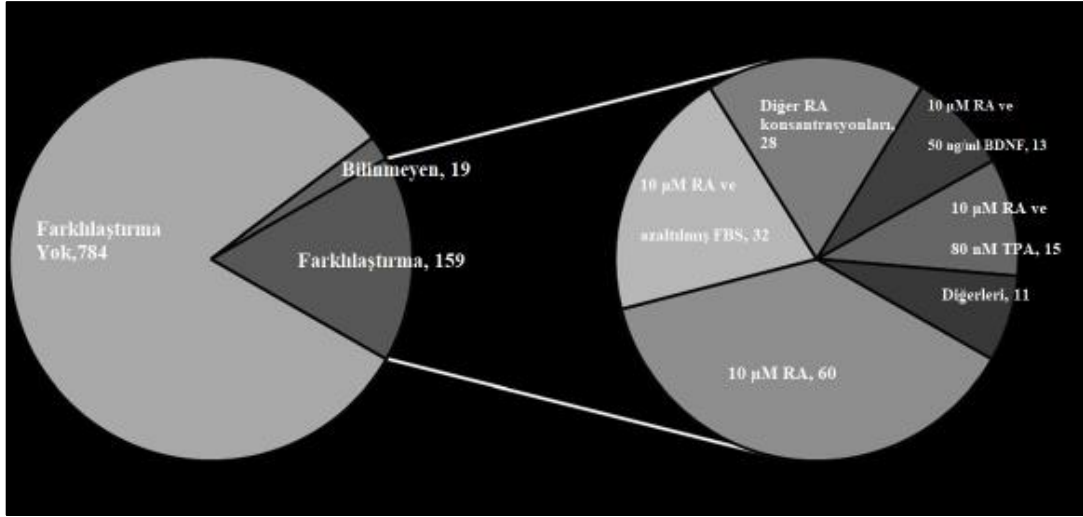


Kolesterol	Glia kökenli bir faktördür. Sinaptik keseciklerin biogenezi için gereklidir. Kolesterol ve RA birlikte muamele edildiğinde akson uzamasında ciddi bir artış ile dopaminerjik nöronal bir fenotip gözlemlenmektedir. Ayrıca, RA ile birlikte muamele edildiğinde, sinaptik kesecikler açısından önemli olan Golgi'nin RA'e bağlı fragmentasyonu kısmen engellenebilmektedir (Sarkanen ve ark., 2007).
Diğer farklılaştırma ajanları	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guanosin ve Guanosin-5'-trifosfat da farklılaşma ajanları olarak kullanılmaktadırlar. Her biri SH-SY5Y hücrelerinde hücre döngüsünün durmasını indüklerken, TH ve DAT seviyelerinde de güçlü artışı tetiklemektedirler. Bu pürinlerle dopaminerjik/adrenerjik bir fenotipin oluşması uyarılmaktadır (Guarnieri ve ark., 2009).</li> <li>• Diğer bir seçenek olarak; hipoksi de nöroblastoma hücreleride fenotipik değişikliklere neden olabilmektedir. Hipoksik koşullar altında nöroblastoma hücreleri olgunlaşmamış kök hücrelere benzemektedirler. Bu farklılaştırma işlemine, diğerlerinden farklı olarak, dediferansiyasyon adı verilmektedir ve oldukça karmaşık bir oluşumdur. (Edsjo, Holmquist, &amp; Pahlman, 2007).</li> <li>• Ekstraselüler matriks (ECM) de 3-D olarak hücrelere destek sağlamaktadır. İçeriği dolayısıyla hücreleri nöronal farklılaşmaya teşvik ederek merkezi sinir sisteminin gelişmesini sağlamaktadır (Hahn, Glass, &amp; Koke, 2000). Aynı ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen farklılaştırma deneyinde, klasik kültür tabaklarında büyütülen hücrelere oranla ECM'de büyütülen hücrelerin daha gelişmiş nöron-benzeri morfoloji sergiledikleri gözlemlenmiştir (Agholme, Lindstrom,</li> </ul>

	<p>Kagedal, Marcusson, &amp; Hallbeck, 2010). Ayrıca, ECM, merkezi sinir sistemindeki glia ve oligodendrosit gibi diğer hücrelerin de farklılaşmasını teşvik etmektedir (Innala ve ark., 2014).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Nörobazal besiyeri ve B-27 takviyesi de nöron gelişimi ve uzun süreli hayatta kalma açısından önem taşımaktadır (Shiple, Mangold, &amp; Szpara, 2016).</li><li>• Son zamanlarda nanobiyoteknolojinin gelişmesi ile de nöronal farklılaşmayı teşvik edebilecek nano parçacıklar hazırlanmaktadır. Bunlara örnek olarak küresel gümüş nanoparçacıkları (AgNP) verilebilmektedir. AgNP'ler; ROS'ları, fosfatazları ve kinaz sinyal yollarını modüle ederek nöronal farklılaşmayı uyarmaktadırlar (Dayem ve ark., 2014).</li></ul>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SH-SY5Y hücrelerini ilk kez farklılaştıran araştırmacılar, farklılaştırmayı indükleyebilmek için besi ortamına esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitleri eklemişlerdir (Goldstein, Burdman, & Journey, 1964). Ancak, bu farklılaştırma protokolü yeterli olmadığından dolayı bilim insanları bu hücreleri farklılaştırabilmek için farklı ajanlar denemişlerdir. Bunlardan ilki TPA'dır. TPA ile farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde nöron spesifik enolaz (NSE) enzim aktivitesinin, noradrenalin ve adrenalin konsantrasyonlarının arttığı saptanmıştır (Pahlman, Odelstad, Larsson, Grotte, & Nilsson, 1981). Pahlman ve ark. (1984) TPA'ya ek olarak besiyerine RA de eklemiş ve SH-SY5Y hücrelerini bu ajanların ortak etkisi ile farklılaştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda RA ve TPA ajanları ile hem tek tek hem de beraber muamele edilen hücrelerin oluşturdukları fenoptiplerin birbirlerinden farklı seyrettikleri gözlemlenmiştir. SH-SY5Y hücreleri RA ile muamele edildiğinde hücre büyümesi inhibe olmakta ve noradrenalin üretim seviyesi artmaktadır (Encinas ve ark., 2000). Bir başka farklılaştırma çalışmasında SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmak için TPA ve db-cAMP kullanılmış ve db-cAMP tek başına uygulandığında nöronal farklılaştırmayı başlatma kapasitesinin sınırlı olduğu ancak TPA ile beraber uygulandıklarında morfolojik

olarak farklılaşmanın gerçekleştiği ve hücre büyümesinin inhibe olduğu gözlemlenmiştir (Ruusala ve ark., 1985). Bunun yanı sıra Perez-Polo ve ark. (1979) yaptıkları bir çalışmada Nöron Büyüme Faktörü (NGF) ile SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırdıklarını ve bu nöronal farklılaşmanın NGF ortamdan çekilse bile geri dönüşümsüz olduğunu göstermişlerdir (Perez-Polo, Werbach-Perez, & Tiffany-Castiglioni, 1979). SH-SY5Y hücrelerinin, aynı zamanda, büyüme faktörlerinin yokluğunda da büyütülüp farklılaştırılabilme gibi bir avantajı da vardır (Nicolini ve ark., 1998). *In vitro* ve *in vivo* ortamlarda yapılan çalışmalar sonucunda NGF, BDNF, Nörotrofin 3 ve Nörotrofin 4\5 gibi nörotrofik faktörlerin bazı nöron tiplerinin hayatta kalmasını pozitif yönde etkiledikleri belirlenmiştir (Davies, 1994). Bir diğer nöronal farklılaştırma ajanı olarak Vanadat (protein fosfotaz inhibitörü) da kullanılmaktadır. Vanadat'ı diğer farklılaştırma ajanlarından ayıran özellik bu maddenin inorganik bir madde olması ve hücre içi oksidasyon-redüksiyon dengesini değiştirmesidir (Rogers ve ark., 1994). Storosporin de SH-SY5Y hücrelerini nöronal olarak farklılaştırmak için kullanılan güçlü bir ajandır. Yapılan bir çalışmada RA, TPA ve Storosporin ajanları nöronal farklılaştırma protokolü açısından karşılaştırılmış, elde edilen sonuçlara göre serumsuz ortamda Storosporin ile gerçekleştirilen farklılaştırmada hücrelerin olgun nöronal fenotipe ulaştıkları saptanmıştır. Ayrıca nöronal fonksiyonu saptamak için kullanılan voltaj-kapılı kalsiyum kanalı hassasiyet ölçümünün de en yüksek Storosporin ile muamele edilen hücrelerde olduğu gözlemlenmiştir (Prince & Orelan, 1997). Apoptoz ilişkili Tirozin Kinaz (AATYK) bir aktif, reseptör olmayan, sitosolik kinazdır. 2000 yılında yapılan bir çalışmada, AATYK'nın da ilk kez nöronal farklılaştırmayı indüklediği ve ayrıca SH-SY5Y hücrelerindeki diğer ajanlar (RA ve TPA) tarafından uyarılmış farklılaştırmayı da teşvik ettiği gösterilmiştir (Raghunath ve ark., 2000). Bir diğer çalışmada ise glia kökenli bir faktör olan kolesterol ve RA ile SH-SY5Y hücreleri nöronal farklılaştırma prosedürüne tabii tutularak ciddi anlamda akson uzaması ve hücreden hücreye iletişim oluşumu gözlemlenmiştir (Sarkanen ve ark., 2007). Bu oluşum sinaptik keseciklerin kolesterolca zengin membran yapılarından meydana gelmesi ile de örtüşmektedir.



**Şekil 1.4.** SH-SY5Y hücre hattının PH çalışmalarında farklılaştırılarak ya da farklılaştırılmadan kullanıldığı çalışmalara ilişkin dilim grafiği (Xicoy, Wieringa, & Martens, 2017).

Görüldüğü üzere pek çok farklı ajan kullanılarak nöronal farklılaştırma protokolü gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 1.4). Tüm bu farklılaştırma protokollerinin detaylarına literatürden ulaşılabilir olunmasına rağmen, SH-SY5Y hücreleri ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda (>%80) farklılaştırılmamış hücreler kullanılmıştır (Xicoy ve ark., 2017). Farklılaştırma protokolleri arasında en çok tercih edilen yöntem RA ile farklılaştırma yöntemidir. RA, konsantrasyon olarak 5 µM ile 100 µM arasında, 1 ile 21 gün arasında bir süre boyunca ve bazı durumlarda ortamdaki serum konsantrasyonu kademeli olarak azaltılarak uygulanmaktadır. RA ile farklılaştırma yöntemini ikinci sırada TPA ile farklılaştırma yöntemi takip etmektedir. Genellikle, 10 µM RA ile farklılaştırılan hücreler ardından, 80 nM TPA ile muamele edilmektedir (Şekil 5). Üçüncü sırada ise 10 µM RA ile sıralı uygulama şeklinde 10-100 ng/mL BDNF kullanımı gelmektedir. Bunların yanı sıra, yukarıda bahsedilmiş olan diğer farklılaştırma ajanları da birbirleriyle kombinasyon halinde farklılaştırma protokolleri içerisinde kullanılmaktadır.

Farklılaştırma protokolü seçilirken dikkat edilmesi gereken en önemli husus farklılaştırmayı tetikleyecek doğru ajanın amaca uygun seçilmesidir. Farklılaştırılan hücrelerin ne tür bir fenotipe sahip olacağı ve çalışmanın sonucunu hangi yönde etkileyeceği iyi kavranmalıdır. Özellikle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin hangi nörodejeneratif hastalıkta model

olarak kullanılacağı mutlaka dikkate alınmalıdır. Örneğin, bazı farklılaştırma protokolleri SH-SY5Y hücrelerinin PH'da kullanılmak üzere farklılaşmasını tetiklemektedir (Xie ve ark., 2010). Çünkü PH'da kullanılacak hücrelerin proliferasyonun durması, daha fazla dopaminerjik nöronal özelliğe sahip olması ve primer nöronlar gibi nörotoksinlere ve nöroprotektif ajanlara benzer duyarlılık göstermesi istenmektedir. Dolayısıyla hangi farklılaştırma ajanının seçileceği çalışmanın en başında planlanırken detaylıca araştırma yapılmalıdır.

### 1.10. Nöronal Markörler

SH-SY5Y hücrelerinin nöronal olarak farklılaştırılmasının bu hücrelerin nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinde kullanılabilmesi açısından gerekli olduğu yukarıdaki bölümlerde tartışılmıştır. Çeşitli farklılaştırma ajanları kullanılarak farklı fenotipe nöronların elde edildiği artık bilinmektedir. *In vivo* ortamda farklılaşma esnasında hücreler özelleşme gerçekleştiği için pek çok proteininin ekspresyonu regülasyona uğramaktadır. Dolayısıyla *in vitro* modelleme çalışmalarında bir sonraki adıma geçilebilmesi için elde edilen nöronların çeşitli nöronal markörler kullanılarak karakterize edilmesi gerekmektedir. İstenilen nöronal fenotipe uygun nöronal markörler seçilerek farklılaştırılan hücreler ile farklılaştırılmayan hücrelerin mukayese edilmesi şarttır. Tablo 1.5'te bazı nöronal farklılaşma markörleri verilmektedir. Bu tez çalışmasında daha çok PH ile ilişkili dopaminerjik nöron markörleri karakterizasyon amaçlı kullanılmıştır.

**Tablo 1.5.** Bazı nöronal farklılaşma markörleri ve bu markörlerin hücre içi görevleri.

Nöronal Farklılaşma Markörleri	Görevleri	Lokalizasyonları
Nestin	Nestin bir tip VI ara filament proteindir ve olgun hücrelerde ekspres olmaz.	Sitoplazma
Nörojenik farklılaşma 1, NeuroD1	NeuroD1, 'heliks-halka-heliks' transkripsiyon	Çekirdek

	faktörüdür ve nöronal olgunlaşma ve nörit uzamasında rol oynamaktadır.	
Nöronal çekirdekler, NeuN, (RBFox3)	NeuN, bir nöronal nükleer proteindir ve olgun nöronlarda eksprese olmaktadır.	Çekirdek
Dopamine Transporter, DAT, (SLC6A3)	DAT, dopaminin hücre zarı boyunca taşınmasında rol oynamaktadır ve yalnızca dopaminerjik nöronlarda eksprese olmaktadır.	Hücre zarı
Tirozin Hidroksilaz, TH	TH, katekolaminerjik yolakta hız sınırlayıcı adımı katalize etmektedir. Bu durum TH'yi dopaminerjik nöron markörü yapmaktadır	Sitoplazma
Sinaptofizin, SypI	SypI, nörotransmitterleri depolayan ve serbest bırakan sinaptik veziküller için kullanılan bir markördür.	Hücre Zarı
Dopamin Reseptör D2, DRD2	DRD2, katekolaminerjik yolakta görevlidir.	Hücre Zarı
Mikrotübül ile ilişkili protein 2, MAP-2	MAP-2, bir nöronal sitoskeletal fosfoproteindir ve nöronal polarite markörüdür.	Sitoplazma

Nöron spesifik markör, NSE	NSE, çoğunlukla nöronal sitoplazmada bulunan bir glikolitik enzimdir.	Sitoplazma
Nörogenin	Nörogenin, bir transkripsiyon faktörüdür ve sinir dokusunun oluşumunu indüklemektedir.	Çekirdek
Nükleer reseptöre bağlı 1 protein, Nurr1, (NR4A2)	Nurr1, mezo-diensefalik dopaminerjik (mdDA) nöronların farklılaşması ve sürdürülmesi için önemlidir	Çekirdek
Tau	Tau, mikrotübül stabilitesini artırır ve nöronal polarite markörüdür.	Sitoplazma
Beta Tübülün III, $\beta$ III-tübülün	$\beta$ III-tübülün, tübülünlerin nöronlara özel olan grubudur ve nöronal hücre farklılaşmasının erken evresi için markör olarak kullanılmaktadır.	Sitoplazma
Laminin	Laminin, nöronal hayatta kalma, farklılaşma ve nörit büyümesinde rol oynamaktadır	Bazal Membran
Büyümeye Bağlı Protein 43, GAP-43, (Neuromodulin)	GAP-43, bir presinaptik fosfoproteindir ve nöronal gelişimde rol oynamaktadır.	Hücre zarı
Nörofilamentler, NF	NF, nöronların sitoplazmasında bulunan tip IV ara filamentler olarak sınıflandırılmaktadırlar.	Sitoplazma

Nestin bir tip VI ara filament proteinidir. Bu ara filament proteinleri çoğunlukla sinir hücrelerinde ifade edilerek aksonların radyal büyümesinde rol oynarlar (Michalczyk & Ziman, 2005). Nestin esas olarak nöro epitel kök hücrelerde (öncüler) eksprese edilmektedir. Nestin olgun hücrelerde eksprese olmaz ve terminal nöronal hücre farklılaşması bu proteinin ekspresyonunun azalması ile ilişkilidir (Duggal & Hammond, 2002).

Nörojenik farklılaşma 1, NeuroD1, beyinin farklı bölümlerinde farklı düzeylerde ifade edilen bir 'sarmal-dönüş-sarmal' transkripsiyon faktörüdür. NeuroD1, nöronal olgunlaşma ve nörit uzamasında rol oynamaktadır (Lai ve ark., 2020). NeuroD1 post mitotik hücrelerde eksprese olmaktadır (Lee ve ark., 1995). Ayrıca çekirdekte lokalize olmaktadır.

Nöronal çekirdekler, NeuN (RBFox3), proteini omurgalılar için özgün bir nöronal nükleer proteindir ve sinir dokusunda ifade edilmektedir. Yani, NeuN proteini olgun nöronlarda eksprese olmaktadır (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). NeuN ayrıca, adından da anlaşılabilirdiği üzere, çekirdekte lokalize olmaktadır.

Dopamine Transporter, DAT (SLC6A3), merkezi sinir sistemindeki dopamin homeostazını korumaktadır. DAT sadece dopaminerjik nöronlarda eksprese olmaktadır ve SNpC'da ifadesi yüksek seviyelerdedir (Storch, Ludolph, & Schwarz, 2004). DAT sinir terminallerinin plazma membranında bulunmaktadır Dolayısıyla, sinaptik dopamini nöronlara alarak dopaminin zar boyunca taşınmasında rol oynamaktadır (Chen & Reith, 2000).

Nükleer reseptöre bağlı 1 protein, Nurr1 (NR4A2), çekirdek reseptör süper ailesinde yer alan bir 'orphan' reseptördür. Ayrıca orta beyin dopaminerjik nöronlarının spesifikasyonunda da rol oynamaktadır (Sakurada, Ohshima-Sakurada, Palmer, & Gage, 1999). Nurr1 çekirdekte lokalize olmaktadır.

Tirozin hidroksilaz, TH, dopamin ve diğer katekolaminlerin sentezindeki hız sınırlayıcı adımı katalize etmektedir. Bu durum TH'yı dopaminerjik nöron markörü yapmaktadır (Gates, Torres, White, Fricker-Gates, & Dunnett, 2006). Hücre içi seviyede, TH, küçük ve noktasal yapılarda bulunmaktadır (Hashemi, Li, Ahlman, & Dahlstrom, 2003).



Sinaptofizin, SypI, integral membran glikoproteindir. Nörotransmitterleri depolayan ve serbest bırakan sinaptik veziküller için kullanılan bir markördür. Dolayısıyla varlığı nöronların ve nöroendokrin hücrelerinin tipik salgı aktivitesini göstermektedir (Gaardsvoll, Obendorf, Winkler, & Bock, 1988).

Dopamin Reseptör D2, DRD2, orta beyin, kaudat ve limbik sistemin nöronlarında eksprese olmaktadır (Nestler & Aghajanian, 1997). Dopaminerjik yolak için gereklidir.

Mikrotübül ile ilişkili protein 2, MAP-2, bol miktarda bulunan bir nöronal sitoskeletal fosfoproteindir. MAP-2 tübüline bağlanmaktadır ve mikrotübülleri stabilize etmektedir. MAP-2 nöronal morfolojinin geliştirilmesi ve sürdürülmesi, hücre iskeleti dinamiği ve organeller arası trafik için gereklidir (Binder, Frankfurter, & Rebhun, 1985). MAP-2 bir nöronal polarite markörüdür (Encinas ve ark., 2000).

Tau, çeşitli hastalıklarla ilişkili heterojen bir mikrotübül stabilize edici proteinler grubudur. Normal bir beyinde Tau nöronların aksonlarında lokalizedir (Wood, Mirra, Pollock, & Binder, 1986). Tau da bir nöronal polarite markörüdür (Encinas ve ark., 2000).

Beta Tübülün III,  $\beta$ III-tübülün, tübülünlerin nöronlara özel olan bir grubudur.  $\beta$ III-tübülün, farklılaşma ve azalan proliferasyon markörüdür (Katselos, Legido, Perentes, & Mork, 2003).

Laminin, bazal membranın glikoprotein ana bileşenidir. Laminin; nöronal hayatta kalma, farklılaşma ve nörit büyümesinde rol oynamaktadır (Timpl & Brown, 1994).

Nörogenin bir transkripsiyon faktörüdür. Nörogenezi indüklemektedir ve nöral kök hücrelerin astrositlere farklılaşmasını engellemektedir (Ma, Kintner, & Anderson, 1996).

Nöron spesifik enolaz, NSE, çoğunlukla nöronal sitoplazmada bulunan bir glikolitik enzimdir. NSE, merkezi sinir sistemi nöronlarının geniş spektrumunda nörotrofik ve nöroprotektif özelliklere sahiptir. NSE, kalsiyuma bağımlı bir şekilde, kültüre edilmiş neokortikal nöronlara bağlanarak hayatta kalmalarını teşvik etmektedir (Encinas ve ark., 2000).

Büyümeye Bağlı Protein 43, GAP-43 (Neuromodulin), bir presinaptik fosfoproteindir. GAP-43, nörogelişim, plastisite ve yaralanma tepkisinde rol oynamaktadır. GAP-43, Protein kinaz C (PKC) için temel bir substrattır. Ayrıca, kalmodulin ve GTP-bağlayıcı proteinlerle etkileşmesiyle birçok hücre içi mesajlaşma sistemini etkilemektedir (Eastwood, 2004).

Nörofilamentler (NF), nöronların sitoplazmasında bulunan tip IV ara filamentler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Nörofilamentlerin ifadeleri genellikle nöronal markör olarak kullanılmaktadır (Chiu, Feng, Chan, Padin, & Federoff, 1995).

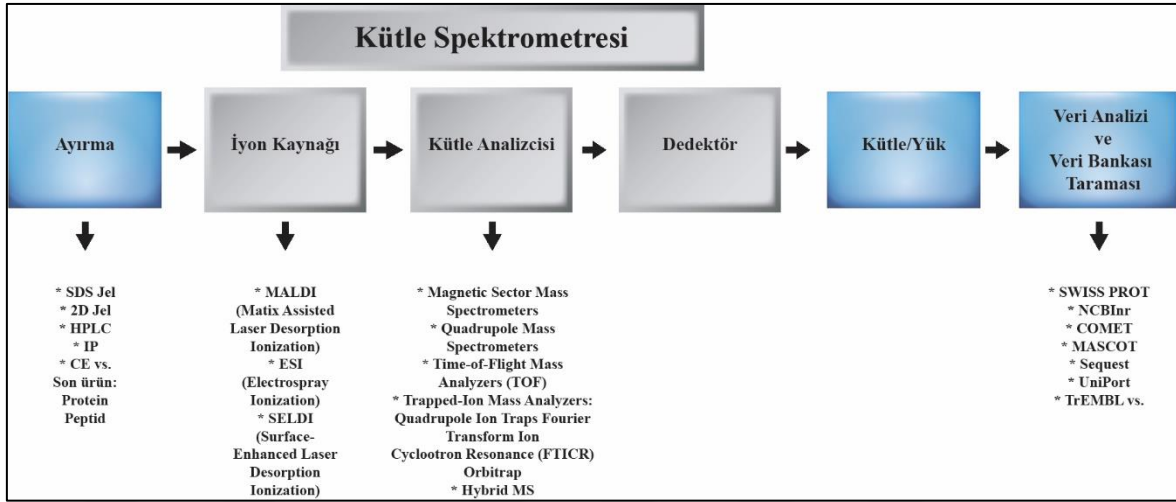
Görüldüğü üzere pek çok nöronal markör mevcuttur. Nörodejeneratif hastalıkların modellenmesi için farklılaştırılarak ya da farklılaştırılmadan kullanılacak olan hücrelerin bu markörlerin çoğunu mümkün olduğunca eksprese ediyor olmaları beklenmektedir.

### **1.11. Farklılaştırılan SH-SY5Y Hücre Hattı ile Gerçekleştirilen Proteomik Çalışmaları**

Biyoteknoloji alanında, gelişen teknoloji sayesinde, pek çok hastalığın moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu bağlamda 'omiks' çalışmaları ile karmaşık sistemleri bütüncül bir bakış açısıyla ele almak mümkün olmaktadır.

Proteomik, proteinlerin hem yapısının hem de işlevinin çeşitli yöntemlerle incelenmesidir. Başlangıçta 'genomik'in protein tamamlayıcısı olarak önerilse de son zamanlarda proteomun daha işlevsel bir önem taşıdığı bilinmektedir (Blackstock & Weir, 1999; Tyers & Mann, 2003). Proteomik, global bir bakış açısıyla proteinlerin araştırılmasını mümkün kılmaktadır. Böylece yeni moleküler mekanizmalar ve terapötik stratejiler belirlenebilmektedir. Ayrıca, proteomik çalışmaları fizyolojik ve/veya patolojik durumları bilinen ya da tahmin edilen genlerle ilişkili yeni ve/veya hipotetik proteinlerle bağdaştırabilmektedirler (Vercauteren, Arckens, & Quirion, 2007). Proteomik araştırmalarındaki ilk basamak uygun bir modelin veya bir biyobelirteç keşif stratejisinin belirlenmesidir. Ardından, konuya uygun örnek seçilerek protein özütü elde edilir. Proteinlerin ya da peptitlerin kütle analizinden önce ayırma tabii tutulmaları gerekir. Bu aşamayı kütle spektrometresi takip eder. Son olarak, hipotez veri analizi değerlendirmesiyle sonuçlanır (Şekil 1.5). Proteomik çalışmaları; genomik, transkriptomik, biyoinformatik ve

biyoistatistik ile entegrasyon halinde modern moleküler tıp için vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir (Ostrowski & Wyrwicz, 2009).



**Şekil 1.5.** Kütle spektrometresi ile protein analizi (Kısaltmalar: SDS; Sodyum Dedosil Sülfat, 2D; İki Boyutlu, HPLC; Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, IP; İmmunopresipitasyon, CE; Kapiler Elektroferez, TOF; Uçuş Zamanı, MS; Kütle spektrometresi) (Kasap ve Akpınar, 2011).

Nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmalarının anlaşılabilmesi, tanı ve tedavide kullanılabilecek aday moleküllerin keşfedilebilmesi için proteomik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, nörotoksisite çalışmaları ile edilen deneysel hastalık sendromlarındaki ve/veya hücrel modellerdeki genetik modifikasyonlar sonucu oluşan proteom düzeylerindeki farklılıklar global olarak analiz edilmektedir. Farklılaştırılan nöroblastoma hücreleri, özellikle SH-SY5Y hücreleri, ile gerçekleştirilen proteomik çalışmalarının temeli 2007 yılına dayanmaktadır. SH-SY5Y hücreleri ile yapılan çalışmalar nörodejeneratif hastalıklarda, özellikle PH, nörodejenerasyonla ilişkili olabilecek farklı proteinleri ve fonksiyonel kategorileri ortaya çıkartmıştır.

Bir çalışmada, SH-SY5Y hücreleri kullanılarak rotenon kaynaklı oksidatif stres ile PH modeli oluşturulmuş ve bu hücrelerden kapiller sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) ile proteomik analizler yapılmıştır (Bauereis, Haskins, Lebaron, & Renthal, 2011). Bir başka çalışmada ise, 2-DE teknolojisinden yararlanılarak, SH-SY5Y hücre hattında bozulan dopamin hemostazisi ile DJ-1 izoformları arasında ilişki

olup olmadığı incelenmiştir (Alberio, Colapinto, ve ark., 2010). Aynı grubun bir başka çalışmasında da bozulan dopamin homeostazisi modeli sergileyen SH-SY5Y hücrelerinde, 2-DE teknolojisinden yararlanılarak, yüksek sitosolik dopamin yüklemesi ve artmış  $\alpha$ -sinüklein ifadesi ile ilişkili biyokimyasal farklılar saptanmıştır (Alberio, Bossi, ve ark., 2010). Dört farklı grup ( $\alpha$ -sinüklein aşırı eksprese eden/etmeyen hücreler ve toksik konsantrasyonda dopamine maruz bırakılan/bırakılmayan hücreler) arasında yapılan karşılaştırma sonucunda hücre iskeleti yapısı ve düzenlenmesi, mitokondriyal fonksiyon, enerji metabolizması, protein sentezi ve nöronal plastisite gibi hücreler olaylarla ilgili 23 farklı proteinde farklılar belirlenmiştir. Nörodejeneratif hastalıkların mitokondri ile olan ilişki bilim insanlarını mitokondriyal proteom çalışmalarına doğru yönlendirmiştir. Yapılan bir çalışmada, SH-SY5Y hücreleri ve sıçan mitokondrisinde dopamin ve okside edilmiş formu olan 'reaktif dopamin kuinon' tarafından kovalent olarak modifiye edilen spesifik mitokondriyal proteinlerin proteomik analizi yapılmıştır (Van Laar, Mishizen, Cascio, & Hastings, 2009). Böylece 'reaktif dopamin kuinon'un DJ-1'i kovalent olarak modifiye ettiği saptanmıştır. Bir diğer çalışmada ise SH-SY5Y hücre modelinde mitokondriyal proteom ve mitokondri ile yakından ilişkili proteinlerdeki ekspresyon farklılıkları, artmış yabanıl tip ve A53T  $\alpha$ -sinüklein seviyelerine istinaden, 2-DE teknolojisi ile belirlenmiştir (Pennington, Peng, Hung, Banks, & Robinson, 2010). Böylece  $\alpha$ -sinüklein'in mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde önemli bir etkisi olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaların yanı sıra kullanılan modeller ile potansiyel nöroprotektif ajanların etkileri de araştırılabilmektedir. Proteomik yaklaşımlar global bir bakış açısına sahip oldukları için yeni terapötik ajanlar tarafından modifiye edilen yolaklar hakkında bize bilgi verebilmektedirler. Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmalara örnek olarak epigallokateşin 3-gallat (EGCC) çalışması gösterilebilmektedir. EGCC, bir demir şelatörüdür ve nörodejeneratif hastalıklar için aday bir terapi ajanı olarak gösterilmiştir (Weinreb, Amit, & Youdim, 2008). SH-SY5Y hücreleri ile gerçekleştirilen proteomik çalışmaları ile EGCC'nin mekanizması hakkında bilgi elde edilerek, EGCC'nin nöron kurtarma aktivitesinin altında yatan çeşitli moleküler sinyal yolları aydınlatılabilmektedir. Literatür taraması yapıldığında nöronal olarak farklılaştırılmış olan SH-SY5Y hücreleriyle de proteom çalışmalarının yapıldığı göze çarpmaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen büyük çaplı çalışmalardan birinde RA ve BDNF ile nöronal olarak farklılaştırılan SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada

farklılaştırılmayan ve farklılaştırılan SH-SY5Y hücreleri iTRAQ (Görelî ve Mutlak Nicelik için İzobarik Etiket, Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) tabanlı LC-MS/MS ve fosfopeptit zenginleştirme stratejileri kullanılarak mukayese edilmiş ve proteinlere ait farklı ekspresyon profilleri saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda; 366 tanesi görece bolluğa sahip olan 5587 protein tanımlanmıştır. Ayrıca, farklılaştırılmış hücrelerin nöronal gelişme ile ilgili proteinleri ifade ederken farklılaşmamış hücrelerin ise hücre proliferasyonunda yer alan proteinleri eksprese ettiği belirlenmiştir (Murillo ve ark., 2017).

Sonuç olarak, SH-SY5Y hücreleri ile gerçekleştirilen proteomik çalışmalarının nörodejeneratif hastalıklar açısından oldukça önemli olduğu anlaşılmaktadır. Son zamanlarda, nöronal olarak farklılaştırılan hücrelerin proteom analizlerinin gerçekleştirilebilmesi sayesinde de nöronal farklılaşma mekanizmasında rol oynayan proteinler saptanarak yeni terapötik yaklaşımlara ışık tutulmaktadır. Literatürde var olan çalışmalar detaylı olarak incelendiğinde SH-SY5Y hücrelerinin nörojenik farklılaştırma sürecinde PH ile ilişkili protein ve gen seviyelerindeki değişikliklerin süreç boyunca nasıl değiştiğinin araştırılmadığı görülmektedir. Bu tip bir bilginin açığa çıkartılması, SH-SY5Y hücre modelinin nörodejeneratif hastalıklar için ne derece doğru bir model olup olmadığının anlaşılmasına da yardımcı olacaktır.

## 2. AMAÇ

Nörobilimle uğraşan bilim insanlarının yaşadığı en büyük zorluklardan birisi çalışmak istedikleri insan beyin dokusuna işlevsel halde iken ulaşamamalarıdır. Bu nedenle insan beynini veya hücrelerini taklit edebilecek deneysel modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu modeller arasında hayvan modelleri ve hücre modelleri başı çekmektedirler. Hücre kültüründe büyütülen hücreler en basit modeller olmalarına karşın hücresel moleküler yollar arasındaki ilişkilerin ortaya çıkartılması ve nöronal hücre fizyolojisi hakkında bilgiler edinilmesi açısından oldukça değerlidirler (Kasap vd., 2017). Ayrıca hücre kültüründe yapılan deneylerin kontrollü olarak tekrar edilebilir olması ve elde edilen verilerin yorumlanmasının da göreceli olarak daha kolay olması bu model sistemlerini önemli kılmaktadır. Bu açıdan primer hücre ve kök hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar doğrudan ilgili organizmalardan elde edildikleri için önemlidirler. Ancak bu hücrelerin elde edilmelerindeki ve karakterizasyonlarındaki zorlukların yanında monoklonal bir popülasyondan gelmemeleri model olarak kullanımlarını kısıtlamaktadır. Buna karşın, kolay üretilen ve aynı genetik altyapıya sahip monoklonal özellikler taşıyan kanserleşmiş hücre modelleri çok daha kullanışlıdır. Bu hücreler arasında, bu tez projesinin de konusu ve hücre modeli olan, SH-SY5Y hücreleri birçok laboratuvar tarafından kullanılmaktadır.

SH-SY5Y hücreleri 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliği dokusuna sıçramış SK-N-SH hücrelerinden elde edilen bir alt klondur. Bu hücrelerin en önemli özellikleri olgunlaşmış nöron benzeri hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyellerinin olmasıdır. Hatta kullanılan farklılaştırma ajanlarına göre adrenerjik, kolinerjik veya dopaminerjik nöronlara dahi dönüşebilmektedirler. Bu ve benzer özelliklerinden dolayı SH-SY5Y hücreleri nörobilim çalışmalarının en sık tercih edilen hücreleri olmuşlardır.

Yapılan araştırmalarda bu hücrelerin farklılaşmış ve farklılaşmamış halleri arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Örneğin; farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri hızla çoğalan ve morfolojik olarak polarize olmayan, hücre kümeleri oluşturan, olgunlaşmamış nöron markörleri ifade edebilen hücreler iken, farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri çoğalma kapasiteleri düşük, polarize olan ve olgun nöronlarda bulunan markörleri ifade eden (GAP-43, NeuN, SYN, SV-2 ve NSE gibi) hücrelerdir. Bu hücreler ayrıca, olgun dopaminerjik

nöronlardaki gibi, nöronal farklılaşma sonrasında ATP ve plazma membran aktivite seviyelerinde artış ile mitokondriyal zar potansiyelinde azalış sergilemektedirler.

Maalesef, SH-SY5Y hücrelerinin PH modeli olarak kullanıldığı çalışmaların çoğunda bu hücreler farklılaştırılmadan doğrudan kullanılmışlardır. Laboratuvarımızda da daha önce yapılan çalışmalarda bu hücreler farklılaştırılmadan PH modeli olarak kullanılmıştır. Oysaki PH'da bozulan dopaminerjik nöronların özellikle artan enerji stresine karşı göstermiş oldukları duyarlılık düşünülecek olunursa, farklılaştırılarak kullanılacak olan SH-SY5Y hücrelerinin PH çalışmalarına uygunluğu bir kez daha anlaşılmış olacaktır. Farklılaşmamış hücrelerin nörojenik çalışmalarda kullanılmasının en temel nedenlerinden birisi; basit bir besiyerinde dahi kolaylıkla çoğalabilmeleridir. Bunun yanında, SH-SY5Y hücreleri ile yapılan çok sayıda çalışmanın olması elde edilen verilerin karşılaştırmalı analizine imkân tanımaktadır. SH-SY5Y hücrelerine ait hem genomik hem de proteomik seviyede yeterli miktarda detayı literatürde bulmak mümkündür. Nörojenik farklılaştırmaya tabi tutulmuş SH-SY5Y hücrelerinde, farklılaştırılmamış hücrelere oranla (1) oksidatif strese cevap veren gen ekspresyon seviyelerinde azalma (2) hücre zar aktivitesinde artış (3) ATP seviyelerinde yükseliş ve (4) mitokondriyal zar potansiyelinde düşüş gözlemlenmiştir. Tüm bu farklılıklar göz önüne alındığında farklılaştırmanın oksidatif strese dirençli bir hücre tipini oksidatif strese dirençsiz ve aşırı enerji ihtiyacı olan nöron benzeri bir hücre tipine çevirdiği söylenebilir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklılaşma süreci biyokimyasal düzeyde karakterize edilmiştir. Özellikle hücre morfolojisindeki değişimler ile mitokondriyal ve hücre zar potansiyellerindeki değişimler incelenmiştir. Ancak bu çalışmalarda farklılaşma süreci boyunca gen ve protein ifade seviyelerindeki değişimler belirlenmemiş ve bu nedenle de sürece ait global bir bilgi edinilememiştir.

Kısaca ifade etmek gerekirse bu tez projesinin amacı:

(1) Nöronal farklılaştırmaya tabi tutulmuş SH-SY5Y hücrelerinde SNCA, PARK2, DJ-1, PINK-1 ve LRRK2 genlerinin ifade seviyelerindeki değişikliklere hem mRNA hem de protein düzeyinde bakmak ve (2) protein düzeyinde meydana gelen değişimleri daha geniş bir ölçekte görebilmek için proteom analizleri yapmaktır. Böylece farklılaşmış ve

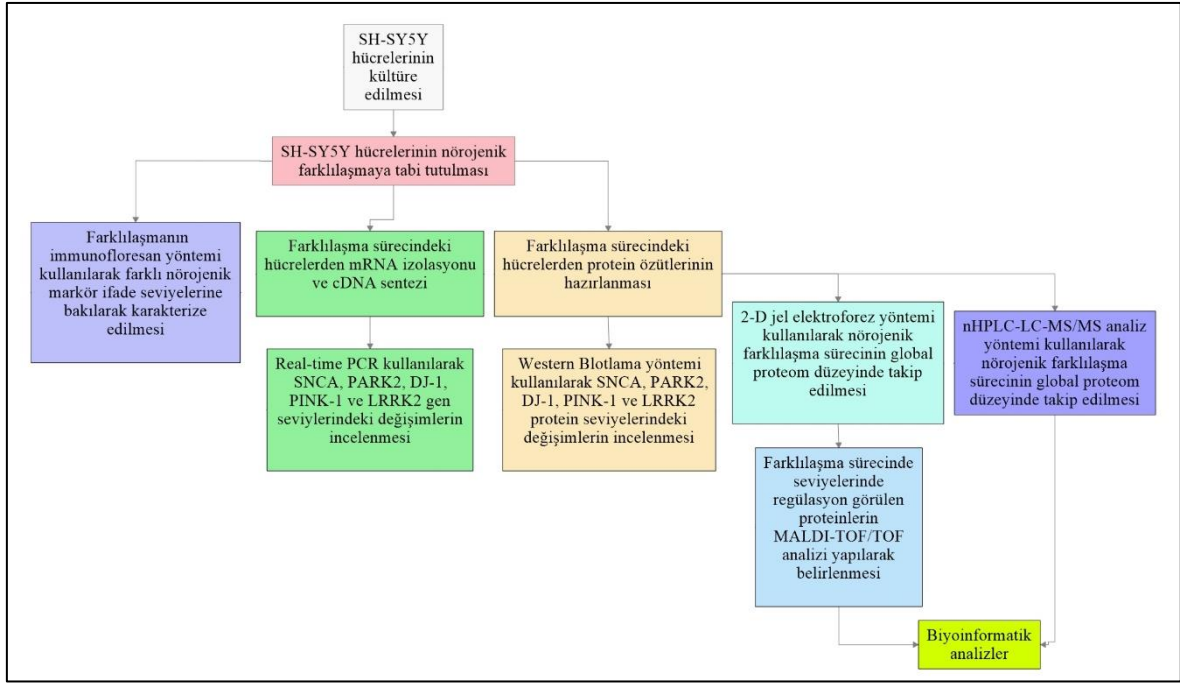
farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinden hangisinin PH modeli olarak daha kullanışlı olacağı hem mRNA hem de protein seviyesinde ortaya konularak literatüre kazandırılması hedeflenmiştir.





### 3. YÖNTEM

Nöronal olarak farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde, SNCA, PARK2, DJ-1, PINK-1 ve LRRK2 genlerinin ifade seviyelerindeki değişikliklere hem mRNA hem de protein düzeyinde bakmak ve protein düzeyinde meydana gelen değişimleri daha geniş bir ölçekte görebilmek için oluşturmuş olduğumuzu akış şeması aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Projede gerçekleştirilen deneylere ait yöntemsel akış şeması.

#### 3.1. Nöroblastoma Hücrelerinin (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırılması

SH-SY5Y hücrelerini kültüre ederken ve farklılaştırırken kullanılan kimyasal ajanlar aşağıdaki tabloda verilmektedir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Hücre kültüründe kullanılan kimyasal ajanlar.

<b>Kimyasallar</b>	<b>Katalog Numarası (Katalog No.)</b>
DMEM Earle's	Biochrome, UK, Katalog No: FG 1445
DMEM (w\o sodyum piruvat)	Multicell, Katalog No: 319-015-CL
Nörobazal Besiyeri	Life Technologies, Katalog No: 21103-049
FBS	Capricorn Scientific FBS-11B
Penisilin/Streptomisin	Biochrome, Katalog No: A 2212
L-Glutamin	Biochrome, Katalog No: K 0282
Tripsin/ EDTA	GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 25200-072
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Applichem, Katalog No: A1584
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Biochorome, Katalog No: L 1825
Ekstraselüler Matriks (ECM)	Sigma-Aldrich, Katalog No: E0282
Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF)	Cell Signaling Technology, Katalog No: 3897
All-trans-retinoik asit (RA)	Enzo-East Farmingdale, Katalog No: BML-GR100
B-27	ThermoFisher Scientific, Katalog No: 17504-044
GlutamaxI	Life Technologies, Katalog No: 35050-061
Dibütiril siklik adenozin monofosfat (dbcAMP)	Sigma-Aldrich, Katalog No: D0627

### **3.1.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Çözülmesi ve Kültüre Edilmesi**

SH-SY5Y hücreleri laboratuvarımızda rutin olarak kullanmakta olduğumuz hücrelerdir. Bu nedenle bu hücrelerden stoklar halinde sıvı azot tanklarımızda bulunmaktadır. SH-SY5Y

kültürlerini başlatabilmek için azot tanklarından aldığımız hücreler 37 oC’de bir su banyosu içerisinde hızlı bir şekilde çözüldükten sonra 15 ml’lik bir falkon tüpte bulunan FBS’ce zengin (%20) besi ortamı üzerine eklendi (EMEM) ve ardından 4000 x g’de santrifuj edilerek çöktürüldü. Çöken hücreler üzerine taze besi yeri ilave edilerek (EMEM, %10 ısı ile inaktif hale getirilmiş FBS, 1X Penisilin/Streptomisin, 2 mM Glutamin) hücreler süspanse edildi ve tüplerden T-25 hücre kültür kaplarına aktarıldı. 37 oC ve %5’lik CO2’li ortamda çoğalmaya bırakılan hücrelerin 3-5 gün içerisinde kendilerini toparlamaları ve pasajlanmaya hazır hale gelmeleri beklenildi.

### **3.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması**

Hücreler %70-80 doluluk oranına (confluency) ulaştıkları zaman pasajlandı. Hücreleri pasajlayabilmek için besiyeri boşaltılıp, hücreler 10 ml 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı. Ardından, PBS ortamdan uzaklaştırılarak 2.5 ml %0.25 Tripsin/EDTA (1X) ortama eklendi. 2-3 dakika Tripsin muamelesinin ardından 10 ml Temel Büyütme Besiyeri (EMEM, %15 ısı ile inaktif hale getirilmiş FBS, 1X Penisilin/Streptomisin, 2 mM Glutamin) ortama eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml’lik tüplerde toplanarak 2 dakika boyunca 1000 x g’de santrifuj edildi. Son olarak, üst sıvı kısmı boşaltılmış olan hücreler Temel Büyütme Besiyeri ile karıştırılarak, 1:3-1:5 dilüsyon oranları ile yeni T-75 kültür kaplarına ekildi.

### **3.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması**

Hücreler Temel Büyütme Besiyeri ve Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde donduruldular. PBS ile yıkanan hücrelere 2.5 ml %0.25 Tripsin/EDTA eklendi ve 2-3 dakika boyunca 37°C’de etüvde inkübe edildi. Süre sonunda ortama 10 ml PBS eklenerek kültür tabaklarından ayrıştırılan hücreler steril 15 ml’lik tüplere alındı ve +4°C’de 1000 x g’de 10 dakika boyunca santrifuj edildi. Üst kısmı dökülen hücrelere 100 µl DMEM eklenerek çözüldükten sonra 1 ml ‘Dondurma Besiyeri’ eklendi. Ardından kriyo tüplerine alınmış olan hücreler ‘Mr. Frosty’ kabı içerisinde bir gece boyunca -80 °C’de bekletilerek sıvı azot tankına muhafaza edilmek üzere aktarıldı.

### 3.1.4. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörojenik Farklılaşma İşlemine Tabi Tutulması

SH-SY5Y hücreleri, ilk olarak, Shipley, Mangold ve Szpara (2017) makalesinde tanımlandığı gibi nöronal farklılaşmaya tabi tutuldu. Ancak çeşitli kısıtlamalar dolayısı ile farklılaştırma protokolü revize edilmiye çalışıldı (bu konunun detayları ‘Bulgular’ kısmında yer almaktadır, Bkz. 4.1). Encinas ve ark. (2000), Kovalevich ve ark. (2013), Shipley ve ark. (2017) ve Forster, Köglsberger, Trefois, Boyd, Baumuratov, Buck, Balling ve Antony (2016) makalelerinden geliştirilen yeni ve laboratuvarımıza ait bir farklılaştırma protokolü ile SH-SY5Y hücreleri farklılaşmaya tabi tutuldu. Farklılaşma sürecinin 9 gün olarak belirlendiği protokole ait kullanılan besiyerlerinin içerikleri (Tablo 3.2) ve aşamaların detayları aşağıda verilmektedir.

**Tablo 3.2.** Farklılaşma sürecinde kullanılan besiyerlerinin içerikleri.

BESİYERİ	HACİM (5 ml)
<b>Temel Büyüme Besiyeri</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 4.75 ml, yüksek glukoz içerikli Sodyum Piruvatsız DMEM</li><li>• 250 µl, %5 hiFBS (ısı ile inaktive edilmiş)</li><li>• 100 µl, 1X Pen/Str.</li><li>• 100 µl, 2 mM Glutamin (eğer DMEM L-Glutamin içermiyorsa)</li></ul>
<b>Farklılaşma Besiyeri #1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 4.8 ml, yüksek glukoz içerikli Sodyum Piruvatsız DMEM</li><li>• 125 µl, %2.5 hiFBS (ısı ile inaktive edilmiş)</li><li>• 50 µl, 1X Pen/Str.</li><li>• 10 µl, 10 µM RA (Retinoik Asit)</li><li>• 50 µl, 2 mM Glutamin (eğer DMEM L-Glutamin içermiyorsa)</li></ul>

<p style="text-align: center;"><b>Farklılaşma Besiyeri #2</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4.9 ml, yüksek glukoz içerikli Sodyum Piruvatsız DMEM</li> <li>• 50 µl, %1 hiFBS (ısı ile inaktive edilmiş)</li> <li>• 50 µl, 1X Pen/Str.</li> <li>• 10 µl, 10 µM RA (Retinoik Asit)</li> <li>• 50 µl, 2 mM Glutamin (eğer DMEM L-Glutamin içermiyorsa)</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Farklılaşma Besiyeri #3 (w/o RA)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4.7 ml, Nörobazal Besiyeri</li> <li>• 100 µl, 1X B-27</li> <li>• 100 µl, 20 mM KCl</li> <li>• 50 µl, 1X Pen/Str.</li> <li>• 50 µl, 2 mM GlutamaxI</li> <li>• 2.5 µl, 50 ng/ml BDNF</li> <li>• 10 µl, 2 mM db-cAMP</li> </ul>

0. Gün: SH-SY5Y hücreleri yaklaşık %80 doluluk oranına erişinceye kadar büyütüldü. T-75 kültür kaplarındaki hücreleri pasajlamak için yaklaşık olarak 2.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA (1X) kullanıldı. Ardından, hücreler 2-3 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. 10 ml Temel Büyüme Besiyeri tripsini inhibe etmek için petrilere eklenerek süspansiyon edildi ve hücreler 2 dakika boyunca 1000xg'de santrifüj edildi. Son olarak, pelletteki hücreler 35 mm<sup>2</sup> petrilere ekildi.

1. Gün: Farklılaşma Besiyeri #1 kullanılarak dikkatlice hücrelerin besiyeri değiştirildi. Bu aşamada PBS kullanılmadı.

2. Gün: Nöronal farklılaşma için beklenildi ve başka bir işlem yapılmadı.

3. Gün: Farklılaşma Besiyeri #2 kullanılarak dikkatlice hücrelerin besiyeri değiştirildi. Bu aşamada PBS kullanılmadı.

4. Gün: ECM kaplı petripler hazırlandı.

5. Gün: İlk olarak eski besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Bu aşamada PBS kullanılmadı. 35 mm<sup>2</sup> petripler için yaklaşık olarak 200 µl %0.05 Tripsin-EDTA (1X) kullanılarak hücreler pasajlanmak üzere kaldırıldı. Ardından, hücreler 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. 2 ml Farklılaşma Besiyeri #2 kullanılarak tripsin inaktive edildi ve besiyeri kalan nöronal hücreleri petriden toplamak için kullanıldı. Her bir petrideki besiyeri ve hücre süspansiyonları 50 ml'lik tüplerde toplandı ve 10 ml'lik plastik pipet yardımı ile yavaşça (beş defayı geçmeyecek şekilde) karıştırıldı. Bu aşamada santrifüj kullanılmadı. Daha sonra, 2 ml hücre süspansiyonları ECM kaplı 35 mm<sup>2</sup> petrilere ekildi ve petripler inkübatöre kaldırıldı.

6. Gün: Hücrelerin ECM kaplı kültür kaplarına tutunması için beklenildi ve başka bir işlem yapılmadı.

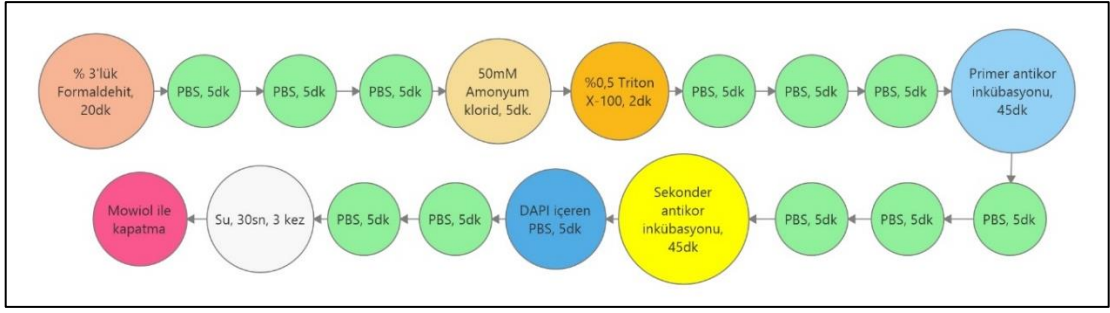
7. Gün: Farklılaşma Besiyeri #3 (Retinoik Asitsiz) kullanılarak dikkatlice hücrelerin besiyeri değiştirildi. Bu aşamada PBS kullanılmadı.

8. Gün: Nöronal farklılaşma için beklenildi ve başka bir işlem yapılmadı.

9. Gün: Farklılaşma protokolü sonucu nöronal kültürün hazır olduğundan emin olduktan sonra hücreler çalışılmak üzere hazırlandı.

### **3.2. Nöroblastoma Hücrelerinin (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırılması**

Nörojenik farklılaştırma sürecinin sağlıklı olarak takip edilebilmesi için Tablo 3.3'te listesi verilen markörler ile floresan boyamalar yapıldı. Bu amaçla farklılaştırmanın yapıldığı kültür tabaklarına 'cover slip' adı verilen yuvarlak steril cam lameller konuldu. Hücreler çoğalma ve farklılaşma sırasında bu cover slipler üzerinde de büyüyüp farklılaşacağı için farklılaşma süreci aşağıdaki floresan işaretleme protokolü kullanılarak Şekil 3.2.'de gösterildiği ve aşağıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. IF boyama protokolüne ait akış şeması.

- İlk olarak cover slipler üzerinde çoğalan hücreler 20 dakika boyunca %3'lük formaldehit ile fiske edildi.
- Fiksasyonu takiben üç kez PBS ile yıkanan hücreler, oluşan radikal oksijen türlerinin baskılanması için 50 mM amonyum klorür çözeltisinde 5 dakika bekletildi, ardından PBS ile yıkandı.
- Bir sonraki aşamada, fiske olmuş hücrelerin hücre zarından antikor girişi gerçekleşebilmesi için hücreler %0.5'lik Triton X-100 çözeltisinde 2 dakika süre ile bekletildi ve PBS ile yıkanarak Triton X-100 çözeltisinin uzaklaştırılması sağlandı.
- Ardından, hücreler araştırılmak istenen nörojenik marköre ait primer antikorla 45 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkandı.
- Daha sonra, hücreler floresan boya ile işaretlenmiş olan ilgili sekonder antikorla 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Süre bitiminde hücreler PBS ile yıkandı.
- Çekirdek boyaması amacı ile hücreler 10 dakika boyunca DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyandı.
- Son olarak, önce PBS ardından saf su ile yıkanan hücreler Mowiol aracılığı ile mikroskop lamına yapıştırıldı.
- Uygun filtreler kullanılarak Olympus CKX41 mikroskobu ile çekilen resimler sayesinde nörojenik markörlerin ifade edilip edilemedikleri belirlendi.

**Tablo 3.3.** Nörojenik farklılaşmayı takip etmek için kullanılan markörlere ait primer ve sekonder antikor bilgileri.

<b>Kullanılacak Olan Nörojenik Markörlere Ait Antikorlar</b>	<b>Katalog Numarası (Katalog No.)</b>
Nestin (Primer Antikor)	Novus Biologicals, NB300-266
NeuroD1 (Primer Antikor)	Novus Biologicals, H00004760-M01
NeuN (Primer Antikor)	Novus Biologicals, NBP1-92693
Nurr1 (Primer Antikor)	ThermoFisher Scientific, #MA1-195
TH (Primer Antikor)	Novus Biologicals, NB300-109 ve ThermoFisher Scientific, #701949
Texas Red Anti Mouse (Sekonder Antikor)	Thermo Scientific, T-6390
Texas Red Anti Rabbit (Sekonder Antikor)	Thermo Scientific, T-6391

### **3.3. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yapılması**

#### **3.3.1. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi**

SH-SY5Y insan kökenli nöroblastoma hücre hattından farklılaşma süreci boyunca RNeasy Mini Kit (50), (Qiagen, ABD) kullanılarak 0., 3., 6., ve 9. günlerde alınan örnekler ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolatlarının kalitesi %1 formaldehit agaroz jel dökülerek 28S ve 18S bantları ile elde edilen RNA'ların kalitesi kontrol edildi. Daha sonra ise RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 0., 3., 6., ve 9. günlere ait cDNA sentez reaksiyonları kuruldu.



### 3.3.2. qRT-PCR Yöntemi Kullanılarak Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, PINK1, DJ-1, VPS35 ve Aktin Gen Seviyelerindeki Değişimlerin İncelenmesi

qRT-PCR deneyleri SYBR™ Green PCR Master Mix, (ThermoFisher Scientific, ABD) kullanılarak Roche Light Cycler 480 Sistemi (Roche, ABD) ile gerçekleştirildi. SYBR™ Green PCR Master Mix kitinin içerisinde kullanıma hazır bir ‘master mix’ karışımı bulunmaktadır. Bu karışımın içerisinde bulunan floresan SYBR green I boyası hedef genlere ait cDNA’ların göreceli kantitasyonunun sağlıklı bir şekilde yapılmasına yardımcı olmaktadır. Karışım içerisinde dengeli bir şekilde bulunan K<sup>+</sup> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> iyonları non-spesifik 'annealing' olaylarını minimize ederek yüksek duyarlılıkta sonuçların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu kit laboratuvarımızda rutin olarak kullanılmaktadır. Elde edilen sonuçlar ‘REST’ (Rest, gene quantification) adı verilen gen kantifikasyon programı yardımı ile analiz edilmiştir. qRT-PCR deneylerinde kullanmış olduğumuz primer çiftleri Tablo 3.4’te verilen optimize primer çiftleri olup Qiagen SABiosciences firmasından temin edilmişlerdir.

**Tablo 3.4.** qRT-PCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri.

Genin Adı	Qiagen SABiosciences RT <sup>2</sup> qPCR™ Primerleri
TH	<b>Refseq No.:</b> NM_000360 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH02062E-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human TH (200 reaksiyon için)
DDC	<b>Refseq No.:</b> NM_000790 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH19374B-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human DDC (200 reaksiyon için)
PARK2	<b>Refseq No.:</b> NM_004562 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH05959C-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human PARK2 (200 reaksiyon için)

DJ-1	<b>Refseq No.:</b> NM_007262 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH19854F-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human PARK7 (200 reaksiyon için)
PINK1	<b>Refseq No.:</b> NM_032409 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH20890B-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human PINK1 (200 reaksiyon için)
DRD1	<b>Refseq No.:</b> NM_000794 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH01857F-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human DRD1 (200 reaksiyon için)
Nurr1	<b>Refseq No.:</b> NM_006186 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH02082A-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human NR4A2 (200 reaksiyon için)
VPS35	<b>Refseq No.:</b> NM_018206 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH22095A-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human VPS35 (200 reaksiyon için)
GAPDH	<b>Refseq No.:</b> NM_001256799 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH00150F-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human GAPDH (200 reaksiyon için)
AKTİN	<b>Refseq No.:</b> (NM_001101) <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH00073G-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human Actin (200 reaksiyon için)
MAP2	<b>Refseq No.:</b> NM_001039538 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH02419A-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human MAP2 (200 reaksiyon için)

DAT	<b>Refseq No.:</b> NM_001044 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH01449A-200: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human SLC6A3 (200 reaksiyon için)
NESTIN	<b>Refseq No.:</b> NM_006617 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH02388A: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human NESTIN (200 reaksiyon için)
NEUN	<b>Refseq No.:</b> NM_001025448 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH21523B: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human RBFOX3 (200 reaksiyon için)
NEUROD1	<b>Refseq No.:</b> NM_002500 <b>Katalog No. ve Adı:</b> PPH00039E: RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human NEUROD1 (200 reaksiyon için)

### **3.4. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden Protein Özütlerinin Hazırlanması ve Örneklerin Çöktürülerek Temizlenmesi**

#### **3.4.1. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden Protein Özütlerinin Hazırlanması**

Kültür tabaklarından toplanan hücreler protein izolasyonu öncesi üç kez soğuk yıkama tamponu (10mM Tris, 250 mM sükröz) ile yıkandı. 2-DE tamponunda (BioRad, ABD) süspanse edilen hücrelerin bulunduğu ortama protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitör (Sigma Aldrich) karışımı eklendi. Laboratuvarımızda bulunan Next Advance Bullet Blender homojenizatör cihazı yardımı ile 0.2 mikrometre çelik boncuklar kullanılarak hücreler homojenize edildi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Hücrelerin Bullet Blender cihazında +4°C’de çelik boncuklar ile parçalanması.

Homojenize edilen hücrelerden proteinleri içeren sıvı kısmı elde edebilmek için +4°C’de 20.000xg’de 30 dakika santrifügasyon işlemi yapıldı ve supernatant temiz bir yeni tüpe aktarıldı. Ardından, protein örneklerinin konsantrasyonları hazırlanan ‘Bovine Serum Albumin’ (BSA) standartları ve gerekli örnek dilüsyonları kullanılarak Bradford Assay ile belirlendi (Bio-Rad, ABD). Sonrasında, elde edilmiş hücre lizatlarına ait protein profilini görmek için SDS-PAGE ön deneme çalışması yapıldı. Örnekler sıvı azotta hızlı dondurulduktan sonra -80°C’de muhafaza edildi.

#### **3.4.2. Protein Özütlerinin Çöktürülerek Temizlenmesi**

2D jel elektroforezi ve nLC-MS/MS analizleri öncesi protein örneklerinin tuzlardan, lipitlerden, deterjanlardan, nükleik asitlerden ve fenolik birleşikler gibi kirleticilerden temizlenmesi gerekmektedir. İzolasyon sonrası elde edilen süpernatanda bulunan proteinleri konsantre etmek ve temizlemek amacıyla Triklorasetik asit (TCA)/Sodyum deoksikolat (DOC)/Aseton ile protein çöktürme prosedürü uygulandı. Bu prosedür kapsamında %0,2’lik DOC birinci çöktürme ajanı olarak, %72’lik TCA ikinci çöktürme ajanı olarak, aseton ise yıkama solüsyonu olarak kullanıldı. Protein izolasyon işleminden sonra elde edilen süpernatant örneğinden 500 µg alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine

hacimce 1:1 oranında %0.2'lik DOC eklendi. Tüp nazikçe alt-üst edildikten sonra buz üzerinde 20 dakika inkübe edildi. Sonra tüp içerisine hacimce 1:1 oranında %72'lik TCA ilave edildi ve nazikçe alt-üst edildikten sonra buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Sürenin sonunda tüp +4°C'de 15,000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant dikkatlice çekildi ve uzaklaştırıldı. Oluşan pellet üzerine 1 ml soğuk saf aseton eklendi. Pellet iyice çözülene kadar vorteks yapıldı. Daha sonra tüp -20°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde her 10 dakikada bir vorteks işlemi uygulandı. İnkübasyon süresi sonrasında tüp +4°C'de 15,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüp oda ısısında 5 dakika kurumaya bırakıldı. Sonrasında tüp içindeki pellet 2D tamponu ile çözüldü.

### **3.5. Western Blotlama Yöntemi Kullanılarak Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, PINK1, DJ-1, SNCA, VPS35 ve Aktin Protein Seviyelerindeki Değişimlerin İncelenmesi**

Western Blotlama (WB) deneyleri için ilk olarak SDS-PAGE (%12 ve %8) yöntemi Laemmli metoduna göre uygulandı (Laemmli, 1970). Proteinler jellerden nitroselüloz membranlara (GE Healthcare, Chicago, IL, ABD) Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı yardımı ile aktarıldı. Membranlar %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (Tris tamponlu salin-Tween 20) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklandı. Ardından, membranlar 3 defa TBS-T ile 10 dakika boyunca yıkandı. Yıkanan membranlar, TBS-T ile uygun dilüsyonlarda hazırlanan primer antikorlarla (Tablo 3.5) gece boyu +4°C'de inkübe edildi. İkinci gün membranlar tekrar 3 defa TBS-T ile 10 dakika boyunca yıkandı. Membranlar TBS-T ile uygun dilüsyonlarda hazırlanan HRP-işaretili sekonder antikorlar (Tablo 3.6) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sürenin bitiminde membranlar tekrar 3 defa TBS-T ile 10 dakika boyunca yıkandı. Son olarak, protein bantları geliştirilmiş kemilüminesans deteksiyon sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak görüntüledi. Böylece nörojenik farklılaşma çeşitli markörler kullanılarak karakterize edilmeye çalışıldı. Deneylerde pozitif kontrol olması açısından insan beynine ait, ticari olarak satın alınan, doku lizati da kullanıldı (Novus Biologicals).

Gerekli görüldüğü durumlarda (bantlar arasındaki varyasyonları engellemek gibi), membranlar Restore™ WB stripping buffer (#21059, Thermo Scientific, ABD) ile strip edildi. Bant yoğunluklarının göreceli kantitatif değerlendirmeleri için QuantityOne (Bio-Rad, ABD) ya da ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) programlarından yararlanıldı.

**Tablo 3.5.** WB deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile pozitif kontrol bilgileri (**Tüm primer antikorlar %1 yağsız süt tozu içeren bloklama solüsyonu ile hazırlanmıştır**).

<b>WB Deneylerinde Kullanılan Primer ve Sekonder Antikorlar</b>	<b>Katalog Numarası (Katalog No.)</b>
Nestin (Primer Antikor)	Novus Biologicals, NB300-266
NeuroD1 (Primer Antikor)	Novus Biologicals, H00004760-M01
NeuN (Primer Antikor)	Novus Biologicals, NBP1-92693
Dopamine Transporter (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-32258
Nurr1 (Primer Antikor)	ThermoFisher Scientific, #MA1-195
DRD1 (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-33660
DRD2 (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-5303
TH (Primer Antikor)	Novus Biologicals, NB300-109 ve ThermoFisher Scientific, #701949
DDC (Primer Antikor)	Cell Signaling Technology, #13561
DJ-1 (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-55572
Parkin (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-32282
β-Actin (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-69879
VPS35 (Primer Antikor)	Santa Cruz Biotechnology, sc-374372

PINK1	Santa Cruz Biotechnology, sc-517353 ve Novus Biological, BC100-494
SNCA	Sigma Aldrich, #S5566
Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Sekonder Antikor)	Bio-Rad, #170-5047
Goat IgG Anti-Rabbit HRP Conjugate (Sekonder Antikor)	Bio-Rad, #170-5046
Goat IgG Anti-Rat HRP Conjugate (Sekonder Antikor)	Bio-Rad, 5204-2504
İnsan Beynine Ait Bütün Beyin Doku Lizati, (Pozitif Kontrol)	Novus Biologicals, NB820-59177

### 3.6. İki Boyutlu Jel Elektroforezi, (2-DE)

Protein örnekleri 'Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden Protein Özütlelerinin Hazırlanması ve Örneklerin Çöktürülerek Temizlenmesi' bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı (Bkz.3.4). Elde edilen protein örnekleri (50 µg) IPG (immobilize pH gradyan) stripler (Bio-Rad, ABD) tarafından emilebilmeleri için Protean® izoelektrik fokuslama (IEF) hücresi (Bio-Rad, ABD) ile pasif rehidrasyon işlemine tabi tutuldu. Deneylerde 7 cm'lik, pH 3-10, linear olmayan (NL) IPG stripler kullanıldı. Örnekler, rehidrasyona tabi tutulmadan önce, toplam hacimleri 125 µl olacak şekilde, 2-D örnek tamponu (8 M üre, 130 mM DTT, % 4 w/v CHAPS, % 2 w/w Amfolit), %1 Tribütilfosfin (TBP) ve %1 Amfolit ile karıştırıldı. Rehidrasyon işleminden sonra IPG stripler IEF cihazı ile izoelektrik noktalarına göre birinci boyutta ayrıştırıldı. Proteinler adım adım akımı yükselen üç aşamalı bir program ile +20°C'de fokuslandı (Tablo 3.6).

**Tablo 3.6.** pH 3-10, NL, 7 cm'lik IPG stripler için kullanılan fokuslama programı.

IPG strip	Voltaj	Süre	Volt-Saat	Ramp
Basamak 1	250 V	20 dakika	-	Linear
Basamak 2	4000 V	2 saat	-	Linear
Basamak 3	4000 V	-	10000 Volt-saat	Rapid
Toplam		5 saat	14000 Volt-saat	

Fokuslama sonrasında stripler dengeleme tamponu I (6M üre, 0.375M tris-HCl pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve dengeleme tamponu II (6M üre, 0.375M tris-HCl pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2.5% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dakikalık sürelerle yıkandı. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan keratinsiz (kera-free) poliakrilamid jellere (Tablo 3.7) yerleştirilerek elektroforez yöntemi ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta ayırma tabii tutuldu. Her bir örnekten üç adet jel yürütüldü ve böylelikle deneysel varyasyonlardan kaynaklı hatalar elimine edilmeye çalışıldı.

**Tablo 3.7.** Kera-free SDS-PAGE jel içerikleri.

Solüsyon	%12 Ayırıcı (Separating) jel (ml)	%4 Yükleme (Stacking) jel (ml)
Distile su	3.3	2.72
1.5M Tris. HCl pH 8.8	2.5	-
0.5M Tris. HCl pH 6.8	-	0.5
37.5:1 Akrlamid/Bis	4	0.68
%10 SDS	0.1	0.04
%10 APS	0.1	0.04



TEMED	0.004	0.004
<b>Toplam (ml)</b>	10	4
<b>Solüsyon</b>	<b>%8 Ayırıcı (Separating) jel (ml)</b>	<b>%4 Yükleme (Stacking) jel (ml)</b>
Distile su	4.63	2.72
1.5M Tris. HCl pH 8.8	2.5	-
0.5M Tris. HCl pH 6.8	-	0.5
37.5:1 Akrilamid/Bis	2.67	0.68
%10 SDS	0.1	0.04
%10 APS	0.1	0.04
TEMED	0.006	0.004
<b>Toplam (ml)</b>	10	4

Elektroforez sonrasında jeller %40 metanol, %10 asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edildiler. Ardından, Sypro Ruby (BioRad, ABD) boyası içerisinde gece boyu boyandılar (Tablo 3.8). Jellerin görüntülenmesi için VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD); analizleri için ise PDQuest Advance (BioRad, ABD) programı kullanıldı. Karşılaştırılan protein spotlarının ekspresyonunda farklılaşma sürecine göre bir ekol izlenerek artan ya da azalan değişimi olan spotlar belirlendi. Görüntü analizinin istatistiksel önemi ‘Student’s t-testi’ ile belirlendi ve istatistiksel olarak  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi. Protein spotlarının kütle spektrometresi ile tanımlanmak üzere jelden kesilmesi amacı ile jeller tekrar fikse edilip Coomassie Parlak Mavi G-250 boyası (Bio-Rad, ABD) ile gece boyunca boyandı. Ardından, kesim işlemi için EX-Quest Spot-cutter robotu (BioRad, ABD) kullanıldı. Böylece farklılaşma öncesi ve farklılaşma sonrası elde edilen hücrelerden proteom analizi yapıldı.

**Tablo 3.8.** Sypro Ruby ile jel boyama prosedürü.

<b>SyroRuby ile Boyama Basamakları</b>	<b>Solüsyonlar</b>	<b>Muamele Süresi</b>
<b>Basamak 1:</b> Fiksasyon	%40 Metanol, %10 Asetik Asit	gece boyu
<b>Basamak 2:</b> Yıkama	100 ml Distile su	3 kere 10 dakika
<b>Basamak 3:</b> Boyama (karanlıkta)	Sypro Ruby boyası	30 ml, gece boyu
<b>Basamak 4:</b> Boyayı uzaklaştırma (karanlıkta)	%10 Metanol, %7 Asetik Asit	30-60 dakika
<b>Basamak 5:</b> Yıkama (karanlıkta)	100 ml Distile su	3 kere 10 dakika

### **3.7. Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS) İçin Örnek Hazırlama ve Analizleri**

#### **3.7.1. Jel-İçi Triptik Kesim ve MALDI-TOF/TOF Analizi**

##### **3.7.1.1. Jel-İçi Triptik Kesim**

Jel-İçi Triptik Kesim (In-gel Tryptic Digestion) işlemi üretici tarafından (Thermo Fisher Scientific, ABD) önerilen protokol izlenerek kit ile gerçekleştirildi. Seçilen protein örnekleri, jel parçacıkları, renklerini kaybedinceye kadar %40 asetonitril ve 50 mM amonyum bikarbonat ile yıkanıp boyadan arındırıldı. Ardından, 30 dakika boyunca 60 °C'de 10 mM DTT ile indirgenip karanlıkta oda sıcaklığında 50 mM iyodoasetamid (IAA) ile 30 dakika boyunca alkilendi. Jel parçacıkları çalkalama ile 15 dakika boyunca 200 µl asetonitril ile dehidre edildi. Dehidrasyon işleminden sonra asetonitril ortamdan uzaklaştırılarak jel parçacıkları oda sıcaklığında kurutuldu. Triptik kesim, her bir jel parçacığı için 20 µl 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> çözeltisi içine 10 ng tripsin eklenecek şekilde 37°C'de gece boyunca inkübasyon ile gerçekleştirildi. Triptik kesim işleminden sonra, peptitler toplanıp SpeedVac (Eppendorf, ABD) içinde buharlaştırıldı. Ardından, peptitler 10 µl %0,1

trifluoroasetik asit (TFA) içerisinde çözüldü. C18 ZipTip pipet uçları (Millipore, Burlington, MA, ABD) peptitlerin, üreticinin talimatlarına göre, tuzunu gidermek/konsantre etmek için kullanıldı. Konsantre peptitler 0.8 µl matrisle (%50 asetronitril, %0,1 trifloroasetik asit içinde hazırlanmış 10 mg/ml  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA, Sigma–Aldrich, ABD) ile elüt edilerek direkt olarak bir Matrix Destekli Lazer Desorption İyonizasyon (MALDI) numune plakası üzerine aktarıldı.

### 3.7.1.2. MALDI-TOF/TOF Analizi

MALDI-TOF/TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içereisinde ayrıştırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptitlerin aminoasit dizilimlerine göre isimlendirmeye yardımcı olmaktadır (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Laboratuvarımızdaki AB SCIEX TOF/TOF 5800 cihazı (AB Sciex, Framingham, MA, ABD).

Protein spotları laboratuvarımızda, yukarıdaki bölümde de bahsedildiği üzere, Jel İçi Triptik Kesim (In-gel Tryptic Digestion) kiti ile kesildikten sonra elde edilen peptitler C18 ZipTip'leri ile temizlenerek MALDI-TOF/TOF cihazında isimlendirildiler. Başka bir deyişle; Peptit-kütle parmak izleri (PMF'ler) AB SCIEX TOF/TOF 5800 cihazı (AB Sciex, Framingham, MA, ABD) ile toplandı. Bu aşamada kütle aralığı 400 ila 2000 Da arasında olan TOF spektrumları pozitif iyon reflektör modunda kaydedildi. Her spektrum 200 lazer

atışının toplam ortalamasıydı. Spot başına düşen MS spektrumlarının en güçlü ‘peak’lerinden on tanesi MS/MS analizi için seçildi. Daha sonra, cihazdan elde edilen veriler ProteinPilot yazılımı 4.0.8085 revizyon 148085 (AB Sciex, Framingham, MA, ABD) kullanılarak MASCOT veritabanında (Matrix Science, Boston, MA, ABD) incelendi.

### **3.7.2. Solüsyon İçi Triptik Kesim ve nLC-MS/MS Çalışması**

#### **3.7.2.1. Solüsyon-İçi Triptik Kesim**

nLC-MS/MS çalışması için ‘Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden Protein Özütlerinin Hazırlanması ve Örneklerin Çöktürülerek Temizlenmesi’ başlığı altında anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan protein özütleri kullanıldı. Protein örnekleri Solüsyon-İçi triptik kesim (In-solution tryptic digestion and guanidination kit, #89895, Thermo Fisher Scientific, ABD) kitinin önerdiği protokol takip edilerek tripsin enzimiyle (Pierce, kat. No. 1862748) peptitlerine parçalandı. Kısaca özetlemek gerekirse; 15 µl Ambic (50 mM) and 1.5 µl DTT (100 mM) karışımına 0.025-10 µg protein örneği eklendi. Karışımın toplam hacimi 27 µl’ye tamamlandı ve 95°C’de 5 dakika inkübe edildi. Son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde, IAA protein örneklerine eklendi ve karışım karanlıkta 20 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, protein örneklerine 1 µl tripsin (100ng/µl) eklendi ve 3 saat boyunca karışım 37°C’de inkübe edildi. Tekrar, 1 µl tripsin (100ng/µl) protein karışımına eklenerek 30°C’de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra çözelti kuruyana kadar vakumla konsantre edildi ve peptitler nLC-MS/MS analizi için %0,1 formik asit (FA) içerisinde çözüldü.

#### **3.7.2.2. Hazırlanan Örneğin nLC-MS/MS Cihazı ile Analiz Edilmesi**

Peptidlerin ayırımı Dionex Ultimate 3000 Series RSLC (Thermo Scientific, ABD) marka bir nano-pompa ile gerçekleştirildi. Bu nano pompa Ultimate 3000 Series TCC-3000RS (Thermo Scientific, ABD) kolon kompartmanları ile donatılmış olup yine Dionex UltiMate 3000 Series RS (Thermo Scientific, ABD) oto-örnekleme ünitesine bağlı bulunmaktadır. Sistemin tamamı Xcalibur 4.0 (Thermo Scientific, ABD) yazılımı ile kontrol edilmektedir. Her bir analiz öncesinde örnekler 5mm×300 µm i.d., 5 µm, 100 Å boyutlarındaki bir C18 materyali içeren yakalama kolununa (Thermo Scientific, ABD) dakikada 5 µl hızla ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kalitesinde su ile hazırlanan %0,05 TFA

ve %2 asetonitril içeren çözelti yardımı ile yüklendi. Böylece protein ile beraber gelen tuz ve deterjan gibi kirlilikler uzaklaştırılarak sisteme girmeleri engellendi. Bu sürenin sonunda peptit elüsyonu iki farklı mobil faz (A ve B) kullanılarak yapıldı. Mobil faz A HPLC kalitesinde su ile hazırlanmış %0,1 (hacim/hacim)'lik formik asit içerirken, mobil faz B HPLC kalitesinde asetonitril ile hazırlanmış %0,1 (hacim/hacim)'lik TFA içermektedir. Örnekler, Tablo 3.9'da belirtilen gradiyent şartları altında yakalama kolonundan boyutları 15 cm×75 µm olan ve 2 µm, 100 Å çapında C18 materyali ile paketlenmiş Acclaim PepMap RSLC (Thermo Scientific, ABD) analitik kolonuna aktarıldı. Peptidler 130 dakika süreyle ve dakikada 0,3 µl akış hızıyla ayrıştırılarak Q-exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) gönderildi.

**Tablo 3.9.** nHPLC'de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradiyentleri.

Uygulama aralığı (Dakika)	Mobil B fazı yüzdesindeki artış	Uygulanan Gradyan Tipi
0-45	6-20	Lineer
45-75	40	Lineer
75-90	90	Lineer
90-120	90	Sabit
120-125	6	Hızlı düşüş
125-130	94	A fazı ile yıkama

Kolon sıcaklığı 40°C'de tutuldu ve her analizde 2 µl örnek enjeksiyonu yapıldı. Peptitlerin pozitif yük okuma modunda iyonizasyonunu sağlayabilmek için Nanospray Flex™ (Thermo Scientific, ABD) iyon kaynağı kullanıldı. Cihaz parametreleri +2.3 kV voltaj ve 320°C kapiler sıcaklığı olacak şekilde ayarlandı. Cihaz her analizden önce standart bir pozitif kalibrant (LTQ Velos ESI Pozitif İyon Kalibrasyon Çözeltisi 88323, Pierce, ABD) ile kalibre edildi.

### 3.8. MS/MS Veri Analizi

#### 3.8.1. MALDI-TOF/TOF Veri Analizi

Protein tanımlama deneyleri Kocaeli Üniversitesi DEKART proteomik laboratuvarında (<http://kabiproteomics.kocaeli.edu.tr/>) ABSCIEX MALDI-TOF/TOF 5800 sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler MASCOT veritabanı (Matrix Science, Boston, MA, ABD) ve ProteinPilot yazılımı 4.0.8085 revizyon 148085 (AB Sciex, Framingham, MA, ABD) ile analiz edildi. Araştırmanın parametreleri ise; tripsin enzimleri, bir hatalı kesim bölgesi, karbamidometilin sabit modifikasyonları (C), oksidasyonun değişken modifikasyonları (M), peptit kütle toleransı (50 ppm), fragman kütle toleransı ( $\pm 0.2$  Da), peptit yükü 1+ ve monoizotopik olarak belirlendi. MASCOT analizinde protein tayini için yalnızca  $p < 0.05$  tarafından tanımlanan 'hit'ler kabul edildi.

Maldi-TOF/TOF ile tanımlanan ve farklı şekilde düzenlenmiş olan proteinlerin UniProt erişim numaraları kullanılarak STRING analizi (<https://string-db.org>) yapıldı. Arama motoru seçeneği 'isimler/tanımlayıcılara' göre 'çoklu proteinler' olarak ayarlandı ve organizma olarak '*Homo sapiens*' seçildi. STRING analizindeki parametreler; orta düzeyde güven etkileşimi (interaction score of medium confidence), 1. ve 2. kabuklar için seçilen maksimum etkileşim sayısının 5'ten fazla olmaması, aktif etkileşim kaynakları (deneyler, veritabanları, ortak ifade, komşuluk, gen füzyonu ve birlikte meydana gelme) olarak belirlendi. Bu analizde ele alınan isabetler  $1e-04$ 'ten daha küçük 'Yanlış Keşif Oranlarına' (False Discovery Rates, FDR) sahipti.

#### 3.8.2. nLC-MS/MS Veri Analizi

nLC-MS/MS çalışmasından elde edilen ham veriler Proteom Discoverer 2.2 (Thermo Scientific, ABD) yazılımı ile proteinleri tanımlamak üzere analiz edildi. Kullanılan parametreler; peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, toleranslı düşük 1, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sistein karbamidometilasyon sabit modifikasyonları, oksidasyonun değişken modifikasyonları ve asparajin deaminasyonu şeklinde özetlenebilmektedir. Her bir protein için tanımlanan

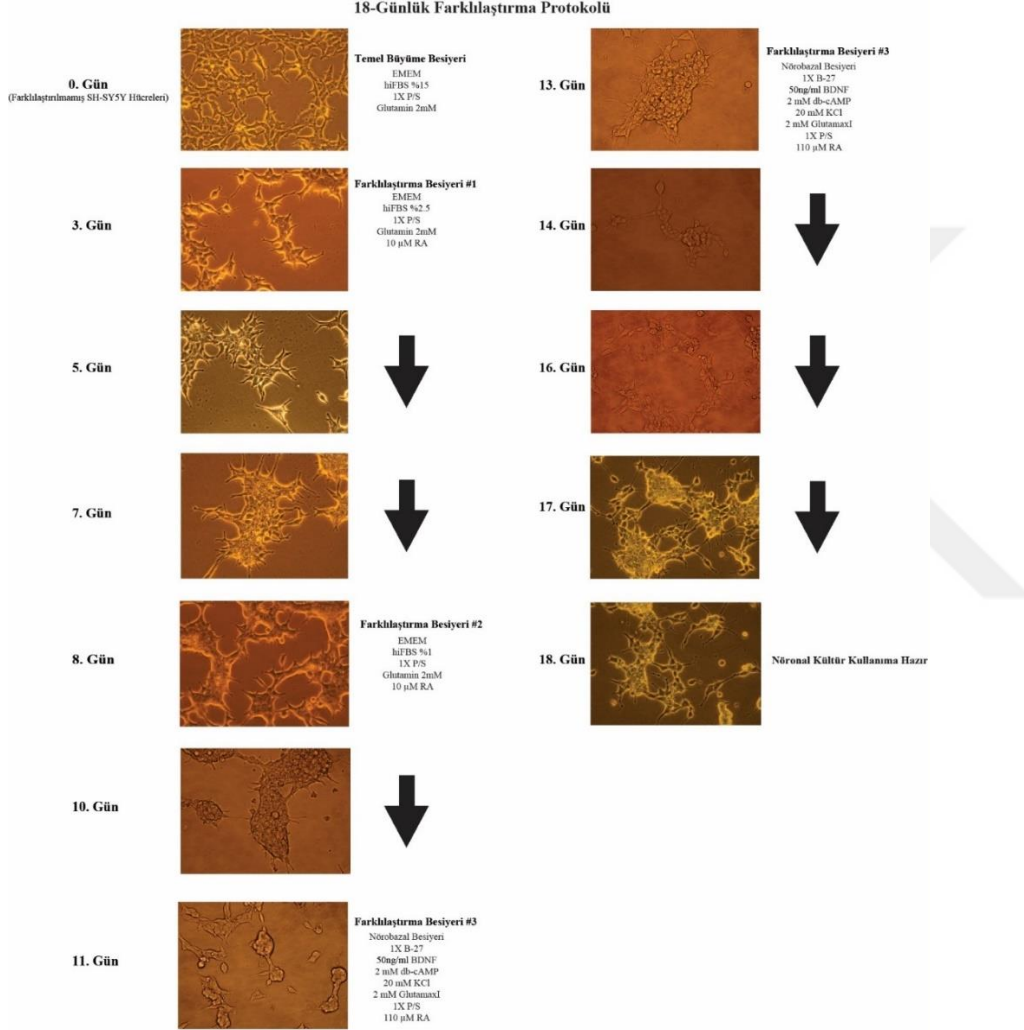
minimum peptit sayısı 2 olarak kabul edildi ve elde edilen veriler Uniprot/Swissprot veritabanında araştırıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörojenik Farklılaşma İşlemine Tabi Tutulması

Projenin ilk basamağı olan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine ait saklama kültürlerinin sıvı azottan alınıp kültüre edilmesinin ardından bu hücreler Shipley ve ark. (2017) makalesinde tanımlandığı protokole sadık kalınarak nöronal farklılaşmaya tabi tutuldu (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** SH-SY5Y hücrelerinin Shipley ve ark. (2017)'nin oluşturduğu protokole sadık kalınarak uygulanan dopaminerjik nöronlara farklılaşma sürecinin inverted mikroskop ile takip edilmesi.



Toplamda on sekiz gün süren nöronal farklılaşma sürecinde hücrelerin kademeli olarak gerçekleşen farklılaşması adım adım takip edildi ve ara noktalarda örnekler alınarak hem protein hem de RNA düzeyinde çalışmalar yapıldı. Ancak bu aşamada çalışma kapsamında ciddi sorunlar yaşandı. Yaşanan en büyük sorun; hücrelerin farklılaşma sürecinde sayısal olarak azalması, birçoğunun ölmesi ve neticede farklılaşma sürecini tamamlamakta çekilen problemlerdi. Farklılaştırma deneyi 3 kez tekrarlanmasına rağmen hep aynı sorunlarla karşı karşıya kalındı. Çalışma kapsamında hücre farklılaşması hem protein hem de transkriptom düzeyinde farklı açılardan çalışıldığı için, farklılaşma sonunda elde edilen hücre sayıları hem RNA izolasyonu hem protein izolasyonu hem de IF çalışmaları için yeterli miktarda elde edilemiyordu. Yapılan proje toplantıları ile bu problemin laboratuvarında rutin olarak kullanılmakta olan SH-SY5Y hücrelerinin aşırı sayıda pasaj görmüş ve yaşlanmış olmaları probleminden kaynaklanabileceği kanısına varıldı. Bu sebeple İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden erken pasaj (P=20) SH-SY5Y hücreleri temin edildi. Yeni SH-SY5Y hücreleri ile farklılaştırma deneyleri tekrar gerçekleştirildi ve on sekiz günlük süreç içerisinde başarılı bir şekilde farklılaşabilen SH-SY5Y hücreleri elde edildi. Ancak on sekiz günlük uzun sürecin sonunda hücrelere aşırı müdahale edilmesi sebebi ile hücre ölüm oranlarının beklenilenden fazla olduğu görüldü. Literatürde SH-SY5Y hücrelerinin nörojenik farklılaştırılması için kullanılan çeşitli protokoller mevcuttur ve bu protokollerin her birinde farklı zaman süreleri kullanılmaktadır (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmak için kullanılan çeşitli nöronal farklılaştırma protokolleri ve ilgili makaleler.

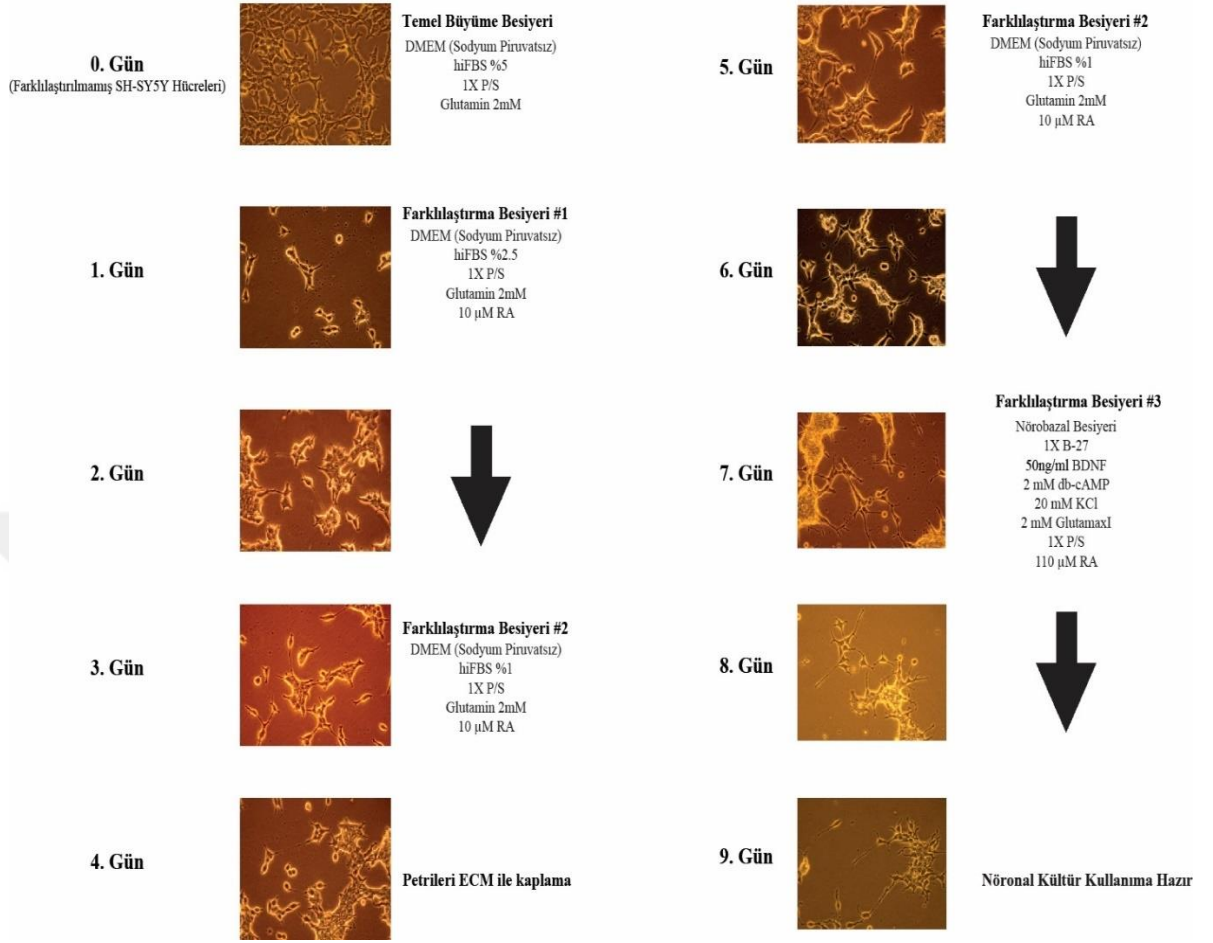
<b>Makaleler</b>	<b>Farklılaştırma Süreci</b>	<b>Kullanılan Farklılaştırma Ajamı</b>
Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, ComellaJX. <b>Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-</b>	10-12 gün	RA ve BDNF sırasıyla uygulanmıştır. BDNF kullanılırken hiFBS ve RA eklenmemiştir.

<p><b>dependent, human neuron-like cells. J Neurochem.</b> 2000 Sep;75(3):991-1003. PubMed PMID: 10936180.</p>		
<p>Shibley MM, Mangold CA, Szpara ML. <b>Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line.</b> J Vis Exp. 2016 Feb 17;(108):53193. doi: 10.3791/53193. PubMed PMID: 26967710; PubMed Central PMCID: PMC4828168.</p>	18 gün	Nörobazal Besiyeri, RA, BDNF, B-27 ve db-cAMP üç farklı besiyeri halinde farklı zaman aralıklarında kullanılmıştır.
<p>Kovalevich J, Langford D. <b>Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology.</b> Methods Mol Biol. 2013; 1078:9-21. doi:10.1007/978-1-62703-640-5_2. PubMed PMID: 23975817; PubMed Central PMCID: PMC5127451.</p>	3-5 gün	Nörobazal Besiyeri, RA ve B-27 kullanılmıştır.
<p>Forster JJ, Köglberger S, Trefois C, Boyd O, Baumuratov AS, Buck L, Balling R, Antony PM. <b>Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability.</b> J Biomol Screen. 2016 Jun;21(5):496-509. doi: 10.1177/1087057115625190. Epub 2016 Jan 6. PubMed PMID: 26738520; PubMed Central PMCID: PMC4904349.</p>	6 gün	DMEM (sodyum pirüvatsız) ve RA birinci besiyerinde, Nörobazal Besiyeri (fenol kırmızısız), N2 takviyesi ve BDNF ise ikinci besiyerinde kullanılmıştır.

Tablo 4.1'deki protokollerden yola çıkılarak laboratuvarımızda yeni bir protokol geliştirildi. Geliştirilen yeni protokol ile dokuz günlük bir süre içerisinde SH-SY5Y hücrelerinin çok daha başarılı bir şekilde nörojenik olarak farklılaşması sağlandı (Şekil 4.2).

Farklılaşma süreci içerisinde örnek toplanılabilmesi için ara-zaman (time-point) noktalarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple farklılaşma sürecinde dört ara-zaman noktası belirlendi. Bu ara-zaman noktaları, kısaca, '0. Gün', '3. Gün', '6. Gün' ve '9. Gün' olarak çalışıldı. 0. Gün; hücrelerin farklılaşmaya başlamadan önceki, yani protokole başlamak için pasajlandıktan hemen sonraki, hallerini temsil etmesi için seçildi. Bu aşamada hücreler %5 ısı ile inaktif hale getirilen FBS (hiFBS) içeren DMEM besiyerinde kültüre edildiler. Hücreler bir gün boyunca bu besiyerinde bırakıldıktan sonra farklılaşmanın tetiklenmesi için 'farklılaştırma besiyeri 1'in içerisine alındılar. Bu besiyeri %2,5 hiFBS ve 10 µM RA içermekte idi. İki gün süresince bu besiyerinde bırakılan hücrelerin morfolojilerinde aşırı bir değişim gözlemlenmedi. Bazı hücrelerde akson uzantıları benzeri uzantıların oluşmaya başladığı görüldü. Bu besiyerinde iki gün boyunca bırakılan hücrelerden, besiyeri değişimi öncesinde, 3. gün'ü temsilen örnek alındı. Daha sonra, besiyeri değiştirilerek kalan hücreler %1 hiFBS ve 10 µM RA içeren yeni besiyerine (farklılaştırma besiyeri 2) alındı ve inkübasyona bırakıldı. 5. gün'de kültür tabaklarından kaldırılan hücreler ECM ile kaplanmış olan yeni kültür tabaklarına ekildi ve bu tabaklar içerisinde inkübasyona devam edildi. Bir gün boyunca hücrelerin ECM ile kaplı kültür tabaklarına tutunmaları için beklenildi. Bu hücrelerden, 7. gün'de besiyeri değişiminden önce, 6. gün'ü temsilen örnekler alındı.

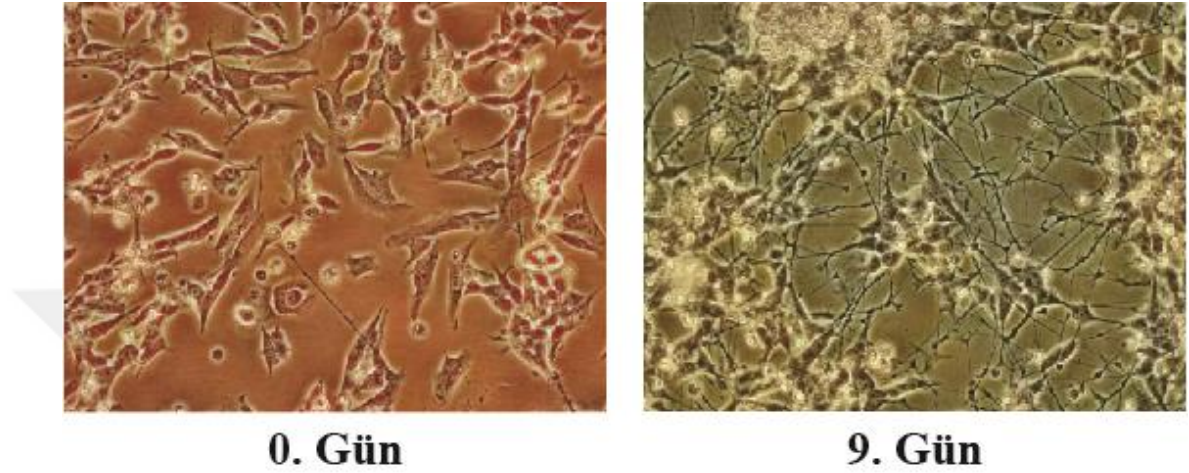
## 9-Günlük Farklılaştırma Protokolü



**Şekil 4.2.** SH-SY5Y hücrelerinin dokuz günlük iyileştirilmiş protokol uygulanarak nöron-benzeri hücrelere farklılaştırılma süreci.

7. gün'de hücreler 'farklılaştırma besiyeri 3' içerisine alındı. Farklılaştırma besiyeri 3'ün nöronal farklılaşmayı ve büyümeyi tetikleyici içeriği 'Yöntem' bölümünde detaylı bir şekilde verilmektedir (Bkz.3.1.4). Bu besiyeri FBS içermediği için hücrelerin büyümesi tamamıyla durdu ve hızlı bir farklılaşma süreci başladı. Bu aşamada hücrelerde nörojenik farklılaşma belirtileri daha net bir şekilde görülebiliyordu. Ancak hücrelerin ECM ile kaplı kültür tabaklarına transfer edilmeleri sırasında hücre kaybının yaşandığı da belirtilmelidir. Bazı hücrelerin ECM ile kaplı kültür tabaklarına yapışmakta sorun yaşadığı gözlemlendi. Buna rağmen 6. gün'ün sonunda hem protein hem de RNA düzeyinde çalışmalar yapabilmek için yeterince hücre sayısına ulaşılabildi. Bu nedenle yapışmayan hücreler protokolün

başarısını etkilemedi. 8. gün'e gelindiğinde hücrelerin inkübe edildiği besiyeri, opsiyonel olarak, bir kez daha 'farklılaştırma besiyeri 3' ile değiştirildi ve hücreler taze, kompleks nörojenik farklılaştırma besiyerine alınarak farklılaşmanın tamamlanması için inkübasyona devam edildi. 9. gün'ün sonunda hücrelerin farklılaşma sürecini tamamladığı ve oluşturdukları aksonal yapılar ile nörona benzedikleri görüldü (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Nörojenik farklılaşmanın 9. gününde nöron benzeri yapılar oluşturan SH-SY5Y hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü.

#### **4.2. Nörojenik Farklılaşmanın IF Yöntemi İle Analiz Edilmesi**

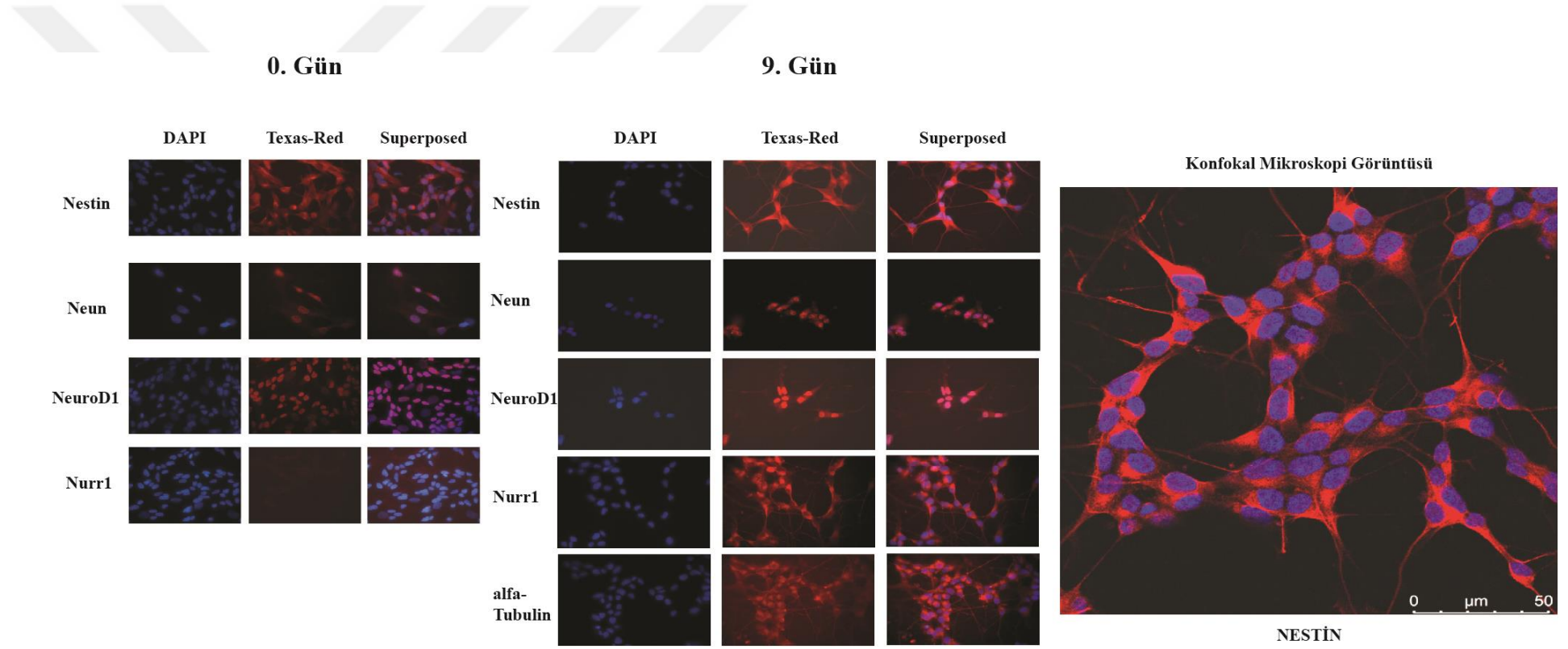
Çalışma kapsamında nörojenik farklılaşma sürecini takip edebilmek için farklılaşmanın 0. ve 9. günlerinde seçilmiş olan nöronal markör proteinler için IF boyama deneyleri yapıldı. Bu amaçla kullandığımız markör proteinler sırası ile Nestin, NeuroD1, Neun, Nurr1 ve TH oldu. Bu markörlerin özellikleri ve neden kullanıldıkları 'Giriş' bölümünde detaylı olarak verilmiştir (Bkz.1.10).

Bu markörlere ilaveten 9. gün deneylerinde alfa-tubulin de hücre morfolojisinin görüntülenmesi amacı ile kullanılmıştır (Şekil 4.4). 0. gün boyamalarında hücrelerin Nestin ve NeuroD1 boyamaları pozitif sinyaller verirken, Neun, Nurr1 ve TH boyamaları negatif sonuçlar vermiş ve bu boyamalardan sinyal alınamamıştır. Alınan sinyallerin floresan intensiteleri oldukça düşüktür. Buna karşın, 9. gün IF boyamaları ise her bir nöron markörü

için pozitif olarak gözlemlendi ve floresan intensiteleri oldukça yüksekti (Tablo 4.2). Özellikle Nurr1 floresan intensitesinde ciddi artış gözlemlendi.

**Tablo 4.2.** IF yönteminde kullanılan nörojenik farklılaşma markörlerine ait parametreler ve elde edilen sonuçlar

<b>Nöronal Marker</b>	<b>Beklenen Lokalizasyon</b>	<b>Gözlemlenen Lokalizasyon</b>	<b>Floresan Yoğunluğu</b>
Nestin	Sitoplazmik	Sitoplazmik	+++
Neun	Çekirdek	Çekirdek (%90) + Sitoplazmik (%10)	++
NeuroD1	Çekirdek	Çekirdek (%90) + Sitoplazmik (%10)	+++
Nurr1	Çekirdek	Sitoplazmik (%70) + Çekirdek (%30)	++
TH	Sitoplazma	Çekirdek (%80) + Sitoplazmik (%20)	+
Alfa-Tubulin	Sitoplazma	Sitoplazmik (%100)	+++

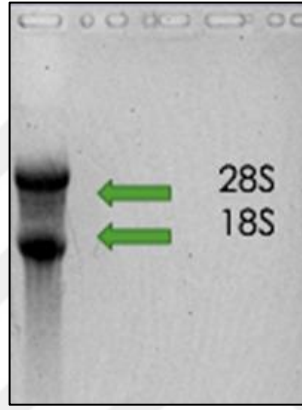


**Şekil 4.4.** SH-SY5Y hücrelerinin nörojenik farklılaşma sürecinin IF yaklaşımı ile analiz edilmesi.

### 4.3. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yapılması

#### 4.3.1. Farklılaşma Sürecindeki Hücrelerden mRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Farklılaşma süreci sırasında toplanan 0., 3., 6. ve 9. gün örneklerinden total RNA izolasyonları yapıldı ve izole edilen RNA'ların kalitesi %1'lik formaldehit agaroz jel ile kontrol edildi (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Nörojenik farklılaşma sürecinde 9. günün sonunda izole edilen RNA'nın %1'lik formaldehit RNA agaroz jel elektroforezi ile analizi.

Jel üzerinde 18S ve 28S rRNA ürünlerinin net bir şekilde görülmüş olması RNA izolasyonun doğru bir şekilde yapıldığını kanıtlamaktadır. Bu nedenle qRT-PCR çalışmalarının yapılabilmesi için cDNA sentezleri 'Yöntem' kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi (Bkz. 3.3.1) ve elde edilen cDNA örnekleri qRT-PCR analizlerinde kullanıldı.

#### 4.3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi Kullanılarak Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DRD2, PARK2, PINK1, DJ-1, VPS35 ve Aktin Gen Seviyelerindeki Değişimlerin İncelenmesi

Projenin qRT-PCR deneylerine başlamadan önce, öncül deneylerde, qRT-PCR deney şartları optimize edilmeye çalışıldı. Bu deneylerde Aktin ekspresyonundaki değişimin

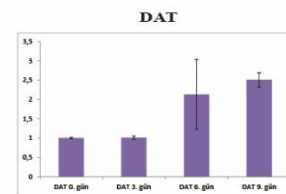
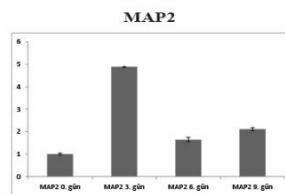
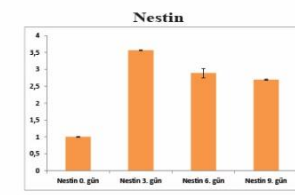
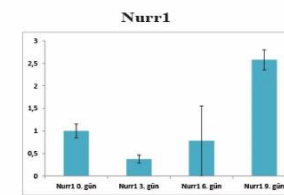
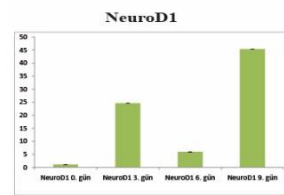
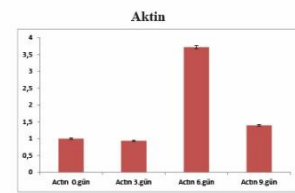
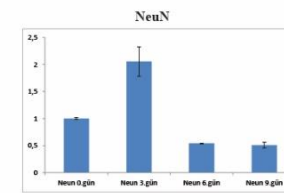
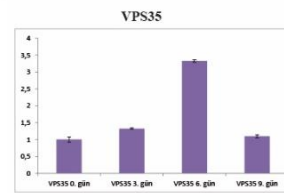
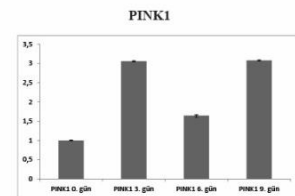
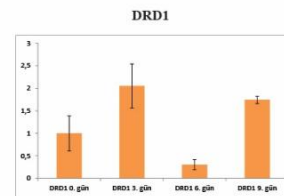
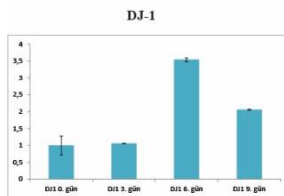
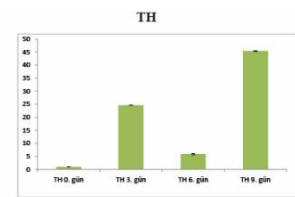
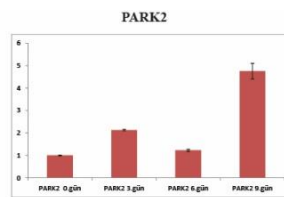
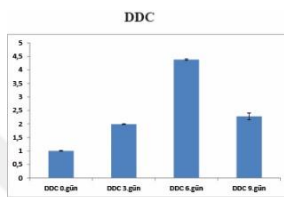


'internal kontrol' olarak kullanılması planlanmaktaydı. Bunun en temel nedeni; WB çalışmalarında Aktin seviyelerinin farklılaşma sürecinde kayda değer bir değişim sergilememesiydi. Ancak yapılan qRT-PCR analizlerinde Aktin ekspresyonunun mRNA düzeyinde örnekler arasında farklılıklar gösterdiği ve bu nedenle de farklılaşma sürecinde seviyelerinde değişiklik olmayacak farklı bir internal kontrol genine ihtiyaç olduğu saptandı. Bu bağlamda yapılan literatür araştırmalarında tavsiye edilen internal kontrol geninin GAPDH olduğu belirlendi ve qRT-PCR çalışmalarında internal kontrol olarak Aktin yerine GAPDH tercih edildi. DDC, Park2, TH, DJ-1, DRD1, PINK1, VPS35, Neun, Aktin, NeuroD1, Nurr1, Nestin ve DAT genlerine ait qRT-PCR primerleri kullanılarak qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi (Tablo 4.3). Her bir gen için yapılan qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen ifade düzeylerine ait grafikler ve günlere göre standart hatalar (SE) Şekil 4.6'da verilmektedir. Bunların yanı sıra, nLC-MS/MS verilerini doğrulamak için çalışma kapsamında olmayan ve yalnızca 9. Gün'de tanımlanan MAP2 genine ait optimize primer sipariş edilerek qRT-PCR çalışmasında MAP2 ifade seviyesi de takip edildi. Elde edilen verilere ait hesaplamalar Ek-1'de sunulmaktadır.

**Tablo 4.3.** qRT-PCR çalışması sonucu elde edilen regülasyon oranları.

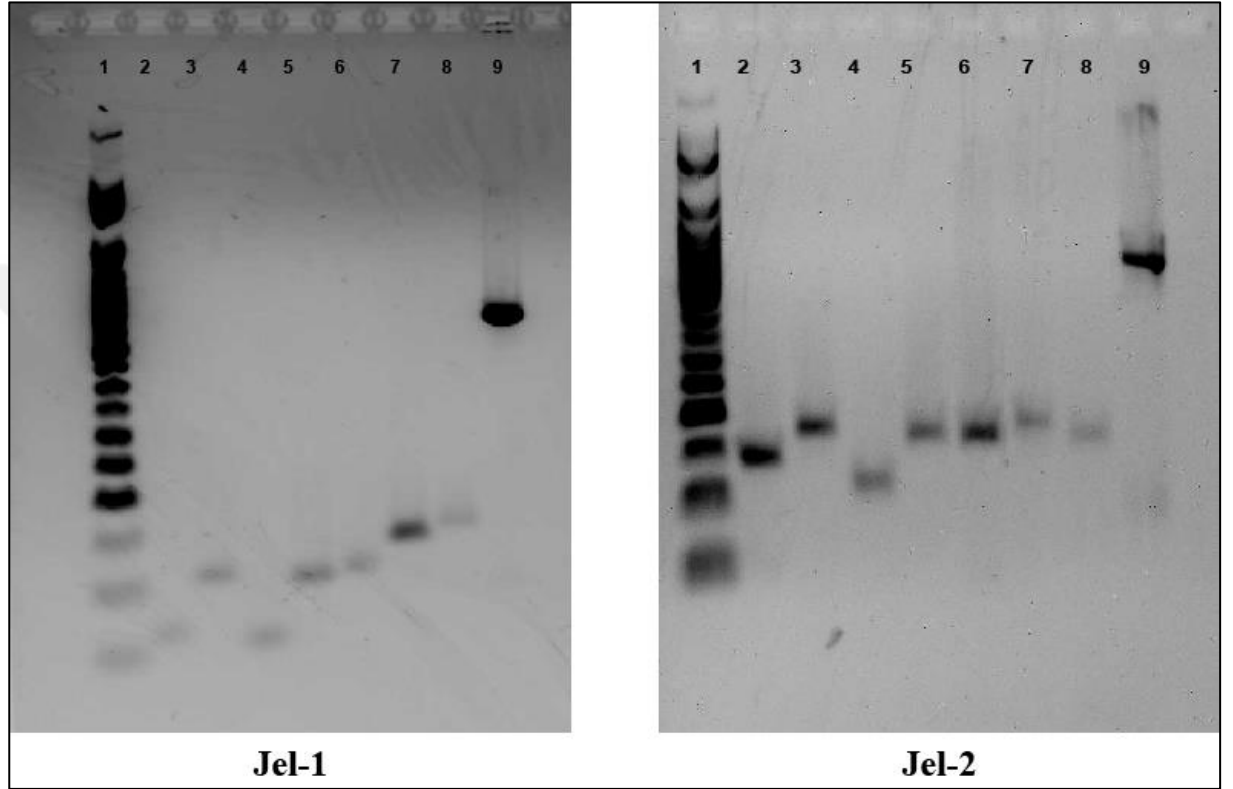
Gen Adı	3. Gün/0. Gün	6. Gün/0. Gün	9. Gün/0. Gün
DDC	1,991	4,377	2,276
Park2	2,124	1,226	4,757
TH	24,590	5,884	45,360
DJ-1	1,060	3,539	2,061
DRD1	2,052	0,305	1,741
PINK1	3,053	1,640	3,074
VPS35	1,323	3,325	1,094
Neun	29,310	11,366	19,293

Aktin	0,935	3,715	1,392
NeuroD1	24,590	5,884	45,360
Nurr1	0,375	0,781	2,579
Nestin	3,564	2,888	2,695
DAT	1,012	2,131	2,508
MAP2	4,879	1,640	2,109



**Şekil 4.6.** Her bir gen için yapılan qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen ifade düzeylerine ait grafikler ve günlere göre SE dağılımları (internal kontrol: GAPDH).

qRT-PCR çalışmasından sonra her bir gene ait amplifiye olan ürünleri görebilmek amacı ile %2'lik agaroz jel yürütüldü (Şekil 4.7). Böylece bütün gen amplifikasyonlarının doğru büyüklükte olduğu doğrulanmış oldu.

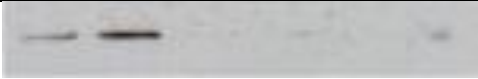






**Şekil 4.7.** qRT-PCR çalışması sonucunda her bir gene ait amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için yürütülen %2'lik agaroz jele ait görüntü. Jel görüntüsünün renkleri yazılım yardımı ile kolaylık olması amacıyla ters çevrilmiştir (inverted). (Jel-1 sırasıyla; Marker, DDC, Park2, TH, DJ-1, DRD1, PINK1, VPS35 ve GAPDH. Jel-2 sırasıyla; Marker, NeuN, Aktin, NeuroD1, Nurr1, Nestin, MAP2, DAT ve GAPDH).


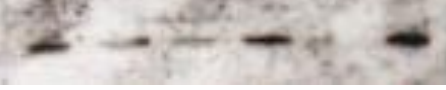
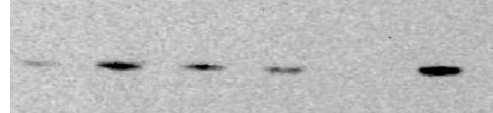
#### 4.4. Nörojenik Farklılaşma Sırasında Markör Proteinlerin İfade Düzeylerinde Meydana Gelen Değişimlerin WB Yöntemi Kullanılarak Takip Edilmesi





Nörojenik farklılaşma sürecinde markör proteinlerin ifade düzeylerinde meydana gelen değişimler WB yöntemi kullanılarak takip edildi (Tablo 4.4). Seçilen markör proteinlere ek olarak PH ile ilişkili olduğu bilinen diğer bazı proteinlerin de miktarlarındaki değişiklikler incelendi. Aktin ifadesi ise örnekler arasında herhangi bir yükleme hatasının yapılmadığını göstermek amacıyla çalışıldı. Deneylede pozitif kontrol olması açısından insan beynine ait, ticari olarak satın alınan, doku lizatı da kullanıldı.



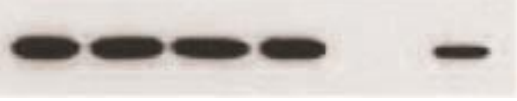
**Tablo 4.4.** Nöronal farklılaşma sürecinde kullanılan nörojenik markör proteinlerin ve PH ile ilişkili proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin WB ile analizi. (Jel yükleme sırası; soldan sağa doğru: 0. gün, 3. gün, 6. gün, 9. gün ve pozitif kontrol).

Nöronal Markör	Farklılaşma Sonrası Regülasyon (WB)	Farklılaşma Sonrası Literatürde Beklenen Regülasyon	WB Film Görüntüsü
TH	Mevcut antikorlar ile optimize bir sonuç elde edilemedi.	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"><li>• Primer Antikor: 1/500 (Novus Biologicals, NB300-109 ve ThermoFisher Scientific #701949)</li><li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Goat IgG Anti-Rabbit HRP Conjugate)</li></ul>
DDC	DDC ekspresyon seviyesinin arttığı	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"><li>• Primer Antikor: 1/500 (Cell Signaling Technology, #13561)</li></ul>

	gözlemlenmiştir		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Goat IgG Anti-Rabbit HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>DRD1</b>	DRD1 ekspresyon seviyesinin 0. güne göre arttığı gözlemlenmiştir	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-33660)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>DRD2</b>	DRD2 ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5303)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>Parkin</b>	Parkin ekspresyonunun 3. gün örneklerinde arttığı görülmüştür. Ancak sonrasında normal düzeye döndüğü gözlemlenmiştir	Literatürde henüz yeteri kadar çalışılmamıştır	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-32282)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>

<p><b>DJ-1</b></p>	<p>DJ-1 ekspresyonu tüm örneklerde gözlemlenmiştir .</p>	<p>İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-55572)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<p><b>PINK1</b></p>	<p>PINK1 ekspresyonunun farklılaşma süreci boyunca eksprese olduğu gözlemlenmiştir .</p>	<p>Literatürde henüz yeteri kadar çalışılmamıştır .</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-517353 ve Novus Biologicals, BC100-494)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate ve Goat IgG Anti-Rabbit HRP Conjugate)</li> </ul>
<p><b>VPS35</b></p>	<p>VPS35 ekspresyonunda özellikle 3. günde artış olduğu gözlemlenmiştir . Daha sonrasında ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüştür.</p>	<p>Literatürde henüz yeteri kadar çalışılmamıştır .</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-374372)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>

<b>Nestin</b>	Ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlemlenmiştir .	İfade seviyesinin azalması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor:1/500 (Novus Biologicals, NB300-266)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>NeuN</b>	NeuN ekspresyonunun 0. ve 3. gün örneklerinde yüksek iken 6. ve 9. gün örneklerinde azaldığı gözlemlenmiştir .	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor:1/500 (Novus Biologicals, NBP1-92693)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>DAT</b>	DAT ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir .	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor:1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-32258)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Rat HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>NeuroD1</b>	NeuroD1 ekspresyonu tüm örneklerde gözlemlendi. İlginç bir şekilde wb	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor:1/500 (Novus Biologicals, H00004760-M01)</li> </ul>

	protein lizatında gözlemlenemedi		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>SNCA</b>	İlginç bir şekilde sadece wb protein lizatında gözlemlendi.	Literatürde henüz yeteri kadar çalışılmamıştır	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Sigma Aldrich, #S5566)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>Nurr1</b>	Nurr1 ekspresyonu WB yöntemi ile hiçbir örnekte görülemedi.	İfade seviyesinin artması beklenilmekte idi.	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (ThermoFisher Scientific, #MA1-195)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>
<b>Aktin</b>	Aktin ifadesinin farklılaşma süresince değişmeden kaldığı görüldü.	İnternal Kontrol	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Antikor: 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-69879)</li> <li>• Sekonder Antikor: 1/10.000 (Bio-Rad, Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate)</li> </ul>

SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşma sürecinde IF deneylerinde ifade düzeylerinde artış gözlemlenen Nestin, Neun, NeuroD1 ve Nurr1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler WB deneyleri ile de teyit edilmeye çalışıldı. Deneyler en az 3 kez tekrarlandı. Ayrıca sonuçlar, bazı proteinler (TH, Neun, NeuroD1 ve PINK1) için farklı iki firma tarafından



üretilen antikorlar (ThermoFisher Scientific ve Novus Biologicals) kullanılarak da teyit edildi. Ancak arzu edilen nitelikte sonuçlar elde edilemedi. Buna rağmen elde edilen imajlardan aşağıdaki sonuçlar çıkartılabilmektedir.

(1) Nestin ekspresyonunun nörojenik farklılaşma süreci boyunca azaldığı gözlemlendi. En yüksek Nestin düzeyi 0. gün örneklerinde görüldü. Pozitif kontrol olarak kullanılan doku lizatında beklenildiği üzere Nestin ifadesi gözlemlenmedi.

(2) Neun ifadesi 0. ve 3. gün örneklerinde yüksek iken 6. ve 9. gün örneklerinde azaldı. Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan doku lizatında çok güçlü bir Neun bandı gözlemlendi.

(3) NeuroD1 protein ifadesi beklenildiği üzere tüm örneklerde görüldü. İlginç bir şekilde pozitif kontrol olarak kullanılan doku lizatında görülmedi.

(4) Nurr1 ifadesi WB yöntemi ile hiçbir örnekte görülemedi.

Bu nörojenik markör proteinlerine ek olarak aşağıdaki proteinlerin de seviyelerindeki değişimler nörojenik farklılaşma süreci ile ilişkili olduğu için incelendi.

(1) D1DR dopamin reseptör ifadesi 0.gün hariç tüm örneklerde düşük seviyede de olsa görüldü.

(2) D2DR dopamin reseptör ifadesi tüm örneklerde görüldü. En yüksek D2DR ifadesi 9. gün örneklerinde görüldü.

(3) DAT dopamin transporter protein ifadesi tüm örneklerde görüldü. Farklılaşma sürecinde miktarında artış tespit edildi. En yüksek DAT ifadesi 9. gün örneklerinde görüldü.

(4) DDC dopamin metabolizmasında görev alan bir dekarboksilaz olmakla beraber ifadesi tüm örneklerde gözlemlendi. En yüksek ifade seviyesi 9. Gün örneklerinde görüldü.

(5) Literatüre göre TH ifade seviyesinde farklılaşma süreci sonucunda artış beklenilmesine rağmen iki farklı markadan temin edilen antikorlar ile yapılan WB deneyleri ile optimize bir sonuç elde edilemedi.

Bu proteinlerin seviyelerindeki değişimlere ek olarak PH ile ilişkisi bilinen Parkin, DJ-1, PINK1, SNCA ve VPS35 düzeylerine de bakıldı.

(1) DJ-1, şaperon bir protein olup ifadesi tüm örneklerde görüldü. Farklılaşma sürecinde miktarında artış tespit edilmedi.

(2) Parkin düzeyinin 3. gün örneklerinde artış gösterdiği saptandı. Ancak sonrasında normal düzeye döndüğü görüldü.

(3) PINK1 ifade düzeyi iki farklı markadan temin edilen antikorlar ile çalışıldı. Sadece Santa Cruz Biotechnology firmasından temin edilen antikor ile yapılan WB deneyi sonucu optimize bir sonuç elde edilebildi. PINK1 ifadesi farklılaşma süreci boyunca tüm örneklerde görüldü.

(4) SNCA ekspresyonu yalnızca pozitif kontrol olarak kullanılan doku lizatında gözlemlenebildi.

(5) VPS35 ifade düzeyinin özellikle 3. günde arttığı ve daha sonrasında ifade seviyesinin azaldığı görüldü.

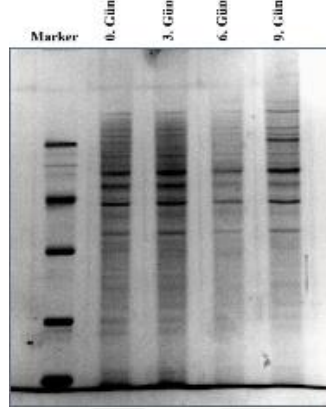
Ayrıca 'housekeeping' gen olan  $\beta$ -Aktin tüm WB deneylerinde internal kontrol olarak kullanıldı. Tüm membranlar strip edilerek, WB deneyleri  $\beta$ -Aktin antikoruna ile tekrarlandı. Böylece tüm kuyulara eşit protein yüklenmiş olduğu görüldü.

#### **4.5. Farklılaşma Sürecinin Protein/Proteom Düzeyinde İncelenmesi**

##### **4.5.1. 2-DE Çalışması ve 2-DE'den Elde Edilen Protein Spotlarının MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlanması**

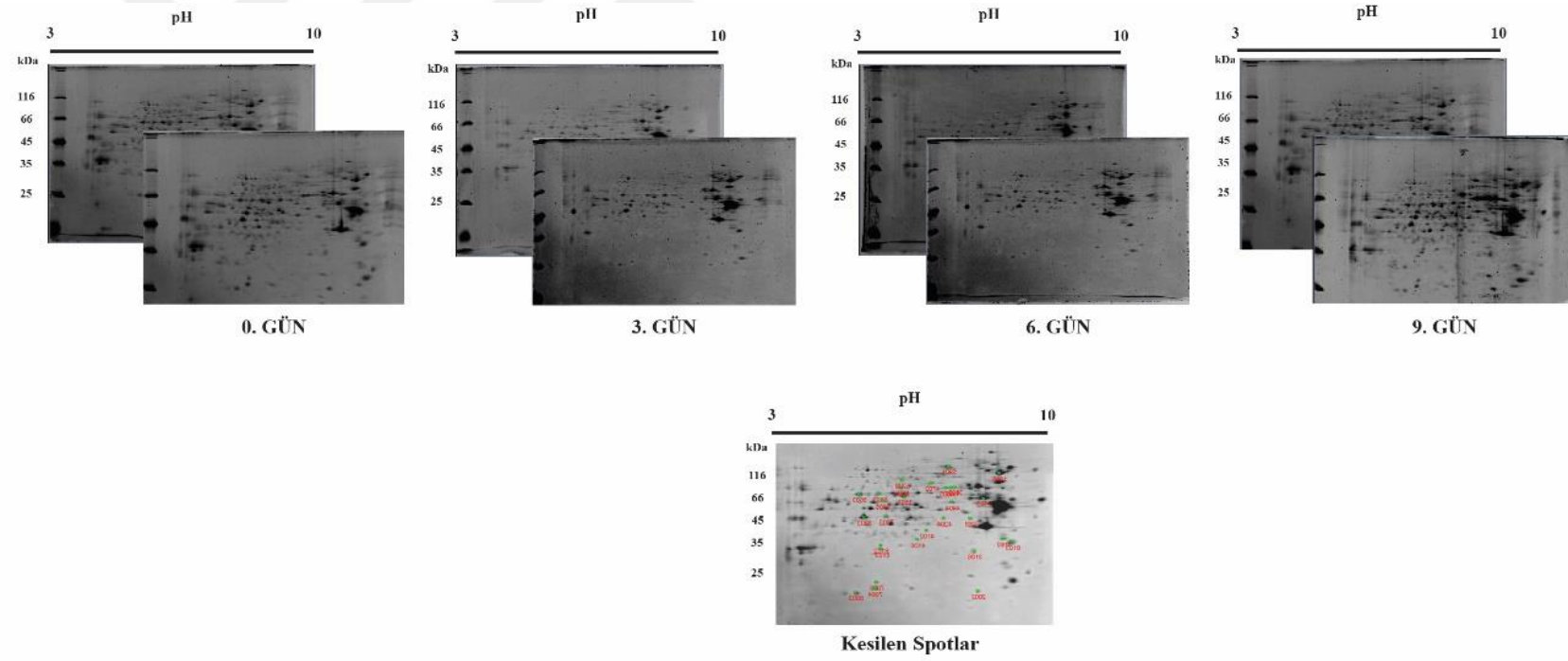
Farklılaşma sürecinde toplanan hücrelerden 'Yöntem' kısmında anlatıldığı şekilde protein örnekleri hazırlandı (Bkz.3.4). Hazırlanan protein örneklerinin konsantrasyonları belirlendi ve protein kaliteleri SDS-PAGE analizi ile teyit edildi (Şekil 4.8). SDS-PAGE jeli üzerindeki temiz ve keskin bantlar sayesinde protein örneklerinin WB, 2-DE ve LC-MS/MS deneylerinde kullanılabilceği öngörüldü. Bu bağlamda yapılan ilk deneyde; farklılaşma

sürecinde hücre proteomunda meydana gelen değişiklikler 2-DE yapılarak takip edildi. Hücre kültürlerinden elde edilen protein konsantrasyonlarının düşük olması sebebi ile örnekler 7 cm'lik jeller kullanılarak izoelektrik noktalarına göre fokuslamaya tabi tutuldu.



**Şekil 4.8.** Nöronal farklılaşmaya tabi tutulan SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen protein özütlelerinin protein profillerine ait görüntü.

Ardından ikinci boyutta ayrıştırılan proteinler SYPRO Ruby boyası ile boyanarak resimleri çekildi (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Nörojenik farklılaşma sürecinde SH-SY5Y proteomunda meydana gelen değişikliklerin proteom düzeyinde 2-DE kullanılarak takip edilmesi. Şekilde; Sypro Ruby floresan boyası ile boyanmış jellere ait imajlar görülmektedir.

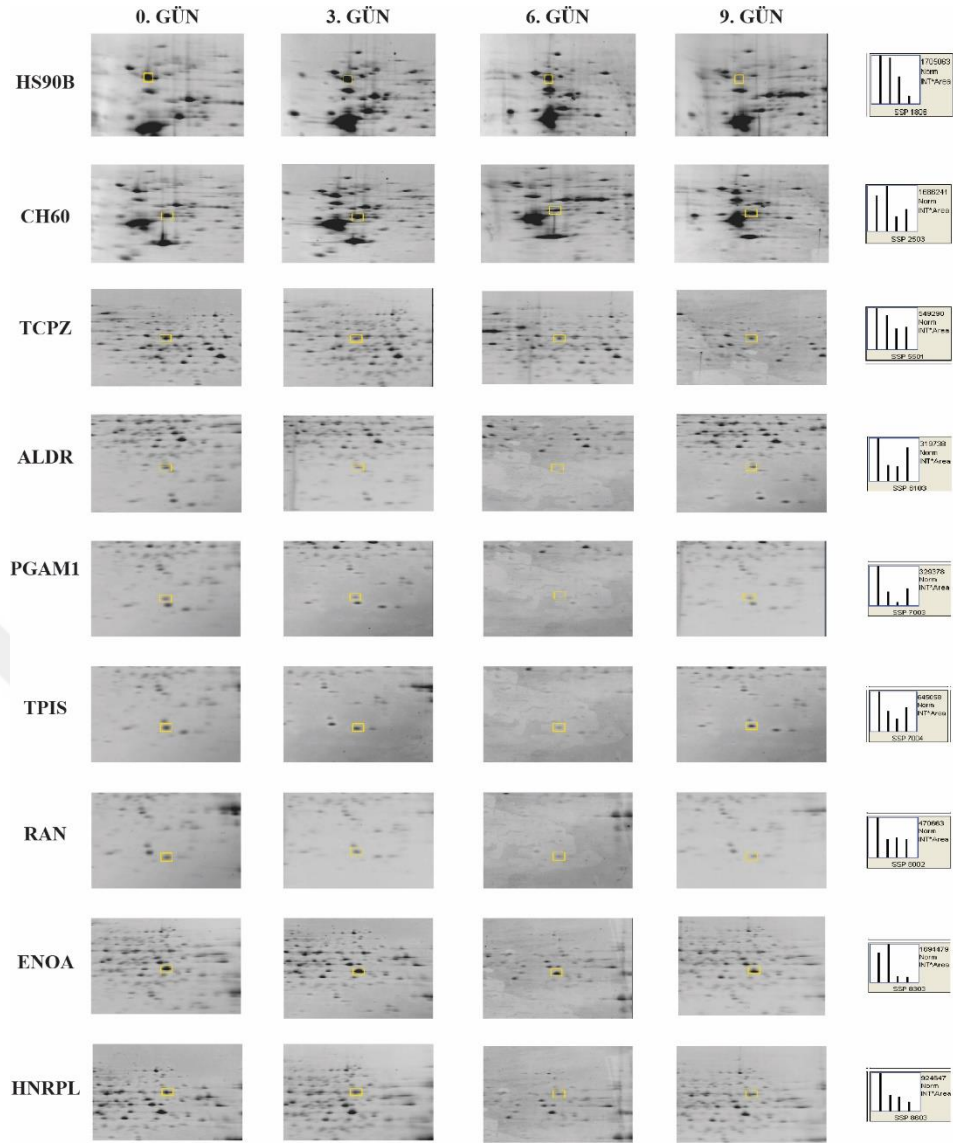
Sonrasında yapılan analizlerde jeller üzerinde bulunan 167 spot eşleştirilmiş ve jeller arası ortalama CV (varyasyon katsayısı) değerinin 41,23 olduğu görülmüştür. CV değeri; jeller arasındaki spot dağılımının benzerliğini göstermektedir. Düşük CV değeri (%20'nin altında) jellerin birbirine yüksek derecede benzediğini, yüksek CV değeri ise jeller arası benzerlikte sapmaların olduğunu ifade etmektedir. Örnekler arası regülasyona uğrayan proteinler jellerden kesilerek 'Yöntem' kısmında anlatıldığı gibi tanımlanmıştır (Bkz. 3.6). Kesilen 29 spottan sadece 13 tanesi yüksek MALDI skoru ile tanımlanabilmiştir (Tablo 4.5). Diğer spotların MALDI-TOF/TOF skorları düşük olduğu için değerlendirmeye alınmamışlardır.

**Tablo 4.5.** Seviyelerinde farklılaşma görülen protein spotlarına ait MALDI-TOF/TOF analiz sonuçları.

Protein Erişim Numarası	Protein Adı	Protein Kütlesi	Protein Skoru	Protein Tanımı	Beklenen
P08238	HS90B_HUMAN	83212	133	Heat shock protein HSP 90-beta (Isı şok proteini HSP 90-beta)	1e-009
P10809	CH60_HUMAN	61016	145	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa ısı şok proteini, mitokondriyal)	6.4e-011
P04264	K2C1_HUMAN	65999	72	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Keratin, tip II hücre iskeleti 1)	0.0011
P30101	PDIA3_HUMAN	56747	228	Protein disulfide-isomerase A3 (Protein disülfür-izomeraz A3)	3.2e-019

P40227	TCPZ_HUMAN	57988	93	T-complex protein 1 subunit zeta (T-kompleks protein 1 alt birim zeta)	9.9e-006
P04264	K2C1_HUMAN	65999	69	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Keratin, tip II hücre iskeleti 1)	0.0028
P15121	ALDR_HUMAN	35830	87	Aldose reductase (Aldoz redüktaz)	4.4e-005
P18669	PGAM1_HUMAN	28786	85	Phosphoglycerate mutase 1 (Fosfogliserat mutaz 1)	6.9e-005
P60174	TPIS_HUMAN	26653	392	Triosephosphate isomerase (Triosefosfat izomerazı)	1.3e-035
P06733	ENOA_HUMAN	47139	133	Alpha-enolase (Alfa enolaz)	1e-009
P62826	RAN_HUMAN	24408	188	GTP-binding nuclear protein (GTP bağlayıcı nükleer protein)	3.2e-015
P06733	ENOA_HUMAN	47139	370	Alpha-enolase (Alfa enolaz)	2e-033
P14866	HNRPL_HUMAN	64092	64	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Heterojen nükleer ribonükleoprotein L)	0,0084

MALDI-TOF/TOF ile tanımlanmış olan, yukarıda verilen, proteinlerin yakın çekimleri QuantityOne (Bio-Rad, ABD) yazılımı ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.10). Tanımlanan proteinlerin 0. gün'e göre regülasyon oranları saptanmıştır (Tablo 4.6). 'p' değeri 1'den büyük olduğu için K2C1 ve PDIA3 proteinleri değerlendirmeye alınmamışlardır.



**Şekil 4.10.** MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin yakın çekimlerinin QuantityOne (Bio-Rad, ABD) yazılımı ile değerlendirilmesi.

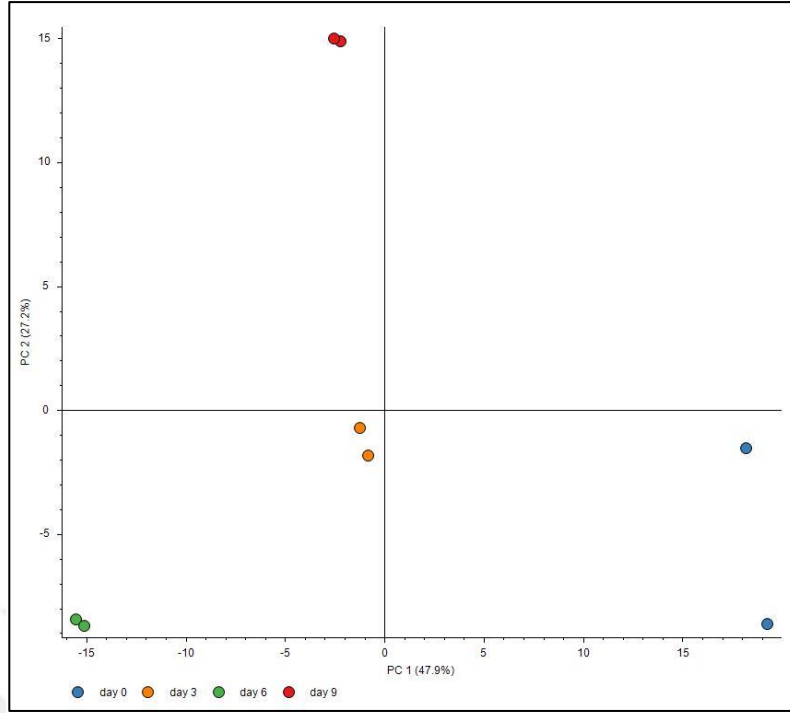
**Tablo 4.6.** MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin 0. gün'e göre regülasyon oranları (Açıklamalar: NR, Regülasyon yok (Not regulated); Up regülasyon>2.0).

Protein Accession	Day0/Day0 Oranı	Day3/Day0 Oranı	Day6/Day0 Oranı	Day9/Day0 Oranı	Regülasyon Eğilim Paterni
HS90B_HUMAN	1	NR	NR	6,25	↓
CH60_HUMAN	1	NR	2.4	NR	↓
TCPZ_HUMAN	1	NR	2	2	↓
ALDR_HUMAN	1	2,63	2,86	NR	↓
PGAM1_HUMAN	1	2,78	12,5	2,22	↓
TPIS_HUMAN	1	2	3,13	NR	↓
RAN_HUMAN	1	2,17	2	2,17	↓
ENOA_HUMAN	1	NR	5	5,56	↓
HNRPL_HUMAN	1	2,38	2,70	4,17	↓

2-DE deneylerinde tanımlanan ve farklı şekilde regülasyona uğrayan proteinler STRING analizine tabi tutuldu (Şekil 4.11). 1. ve 2. kabuklar için seçilen maksimum etkileşim sayısının 5'ten fazla olmaması durumunda gerçekleştirilen STRING analizi sonucunda, özellikle, protein katlanması (Yanlış Keşif Oranı (FDR):  $2.41e-20$ ), şaperon aracılı protein katlanması (FDR:  $9.91e-20$ ) ve 'de novo' protein katlanması (FDR:  $2.56e-19$ ) ile ilişkili yollara sebebiyet veren bir etkileşimin olduğu gözlemlendi.





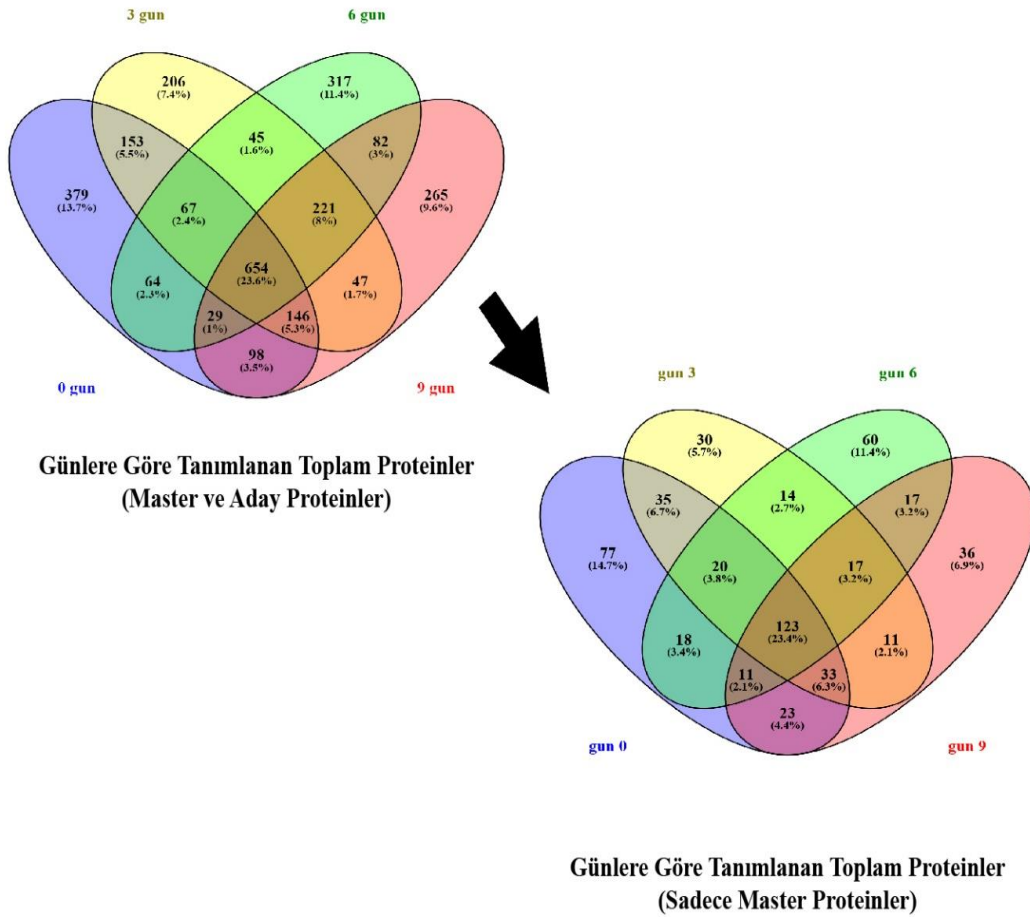


**Şekil 4.12.** nLC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen verilerin sınıflandırılması için yapılan PCA analizi.

Yapılan analizlerde farklılaşma süreci hakkında ciddi bilgiler verebilecek proteinlerin tanımlanmış olduğu görüldü (Ek-2). nLC-MS/MS analizi sonucunda toplamda tüm örneklerle ait (Master ve Aday proteinlerin hepsi) 2773 farklı protein tanımlandı (Şekil 4.13). Bunun yanı sıra, 0. Gün'e ait 340 adet, 3. Gün'e ait 283 adet, 6. Gün'e ait 280 adet ve 9. Gün'e ait 271 adet 'Master Protein' tanımlandı (Tablo 4.7). 'Master Protein'ler arasında 123 adet proteinin tüm gruplar arasında ortak olduğu belirlendi. Yalnızca 0. gün'e ait 77 adet 'Master Protein' tanımlandı. Buna karşın yalnızca 9. gün'e ait 36 adet 'Master Protein' belirlendi. Ara zaman noktaları için gerçekleştirilen yalnızca 3. ve 6. gün analizlerinde, sırasıyla, 30 ve 60 adet 'Master Protein' tanımlandı. Tüm gruplarda tanımlanan 'Master Proteinler'in en çok 0. gün'de tanımlananlar ile ortak proteinlere sahip oldukları dikkat çekti. Özellikle 3. gün ve 0. gün'ün 35 adet ortak 'Master Protein'e sahip oldukları gözlemlendi.

**Tablo 4.7.** Ara zaman noktalarına göre nLC-MS/MS analizi ile tanımlanan proteinler.

Örnek	Tanımlanan Proteinler (Master)	Tanımlanan Proteinler (Master ve Aday)
0. Gün	340	1590
3. Gün	283	1539
6. Gün	280	1479
9. Gün	271	1542



**Şekil 4.13.** nLC-MS/MS analizi sonucunda ara zaman noktalarına göre tanımlanan proteinlere ait Venn şemaları.

nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin erişim numaraları Uniprot Protein veritabanından teyit edilerek yeni bir liste oluşturuldu. Ardından, tanımlanan proteinlerin analizlerini gerçekleştirmek için gruplar arası düzenli bir artış ya da azalış sergileyen proteinler saptandı. Ayrıca, her bir grup içinde (0. Gün, 3. Gün, 6. Gün ve 9. Gün) tanımlanan proteinlere tek tek 'PANTHER' yolak analizi uygulanarak ilgili yolaklar hakkında bilgiler edinildi. Özellikle 0. Gün (farklılaştırılmadan önce) analizinde G protein ve G protein kenetli reseptörler ile ilgili yolaklara rastlanırken, 9. Gün (farklılaştırılmış) analizinde ise nöronal yolaklara rastlandı. Bu yolakların detayları Ek-2'de verilmektedir.



## 5. TARTIŞMA

Nörobilim çalışmalarının en zor kısımlarından bir tanesi bu çalışmalarda kullanılacak olan biyolojik materyallerin ulaşımında yaşanan ciddi zorlukların olmasıdır (Kasap ve ark., 2017). Çalışılacak olan biyolojik materyalin kökeni ve işlevini kaybetmeden önce temin edilebilmesi gibi zorluklarla karşı karşıya kalınmaktadır. Hali hazırda kullanılabilen en temel modelleme sistemleri arasında hücre kültürleri, beyin doku örnekleri ve hayvan modelleri yer almaktadır. Bu modellerin yanı sıra *C. elegans* ve *D. melanogaster* gibi modeller ile son dönemde kök hücrelerin model olarak kullanımı da nörobilim çalışmalarında yerlerini almıştır. Özellikle kök hücre çalışmalarında nörojenik farklılaştırmaya tabi tutulmuş olan pluripotent mezenkimal ya da iPS kökenli kök hücrelerin kullanımı bu alanda yerlerini almıştır. Ancak kök hücre kültürlerinin pahalıya mal oluşu, iyi karakterize edilmelerinde yaşanan zorluklar ve farklılaştırma çalışmalarında kültür içerisindeki hücrelerin %100 farklılaşamamaları gibi nedenlerden dolayı kök hücre çalışmalarında da sıkıntılarla karşı karşıya kalınmaktadır. SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri bu bağlamda kök hücrelerde yaşanan sıkıntıların aşılması adına ideal hücrelerdir. Özellikle bu hücrelerin karakterizasyonlarının genom düzeyinde iyi çalışılmış olması ve kültür ortamında homojen bir davranış sergilemeleri nörodejeneratif hastalıkların hücre kültürü düzeyinde modellenmesine imkân tanımaktadır (Krishna ve ark., 2014). Ayrıca, SH-SY5Y hücreleri ile farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilen deneylerin tekrar edilebilir olması da ciddi bir avantaj sağlamaktadır.

SH-SY5Y hücre hattı nöroblastoma kökenli hücreler olup, 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliğinden izole edilen SK-N-SH hücre hattından ‘subklonlama’ yöntemi ile elde edilmiştir. Bu hücrelerin en önemli özellikleri arasında nörojenik farklılaştırmaya tabi tutulabilmeleri ve nöronal olarak farklılaşabilme yetenekleri yer almaktadır. Geçmiş dönemlerde yapılan çalışmalar bu hücrelerin db-cAMP (Kuramoto, Werrbach-Perez, Perez-Polo, & Haber, 1981; Tojima, Kobayashi, & Ito, 2003), TPA (Guarneri, Cascio, Piccoli, Piccoli, & Guarneri, 2000; Jalonen & Akerman, 1988; Pahlman ve ark., 1981; Presgraves ve ark., 2004), RA (Pahlman ve ark., 1984), BDNF (Spina, Squinto, Miller, Lindsay, & Hyman, 1992), vanadat (Rogers ve ark., 1994), NGF (Lavenius, Gestblom, Johansson, Nanberg, & Pahlman, 1995; Oe ve ark., 2005), kolesterol (Sarkanen ve ark., 2007), estradiol E2

(Teppola, Sarkanen, Jalonen, & Linne, 2016) ve nörogulin (Agholme ve ark., 2010) gibi ajanlarla nöronal farklılaştırmaya tabi tutulabildiklerini göstermiştir. Kullanılan farklılaştırma ajanları arasında özellikle RA'in en çok tercih edilen ajan olduğu görülmektedir. RA ve BDNF en etkili nöronal farklılaşmayı sağlamış ve son dönemde yapılan farklılaştırma çalışmalarında ya tek tek ya da ardaşık olarak farklılaştırma deneylerinde kullanılmışlardır (Encinas ve ark., 2000; Forster ve ark., 2016; Shipley ve ark., 2016; Teppola ve ark., 2016). Bu çalışmada gerçekleştirilen nörojenik farklılaştırma deneylerinde de RA, BDNF, db-cAMP ve B-27 kullanılmıştır. Ayrıca farklılaştırma sürecinde 'sodyum piruvat' içermeyen DMEM besiyeri kullanılarak SH-SY5Y hücrelerinin S-tip yani epitel benzeri hücrelerden ziyade N-tip yani nöron benzeri hücrelere farklılaştırılma ihtimali kuvvetlendirilmiştir (Forster ve ark., 2016). RA'nın hücre proliferasyonunu etkilediği ve nöritlerin büyümesini tetiklediği daha önce gösterilmiştir (Nicolini ve ark., 1998; Pahlman ve ark., 1984). BDNF'in nöronların hayatta kalmasını arttırdığı, yeni nöronların farklılaşarak oluşmasını tetiklediği yayınlarda rapor edilmiştir (Encinas ve ark., 2000; Goldie, Barnett, & Cairns, 2014). db-cAMP'nin ise farklılaşan hücrelerin dopaminerjik nöron benzeri hücrelere doğru yönelmesine yardımcı olmakla beraber dopaminerjik nöronlar için anahtar bir enzim olan TH'nin aktivitesinde artışa neden olduğu bilinmektedir (Kume ve ark., 2008). Nörobazal besiyeri ile birlikte kullanılan B-27 takviyesinin de nöron gelişiminde ve nöronların uzun süreli hayatta kalmalarında rol oynadığı belirtilmektedir (Shipley ve ark., 2016).

Çalışma kapsamında kullanılması planlanan farklılaştırma protokolü Shipley ve ark. tarafından 2016 yılında yayınlanmış olan protokoldü (Shipley ve ark., 2016). Ancak başlangıç döneminde gerçekleştirilen nörojenik farklılaştırma deneylerinde ciddi problemler ile karşı karşıya kalındı ve yaklaşık 4 ay süren bir vakit kaybı yaşandı. Farklılaştırmaya tabi tutulan SH-SY5Y hücrelerinin, protokolün onuncu gününde, ECM ile kaplı kültür tabaklarına alınırken kültür tabaklarına tutunmakta zorluk çektikleri gözlemlendi. Ayrıca, nöronal farklılaştırma protokolü boyunca da hücrelerin ölüm oranının yüksek olduğu ve nöronal farklılaştırmaya direnç gösterdikleri saptandı. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda bazı makalelerde farklılaştırma deneylerinde kullanılacak olan hücrelerin, ön şart olarak, aşırı pasaja maruz kalmamaları gerektiği belirtilmekteydi. Çünkü pasaj sayısı arttıkça hücre hatlarında 'replicative senescence' yani replikatif hücre yaşlanması görülebilmekteydi

(Falkenburger & Schulz, 2006). Bu bağlamda, yaşanan sorunların kaynağının laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin uzun süredir pasajlanıyor olmasına dayanabileceği düşünüldü. Bu nedenle mevcut hücreleri kullanmak yerine ‘American Type Culture Collection’ dan (ATCC, ABD) yeni bir SH-SY5Y hücre hattının satın alınması planlandı. Bu tez çalışması üniversitemizin ‘Bilimsel Araştırmalar Projesi’ (BAP) birimi tarafından desteklenmektedir. Ancak onaylanan proje bütçelerinin doktora tezlerini yönetebilmek açısından yetersiz kalması sebebi ile proje süreçlerinde bazı mali kısıtlamalar yaşanabilmektedir. Bu yüzden de proje için gerekli olan yeni SH-SY5Y hücreleri doğrudan ATCC’den alınamadı. Diğer üniversitelerdeki laboratuvarlar ile yapılan görüşmeler sonucunda İstanbul Teknik Üniversitesi (İTÜ)’de pasaj sayısı 20 (P=20) olan SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu ve bu hücreleri laboratuvarımızla paylaşabilecekleri öğrenildi. Bu hücreler İTÜ’den laboratuvarımıza transfer edildi. Ardından, hücreler çoğaltılarak stok kültürleri yapıldı ve saklamaları alındı. Sonrasında ise çalışmalara bu hücreler ile devam edildi. Yapılan ilk deneylerde başarılı sonuçlar elde edildi ve hücrelerin morfolojilerinde nöronal farklılaşma gözlemlendi. Ancak Shipley ve ark. (2016) tarafından önerilen protokolün oldukça uzun bir protokol olması nedeni ile protokol sonunda elde edilen hücre sayılarının hem protein hem IF hem de RNA çalışmalarını yürütebilecek düzeyde olmadığı fark edildi. Tekrar yapılan literatür taraması sonucunda, farklı yayınlarda farklı nöronal farklılaştırma protokollerinin kullanıldığı ve farklılaştırmanın daha kısa sürede başarılabilirdiği tespit edildi (Encinas ve ark., 2000; Forster ve ark., 2016; Kovalevich & Langford, 2013; Shipley ve ark., 2016). Sonuç olarak; bu yayınlardan yola çıkılarak dokuz günlük ve iyileştirilmiş bir optimize protokol oluşturuldu. Yapılan ön deneme çalışmalarında kullanılan optimize farklılaştırma protokolü ile SH-SY5Y hücrelerinin dokuz gün gibi kısa bir süre içerisinde morfolojik olarak nöron-benzeri hücrelere yüksek oranda farklılaştıkları gözlemlendi. Ayrıca, farklılaşma kültüründeki ölüm oranının önceki protokole göre daha düşük seyrettiği görüldü. Bu aşamadan sonra projede yeni geliştirilen farklılaştırma protokolünün uygulanmasına karar verildi.

Proje kapsamında önerildiği üzere nöronal farklılaşma sürecini karakterize etmek için IF boyama çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan bazı markör proteinlerin ekspresyonları farklılaştırmaya tabi tutulmamış hücrelerde de gözlemlenmekteydi. Ancak test edilen tüm markörlerin ifade miktarlarında farklılaşma süreci boyunca ciddi artışlar

gözlemlendi. Özellikle NeuroD1 ve Neun düzeylerindeki artışlar dikkat çekiciydi. Literatürde bahsedilenin aksine 0. ve 9. gün boyamalarında TH pozitivitesi gözlemlenemedi. Bu deney iki farklı markadan temin edilen antikolar ile tekrar edilmesine rağmen aynı sonuçlar elde edildi. Bu bulgu farklılaşan hücrelerin dopaminerjik nöron benzeri hücrelerden ziyade diğer nöron benzeri hücelere farklılaşabilme ihtimallerine işaret ediyordu. 9. gün deneylerinde, tüm markör proteinlere ek olarak, alfa-tubulin de hücre morfolojisinin görüntülenmesi amacı ile çalışıldı. SH-SY5Y hücrelerinin başarılı bir şekilde nöronal olarak farklılaştıklarının göstergelerinden olan uzamış nöritlerin varlığı, dallanma ve hücreler arası ağ oluşumu ise oldukça göze çarpan bir durumdaydı.

IF boyamalarına ek olarak, nöronal farklılaşmayı karakterize etmek amacıyla gerçekleştirilen WB deneyleri proje kapsamında en çok zaman ve kaynak harcayıp en zor sonuç alınan kısmı oluşturdu. Bu amaçla Western BLoT Immuno Booster ve Western BLoT Blocking Buffer (Takara Bio Inc., Japonya), Signal Enhancer HIKARI (Nacalai Tesque Inc., ABD) gibi kimyasal ve SNAP i.d. 2.0 Protein Detection System (Merck Millipore, Almanya) gibi teknik ekipmanlar ile tüm WB deneyleri optimize edilmeye çalışıldı. Tekrarlanan deneyler sonucunda, nonspesifik bantlardan olabildiğinde uzaklaşmak adına, tüm primer antikolar %1 yağsız süt tozu içeren bloklama solüsyonu ile hazırlandı. IF mikrokopi çalışmalarında gözlemlenebilmesine rağmen orta beyin dopaminerjik nöronlarının spesifikasyonunda rol oynayan Nurr1 nöronal markör proteininin ifade seviyesi WB yöntemi ile gözlemlenemedi. Oysaki literatürde nöronal farklılaşma esnasında artması beklenilmekte idi (Sakurada ve ark., 1999). Diğer taraftan, diğer nörojenik markör proteinlerine ait ilgili protein bantları arzu edilen kalite ve seviyede olmasa da (Nestin, NeuroD1 ve NeuN) WB yöntemi ile tayin edilebildi. En yüksek Nestin seviyesi 0. gün'de yani farklılaşmayan hücelere ait örneklerde görüldü. Literatür taraması yapıldığında da Nestin proteininin seviyesinin terminal nöronal hücre farklılaşması sırasında azalması beklenilmekte idi (Duggal & Hammond, 2002). İlginç bir şekilde Neun proteininin olgun nöronlarda eksprese olması beklenilmekteyken (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015), yapılan WB çalışmalarında Neun proteininin ifade seviyesinde zamanla azalma görüldü. Nöronal farklılaşma sırasında TH düzeylerindeki değişimler WB yöntemi ile incelenmesine rağmen gözlemlenemedi. Hatta bu amaçla yapılan deneylerde iki farklı TH epitopunu tanıyan iki farklı TH antikoru kullanıldı. Bu bulgu TH ifadesinin IF mikroskopi ile



görülememesini de açıklamaktaydı. Oysaki TH'nin katekolaminerjik yolakta hız sınırlayıcı enzim olarak rol oynadığı bilindiği için farklılaşma süreci sonunda ekspresyonunun artması beklenilmekte idi (Gates ve ark., 2006). Yapılan WB deneyleri sonucunda TH düzeylerindeki değişimlerin belirlenememesi, farklılaşan hücrelerin dopaminerjik nöron-benzeri hücrelerden ziyade diğer nöronal hücre tiplerine doğru farklılaşmış olabilecekleri sorusunu akla getirdi. Bu soruya cevap verebilmek için D1DR, D2DR, DAT ve DDC proteinlerindeki değişimlere bakıldı. Bu proteinlerin dopamin sentezi ve homeostazında görev alan diğer proteinler olmalarından dolayı ifade seviyelerinin farklılaşma sürecinde artması beklenilmekte idi (Nestler & Aghajanian, 1997; Storch ve ark., 2004). Yapılan WB deneyleri sonucunda bu proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki görülen artış hücrelerin dopaminerjik nöron-benzeri hücrelere farklılaştığına işaret etmektedir. WB çalışmaları sırasında PH'nın oluşumunda rol oynadıkları bilinen DJ-1, PINK1, VPS35, SNCA ve Parkin (Scott ve ark., 2017) proteinlerinin seviyelerindeki değişimler de incelendi. DJ-1 ifade seviyelerinin farklılaşma süresince değişmediği gözlemlendi. Oysaki DJ-1 proteininin farklılaştırma sürecinde nöroprotektif etkisinden dolayı ifade seviyesinde artış beklenmekteydi (Lopes ve ark., 2010). Parkin düzeyleri 3. Gün örneklerinde az bir artış göstererek farklılaşma süresince zayıf seyretti. PINK1 ifade düzeyi iki farklı PINK1 epitopunu tanıyan iki farklı antikor ile çalışıldı ve farklılaşma süreci boyunca tüm örneklerde görüldü. SNCA ifade düzeyi, ilginç bir şekilde, sadece pozitif kontrol doku lizatında gözlemlenebildi. Oysaki İnsan Protein Atlası (The Human Protein Atlas, İsveç) veritabanında farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücrelerinde SNCA ekspresyonunun varlığı belirtilmektedir. VPS35 ifade düzeyinin ise özellikle 3. gün örneğinde arttığı, sonrasında ifade düzeyinin azaldığı görüldü. Nöronal farklılaştırma süreci sonrasında bu proteinlerden beklenen ekspresyon profilleri hakkında detaylı bilgi henüz literatürde yer almamaktadır. Burada sunulan verilerin bu alanda yapılacak olan çalışmalara ışık tutması hedeflenmektedir. Yapılan her deneyden sonra strip edilen membranlar 'internal kontrol' olarak kullanılan Aktin antikoruna ile tekrar blotlanarak kontrol edildi. Aktin ifadesinin farklılaşma süresince değişmeden kaldığı görüldü.

IF ve WB çalışmaları sonucunda takip edilen markörlerin ifade düzeylerinin bazı noktalarda literatür ile uyuşmadığı görüldü. Yapılan literatür taraması sonucunda, farklı çalışmalar arasında yaşanan bu varyasyonların sebeplerinin her laboratuvar için kullanılan

farklılaştırma yöntemlerinin (farklılaştırma ajanları, besiyerleri, farklılaştırma süreci gibi) farklı olması, hücre kaynaklarının farklı olması ve kullanılan hücrelerin epigenetik karakterleri ile ilgili olabileceği anlaşılmıştır (Xicoy ve ark., 2017).

Farklılaşma sürecini daha iyi değerlendirebilmek ve elde edilen verileri kendi içlerinde doğrulayabilmek için qRT-PCR çalışmaları yapıldı. qRT-PCR deneylerinde gerekli olan primerlerin temin edilebilmesi için sahip olunan mali imkânların yetersizliği sonucunda proje kapsamındaki SNCA ve LRRK2 genlerine ait qRT-PCR primerleri sipariş edilemediği için çalışılmadı. Farklılaşma sürecinde SH-SY5Y hücrelerinden izole edilen RNA'ların yürütüldüğü formaldehit-agaroz jeller RNA'ların kalitesinin ve bu RNA'lardan sentezlenecek olan cDNA'ların çalışma için uygun olduklarını gösterdi. DDC, Park2, TH, DJ1, DRD1, PINK1, VPS35, NeuN, Aktin, NeuroD1, Nurr1, Nestin ve DAT genlerine ait primerler kullanılarak qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Ayrıca, literatür araştırmalarında 'internal kontrol' olarak GAPDH geninin tavsiye edildiği görüldü. Çünkü Aktin gen seviyesi farklılaşma süreci boyunca stabil kalamıyordu. Bu durum yapılan ön deneme qRT-PCR çalışmalarında da gözlemlendi. Dolayısıyla Aktin yerine GAPDH geni 'internal kontrol' olarak belirlenerek qRT-PCR çalışmalarına devam edildi. qRT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen gen ekspresyonlarının regülasyonlarına istinaden nöronal bir fenotipin oluştuğu görüldü. 0. ve 9. gün'lerdeki genlerin ifade seviyeleri karşılaştırıldığında, 9. gün'deki genlerin ekspresyonlarında 0. gün'e oranla artış olduğu tayin edildi. Farklılaşma sürecinin ara zaman noktaları olan 3. ve 6. günler'deki ekspresyon dalgalanmaları her bir geninin farklılaştırma ajanlarına karşı olan tepkileri ile ilişkilendirildi. 6. gün'de, muhtemelen BDNF'in besiyerine eklenmesi ile, bakılan genlerin ifade seviyelerinde belirgin farklılıklar görüldü.

Çalışmanın bir diğer basamağında, nöronal farklılaşma sürecinin protein/proteom düzeyinde incelenebilmesi için 2-DE ve nLC-MS/MS çalışmaları yapıldı. İyileştirilen farklılaştırma protokolüne rağmen özellikle 9. gün'e doğru, hücreler nöronal olarak farklılaştıkça, hayatta kalma seviyelerinin az da olsa düştüğü görüldü. Hücre kültürü deneylerinin planlanması WB, 2-DE ve nLC-MS/MS çalışmalarının yürütülebileceği miktarda protein elde etmek üzere tasarlanmıştı. Ancak özellikle WB çalışmasında beklenen sonuçların elde edilememesinden dolayı tekrar edilen deneylerde projenin WB basamağı için ayrılan protein

miktarlarından daha fazlası kullanıldı. Bu nedenle 2-DE deneylerinde daha az protein miktarına ihtiyaç duyan 7 cm IPG stripler tercih edildi. İlk olarak 7 cm, pH 3-10, NL IPG stripler kullanılarak protein örnekleri birinci boyutta izoelektrik noktalarına göre fokuslandı. Ardından, ikinci boyutta ayırım gerçekleştirilerek regülasyon paterni görülen protein spotları belirlendi ve jellerden kesildi. Kesilen protein spotları tayin edilmek üzere MALDI-TOF/TOF cihazına verildi. Bu noktada kesilen 29 spottan 13 tanesi yüksek MALDI skoru ile tanımlanabilmiştir. Diğer spotların MALDI-TOF/TOF skorları düşük olduğu için değerlendirmeye alınmamışlardır. Tanımlanan proteinlerin PANTHER yolak analizi yapıldığında ilginç bir şekilde sadece 'glikoliz' yolağı (P00024) ile karşılaşıldı. Özellikle, MALDI-TOF/TOF çalışması sonucunda tanımlanan 'Enolaz' ve 'Triosefosfat izomeraz' glikolitik enzimlerinin varlığı 'glikoliz' yolağının elde edilmesini anlamlı kılmıştır. Tanımlanan proteinler ile gerçekleştirilen STRING analizi sonucunda heksoz oluşumuna yol açan yolaklarla ilişkili 4 adet protein (ENOA, PGAM1, TPIS ve ALDR) belirlendi. ENOA, PGAM1 ve TPIS proteinlerinin 'glukoneogenez' yolağıyla da etkileşim içinde olduğu gözlemlenmiştir. Bunların yanı sıra 'glikoliz' ve 'karbonhidrat metabolizması' da etkileşim içinde olunan yolaklar arasında yer almaktadır. Nöronal farklılaşma sürecinde hücrel homeostazı sağlamak için enerji metabolizmasının aktif olduğu, özellikle, mitokondrinin nöronal gelişimin düzenlenmesinde rol oynadığı literatürde yer almaktadır (Maffezzini, Calvo-Garrido, Wredenberg, & Freyer, 2020). 1. ve 2. kabuklar için seçilen maksimum etkileşim sayısının 5'ten fazla olmaması durumunda gerçekleştirilen STRING analizi sonucunda, özellikle, protein katlanması, şaperon aracılı protein katlanması ve 'de novo' protein katlanması ile ilişkili yolaklara sebebiyet veren bir etkileşimin olduğu gözlemlendi. Böylece nöronal farklılaşma sürecinde protein katlanması ile ilişkili proteinlerin sentezlenmeye başladığı anlaşıldı. Farklılaşmış ve stres altındaki hücrelerin protein katlanma işlemlerinde, farklılaşmayan hücrelere oranla, değişimlerin olduğu ve hücrel ortamdaki değişikliklerin morfolojik, proteazomal ya da post translasyonel modifikasyonlar (PTM) gibi etkilere yol açtığı bilinmektedir (Gnutt, Sistemich, & Ebbinghaus, 2019). Dolayısıyla, STRING analizi ile elde edilen bulguların literatür ile de örtüştüğü görülmüştür.

nLC-MS/MS tandem kütle spektrometre sistemi ile tanımlanan proteinlerin analizlerinde gruplar arası düzenli bir artış ya da azalış sergileyen proteinler saptandı. Tanımlanan proteinler arasında, nöronal farklılaşma sırasında, 'Hücrel retinoik asit bağlayıcı protein

2'nin (P29373) azalan bir profil sergilemesinin farklılaşma sürecinde kullanılan besiyerlerinin içerikleri ile doğru orantılı olabileceği kanısına varıldı. 2-DE çalışması ile önceden tanımlanmış olan 'GTP bağlayıcı nükleer protein Ran' (B5MDF5) nLC-MS/MS ile de azalan bir profil sergileyerek tanımlandı. Diğer taraftan, nörotrofik faktör görevi gören ve nörogenesi teşvik edici özelliği ile bilinen 'Neudesin' proteini (Q9UMX5) de farklılaşma sürecinde artan bir profil sergileyerek tanımlandı (Moutaoufik ve ark., 2019). Ayrıca, nörogenizde rol oynayan 'Nörosekretuar protein VGF' (O15240) de farklılaşma sürecinde artan bir profil sergileyerek nLC-MS/MS ile tayin edildi. Yalnızca 9. gün'de tanımlanan proteinler incelendiğinde, dopaminin noradrenaline dönüşümünde rol oynadığı bilinen 'Dopamin beta-hidroksilaz' proteini (P09172) ile karşılaşıldı (Lamouroux ve ark., 1987). Tanımlanan bu protein ile farklılaşma süreci sonucunda katekolaminerjik özelliklere sahip bir fenotipin oluştuğu desteklenmektedir. Nöronal gelişimde rol oynayan MAP2 proteini (A0A024R3Z1) de yalnızca 9. gün'de tanımlandı. Nöronal fenotipi destekleyen proteinlerin yanı sıra 'Tubulin alfa-1B zinciri (P68363), Tubulin'e özgü şaperon A (E5RJD8) ve Sitoplazmik dinein 1 ara zincir 2 (Q13409)' gibi hücre iskeleti ile ilişkili proteinler ve nörotransmitter salınımında rol oynayan 'Sinaptozomal ilişkili protein 25' protein (P60880) de yalnızca farklılaşan hücrelerde tanımlanmıştır. nLC-MS/MS tandem kütle spektrometresi ile gerçekleştirilen proteom çalışmasında, yalnızca 0. gün PANTHER yolak analizinden elde edilen verilere göre; 0. gün'de daha çok G protein ve G protein kenetli reseptörler ile ilgili yollara rastlanmıştır. Yalnızca 3. gün PANTHER yolak analizinden elde edilen verilere göre; anjiyogenez, sinyal transdüksiyon ve apoptozis ile ilgili yollar saptandı. Devamında, yalnızca 6. gün için yapılan PANTHER yolak analizinde enerji metabolizması ile ilgili yollara rastlandı. Yalnızca 9. gün için yapılan PANTHER yolak analizinde ise nöronal depolarizasyon ve katekolamin sentezi ile ilgili yollar tayin edildi. İlginçtir ki 0. gün, 3. gün ve 9. gün PANTHER yolak analizlerinin kesişiminde sadece 'Dopamin reseptörü aracılı sinyal yolağı' (P05912) saptandı. 0. gün, 6. gün ve 9. gün PANTHER yolak analizlerinin kesişiminde ise sadece 'Gonadotropin salgılatıcı hormon reseptör yolağı' (P06664) tayin edildi. nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin PANTHER yolak analizi sonucunda tahmin edilen bu yolların enerji metabolizmasına bağımlı yollar olmaları ile MALDI-TOF/TOF yöntemi ile tanımlanan proteinlerin PANTHER yolak analizi sonucunda 'glikoliz' yolağı ile karşılaştırılması arasında uyumlu bir bağlantının olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında nLC-MS/MS deneyleri sonucunda yalnızca 9. gün'de tanımlanan MAP2 proteinini doğrulamak amacı ile MAP2 qRT-PCR primeri de sipariş edildi ve ardından MAP2 genine ait qRT-PCR çalışması da yapıldı. qRT-PCR çalışmasından elde edilen verilere göre MAP2 geninin ekspresyon seviyesinin 0. gün'e oranla 9. gün'de artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, nLC-MS/MS ve qRT-PCR verileri birbirlerini doğrulayıcı nitelik taşımaktadır. Ancak zamansal ve tez çalışmasının bütçesel durumu göz önünde bulundurulduğunda, 2-DE ve nLC-MS/MS çalışmalarından elde edilen verilerin WB ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak doğrulanabilmesi için yeterli zaman ve kaynağa sahip olunamadığı dikkate alınmalıdır.



## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu tez projesi ile SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri laboratuvarımızda kendi geliştirmiş olduğumuz, dokuz günlük, optimize bir protokol ile nörojenik farklılaşmaya tabi tutularak yüksek oranda nöronal olarak farklılaşmış hücre elde edilmiştir.

IF çalışmaları tamamlanarak nörojenik farklılaşma markörlerinin (Nestin, Neun, NeuroD1 ve Nurr1) farklılaşma sürecindeki ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Literatürde nöronal markörlerin ifade düzeyleri ile ilgili çelişkili sonuçların bulunmasına rağmen yapılan IF çalışması sonucunda SH-SY5Y hücrelerinin nöronal olarak farklılaştıklarının göstergeleri olan uzamış nöritlerin varlığı, dallanma ve hücreler arası ağ oluşumu gözlemlenmiştir. Yapılan hücre kültürü ile IF çalışması birbirlerini doğrulamıştır.

WB deneyleri yapılarak nörojenik farklılaşma (Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DAT) ve PH ile ilişkili (PARK2, DJ-1, PINK1, SNCA ve VPS35) markörlerin farklılaşma sürecindeki ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Elde edilen ekspresyon profilleri sonucunda, bu hücrelerin dopaminerjik nöron benzeri hücrelere farklılaştıkları saptanmıştır. Yapılan hücre kültürü ile WB deneyleri birbirlerini doğrulamıştır.

2-DE ve nLC-MS/MS deneyleri yapılarak nörojenik farklılaşma sürecinde dört farklı ara zaman noktasına ait protein profilleri, ilişkili protein regülasyonları ve yolları belirlenmiştir. Yapılan biyoinformatik analizlerin yardımı ile enerji metabolizması ve katekolaminerjik yollara dair ip uçları elde edilmiştir.

qRT-PCR deneyleri için dört farklı ara zaman noktasından RNA izolasyonları ve cDNA sentezleri yapılmıştır. 14 farklı gene (Nestin, Neun, NeuroD1, Nurr1, TH, DDC, DRD1, DAT, PARK2, PINK1, DJ-1, VPS35, MAP2 ve Aktin) ait ekspresyon profilleri saptanmıştır. Elde edilen verilere göre bu hücrelerin nöronal olarak farklılaştıkları, özellikle, dopaminerjik nöron benzeri bir fenotipe doğru yönelmiş oldukları bir kez daha qRT-PCR deneyleri ile doğrulanmıştır.

Bu tez çalışması ile nörojenik farklılaşmaya tabi tutulan SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik nöron benzeri bir fenotipe farklılaşmış oldukları protein/proteom düzeyinde teyit edilmiştir. Böylece bu hücrelerin *in vitro* PH modelleme çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilceği bir kez daha doğrulanmış ve geliştirilecek bir konu olarak bilim dünyasına sunulmuştur.



## 7. KAYNAKLAR

- Agholme, L., Lindstrom, T., Kagedal, K., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2010). An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis*, 20(4), 1069-1082. doi:10.3233/JAD-2010-091363
- Alberio, T., Bossi, A. M., Milli, A., Parma, E., Gariboldi, M. B., Tosi, G., . . . Fasano, M. (2010). Proteomic analysis of dopamine and alpha-synuclein interplay in a cellular model of Parkinson's disease pathogenesis. *FEBS J*, 277(23), 4909-4919. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07896.x
- Alberio, T., Colapinto, M., Natale, M., Ravizza, R., Gariboldi, M. B., Bucci, E. M., . . . Fasano, M. (2010). Changes in the two-dimensional electrophoresis pattern of the Parkinson's disease related protein DJ-1 in human SH-SY5Y neuroblastoma cells after dopamine treatment. *IUBMB Life*, 62(9), 688-692. doi:10.1002/iub.371
- Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol*, 7(11), 603-615. doi:10.1038/nrneurol.2011.150
- Arendt, T. (2000). Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain. *Neurobiol Aging*, 21(6), 783-796. doi:10.1016/s0197-4580(00)00216-5
- Ashe, K. H., & Zahs, K. R. (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*, 66(5), 631-645. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.031
- Athauda, D., & Foltynie, T. (2016). Challenges in detecting disease modification in Parkinson's disease clinical trials. *Parkinsonism Relat Disord*, 32, 1-11. doi:10.1016/j.parkreldis.2016.07.019
- Bano, D., Zanetti, F., Mende, Y., & Nicotera, P. (2011). Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death Dis*, 2, e228. doi:10.1038/cddis.2011.112
- Bauereis, B., Haskins, W. E., Lebaron, R. G., & Renthal, R. (2011). Proteomic insights into the protective mechanisms of an in vitro oxidative stress model of early stage Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 488(1), 11-16. doi:10.1016/j.neulet.2010.10.071
- Binder, L. I., Frankfurter, A., & Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*, 101(4), 1371-1378. doi:10.1083/jcb.101.4.1371
- Blackstock, W. P., & Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 17(3), 121-127. doi:10.1016/s0167-7799(98)01245-1
- Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., & Guarente, L. (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 278(40), 38966-38969. doi:10.1074/jbc.M307146200
- Blandini, F., & Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279(7), 1156-1166. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x
- Bove, J., Prou, D., Perier, C., & Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, 2(3), 484-494. doi:10.1602/neurorx.2.3.484
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259. doi:10.1007/bf00308809



- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, *180*(4596), 1200. doi:10.1038/1801200a0
- Carmona, S., Hardy, J., & Guerreiro, R. (2018). The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*, *148*, 395-408. doi:10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0
- Cenci, M. A. (2014). Presynaptic Mechanisms of l-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Frontiers in Neurology*, *5*(242). doi:10.3389/fneur.2014.00242
- Chang, D., Nalls, M. A., Hallgrimsdottir, I. B., Hunkapiller, J., van der Brug, M., Cai, F., . . . Graham, R. R. (2017). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nat Genet*, *49*(10), 1511-1516. doi:10.1038/ng.3955
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H., & National Institute for Clinical, E. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, *5*(3), 235-245. doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8
- Chen, N., & Reith, M. E. (2000). Structure and function of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol*, *405*(1-3), 329-339. doi:10.1016/s0014-2999(00)00563-x
- Cheng, B., Martinez, A. A., Morado, J., Scofield, V., Roberts, J. L., & Maffi, S. K. (2013). Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway. *Neurochem Int*, *62*(1), 31-42. doi:10.1016/j.neuint.2012.10.014
- Cheng, H. C., Ulane, C. M., & Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol*, *67*(6), 715-725. doi:10.1002/ana.21995
- Chiroma, S. M., Baharuldin, M. T. H., Mat Taib, C. N., Amom, Z., Jagadeesan, S., Ilham Adenan, M., . . . Moklas, M. A. M. (2019). Centella asiatica Protects d-Galactose/A $\beta$ 13 Mediated Alzheimer's Disease-Like Rats via PP2A/GSK-3 $\beta$  Signaling Pathway in Their Hippocampus. *Int J Mol Sci*, *20*(8). doi:10.3390/ijms20081871
- Chiu, F. C., Feng, L., Chan, S. O., Padin, C., & Federoff, J. H. (1995). Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*, *30*(1), 77-86. doi:10.1016/0169-328x(94)00280-r
- Colle, D., Hartwig, J. M., Soares, F. A., & Farina, M. (2012). Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. *Brain Res Bull*, *87*(4-5), 397-405. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.01.003
- Constantinescu, R., Constantinescu, A. T., Reichmann, H., & Janetzky, B. (2007). Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*(72), 17-28. doi:10.1007/978-3-211-73574-9\_3
- Daniel, G., & Moore, D. J. (2015). Modeling LRRK2 Pathobiology in Parkinson's Disease: From Yeast to Rodents. *Curr Top Behav Neurosci*, *22*, 331-368. doi:10.1007/7854\_2014\_311
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889-909. doi:10.1016/s0896-6273(03)00568-3

- Davies, A. M. (1994). The role of neurotrophins during successive stages of sensory neuron development. *Prog Growth Factor Res*, 5(3), 263-289. doi:10.1016/0955-2235(94)90010-8
- Dawson, T. M., Golde, T. E., & Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, 21(10), 1370-1379. doi:10.1038/s41593-018-0236-8
- Dayem, A. A., Kim, B., Gurunathan, S., Choi, H. Y., Yang, G., Saha, S. K., . . . Cho, S. G. (2014). Biologically synthesized silver nanoparticles induce neuronal differentiation of SH-SY5Y cells via modulation of reactive oxygen species, phosphatases, and kinase signaling pathways. *Biotechnol J*, 9(7), 934-943. doi:10.1002/biot.201300555
- Deng, H. X., Shi, Y., Yang, Y., Ahmeti, K. B., Miller, N., Huang, C., . . . Siddique, T. (2016). Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. *Nat Genet*, 48(7), 733-739. doi:10.1038/ng.3589
- Diedrich, M., Mao, L., Bernreuther, C., Zabel, C., Nebrich, G., Kleene, R., & Klose, J. (2008). Proteome analysis of ventral midbrain in MPTP-treated normal and L1cam transgenic mice. *Proteomics*, 8(6), 1266-1275. doi:10.1002/pmic.200700754
- Duggal, N., & Hammond, R. R. (2002). Nestin expression in ganglioglioma. *Exp Neurol*, 174(1), 89-95. doi:10.1006/exnr.2001.7838
- Eastwood, S. L. (2004). The synaptic pathology of schizophrenia: is aberrant neurodevelopment and plasticity to blame? *Int Rev Neurobiol*, 59, 47-72. doi:10.1016/S0074-7742(04)59003-7
- Edsjo, A., Holmquist, L., & Pahlman, S. (2007). Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol*, 17(3), 248-256. doi:10.1016/j.semcancer.2006.04.005
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., . . . Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, 75(3), 991-1003. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x
- Encinas, M., Iglesias, M., Llecha, N., & Comella, J. X. (1999). Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritegenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem*, 73(4), 1409-1421. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0731409.x
- Falkenburger, B. H., & Schulz, J. B. (2006). Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *J Neural Transm Suppl*(70), 261-268. doi:10.1007/978-3-211-45295-0\_40
- Filograna, R., Civiero, L., Ferrari, V., Codolo, G., Greggio, E., Bubacco, L., . . . Bisaglia, M. (2015). Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-SY5Y and BE(2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon Differentiation. *PLoS One*, 10(8), e0136769. doi:10.1371/journal.pone.0136769
- Forster, J. I., Koglsberger, S., Trefois, C., Boyd, O., Baumuratov, A. S., Buck, L., . . . Antony, P. M. (2016). Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *J Biomol Screen*, 21(5), 496-509. doi:10.1177/1087057115625190

- Gaardsvoll, H., Obendorf, D., Winkler, H., & Bock, E. (1988). Demonstration of immunochemical identity between the synaptic vesicle proteins synaptin and synaptophysin/p38. *FEBS Lett*, 242(1), 117-120. doi:10.1016/0014-5793(88)80997-9
- Gates, M. A., Torres, E. M., White, A., Fricker-Gates, R. A., & Dunnett, S. B. (2006). Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Eur J Neurosci*, 23(5), 1384-1390. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04637.x
- Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*, 10(5), 499-502. doi:10.1242/dmm.030205
- Gnutt, D., Sistemich, L., & Ebbinghaus, S. (2019). Protein Folding Modulation in Cells Subject to Differentiation and Stress. *Front Mol Biosci*, 6, 38. doi:10.3389/fmolb.2019.00038
- Goldie, B. J., Barnett, M. M., & Cairns, M. J. (2014). BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Front Cell Neurosci*, 8, 325. doi:10.3389/fncel.2014.00325
- Goldstein, M. N., Burdman, J. A., & Journey, L. J. (1964). Long-Term Tissue Culture of Neuroblastomas. II. Morphologic Evidence for Differentiation and Maturation. *J Natl Cancer Inst*, 32, 165-199.
- Gordon, J. A. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol*, 201, 477-482. doi:10.1016/0076-6879(91)01043-2
- Guarneri, P., Cascio, C., Piccoli, T., Piccoli, F., & Guarneri, R. (2000). Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *J Neurosci Res*, 60(5), 656-665. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(20000601)60:5<656::AID-JNR11>3.0.CO;2-6
- Guarnieri, S., Pilla, R., Morabito, C., Sacchetti, S., Mancinelli, R., Fano, G., & Mariggio, M. A. (2009). Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Dev Neurosci*, 27(2), 135-147. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.11.007
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., . . . et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772-1775. doi:10.1126/science.8209258
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-47.
- Hahn, M., Glass, T., & Koke, J. (2000). Extracellular matrix effects on a neuroblastoma cell line. *Cytobios*, 102(399), 7-19.
- Hashemi, S. H., Li, J. Y., Ahlman, H., & Dahlstrom, A. (2003). SSR2(a) receptor expression and adrenergic/cholinergic characteristics in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*, 28(3-4), 449-460. doi:10.1023/a:1022848718109
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia*, 32(8), 533-539. doi:10.1016/j.nrl.2015.06.011
- Hutton, M., Lewis, J., Dickson, D., Yen, S. H., & McGowan, E. (2001). Analysis of tauopathies with transgenic mice. *Trends Mol Med*, 7(10), 467-470. doi:10.1016/s1471-4914(01)02123-2

- Innala, M., Riebe, I., Kuzmenko, V., Sundberg, J., Gatenholm, P., Hanse, E., & Johannesson, S. (2014). 3D culturing and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells on bacterial nanocellulose scaffolds. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 42(5), 302-308. doi:10.3109/21691401.2013.821410
- Iwazaki, T., McGregor, I. S., & Matsumoto, I. (2006). Protein expression profile in the striatum of acute methamphetamine-treated rats. *Brain Res*, 1097(1), 19-25. doi:10.1016/j.brainres.2006.04.052
- Jack, C. R., Jr., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Feldman, H. H., Frisoni, G. B., . . . Dubois, B. (2016). A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*, 87(5), 539-547. doi:10.1212/WNL.0000000000002923
- Jalava, A., Heikkila, J., Lintunen, M., Akerman, K., & Pahlman, S. (1992). Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA). *FEBS Lett*, 300(2), 114-118. doi:10.1016/0014-5793(92)80176-h
- Jalonen, T., & Akerman, K. E. (1988). Single transient potassium channels in human neuroblastoma cells induced to differentiate in vitro. *Neurosci Lett*, 86(1), 99-104. doi:10.1016/0304-3940(88)90190-5
- Jamsa, A., Hasslund, K., Cowburn, R. F., Backstrom, A., & Vasange, M. (2004). The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(3), 993-1000. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.075
- Joshi, S., Guleria, R., Pan, J., DiPette, D., & Singh, U. S. (2006). Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene*, 25(2), 240-247. doi:10.1038/sj.onc.1209027
- Kaplan, D. R., Matsumoto, K., Lucarelli, E., & Thiele, C. J. (1993). Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. *Neuron*, 11(2), 321-331. doi:10.1016/0896-6273(93)90187-v
- Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10(3), 381-391. doi:10.1016/s0959-4388(00)00092-1
- Kasap, M., Akpinar, G., & Kanli, A. (2017). Proteomic studies associated with Parkinson's disease. *Expert Rev Proteomics*, 14(3), 193-209. doi:10.1080/14789450.2017.1291344
- Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., & Mork, S. J. (2003). Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol*, 18(12), 851-866; discussion 867. doi:10.1177/088307380301801205
- Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*, 45(2-3), 191-202. doi:10.1016/j.neuint.2003.08.015
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21. doi:10.1007/978-1-62703-640-5\_2
- Krishna, A., Biryukov, M., Trefois, C., Antony, P. M., Hussong, R., Lin, J., . . . May, P. (2014). Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a

- model for Parkinson's disease. *BMC Genomics*, *15*, 1154. doi:10.1186/1471-2164-15-1154
- Kume, T., Kawato, Y., Osakada, F., Izumi, Y., Katsuki, H., Nakagawa, T., . . . Akaike, A. (2008). Dibutyl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett*, *443*(3), 199-203. doi:10.1016/j.neulet.2008.07.079
- Kuramoto, T., Werrbach-Perez, K., Perez-Polo, J. R., & Haber, B. (1981). Membrane properties of a human neuroblastoma II: Effects of differentiation. *J Neurosci Res*, *6*(4), 441-449. doi:10.1002/jnr.490060402
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(11). doi:10.1101/cshperspect.a006320
- Lai, M., Pan, M., Ge, L., Liu, J., Deng, J., Wang, X., . . . Guo, J. (2020). NeuroD1 overexpression in spinal neurons accelerates axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Exp Neurol*, *327*, 113215. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113215
- Lamouroux, A., Vigny, A., Faucon Biguet, N., Darmon, M. C., Franck, R., Henry, J. P., & Mallet, J. (1987). The primary structure of human dopamine-beta-hydroxylase: insights into the relationship between the soluble and the membrane-bound forms of the enzyme. *EMBO J*, *6*(13), 3931-3937.
- Landles, C., & Bates, G. P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep*, *5*(10), 958-963. doi:10.1038/sj.embor.7400250
- Lanoiselee, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., . . . collaborators of the, C. N. R. M. A. J. p. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*, *14*(3), e1002270. doi:10.1371/journal.pmed.1002270
- Lavenius, E., Gestblom, C., Johansson, I., Nanberg, E., & Pahlman, S. (1995). Transfection of TRK-A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. *Cell Growth Differ*, *6*(6), 727-736.
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N., & Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*, *268*(5212), 836-844. doi:10.1126/science.7754368
- Levin, E. Y., Levenberg, B., & Kaufman, S. (1960). The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J Biol Chem*, *235*, 2080-2086.
- Li, Y. I., Wong, G., Humphrey, J., & Raj, T. (2019). Prioritizing Parkinson's disease genes using population-scale transcriptomic data. *Nat Commun*, *10*(1), 994. doi:10.1038/s41467-019-08912-9
- Licker, V., Kovari, E., Hochstrasser, D. F., & Burkhard, P. R. (2009). Proteomics in human Parkinson's disease research. *J Proteomics*, *73*(1), 10-29. doi:10.1016/j.jprot.2009.07.007
- Lopes, F. M., Schroder, R., da Frota, M. L., Jr., Zanotto-Filho, A., Muller, C. B., Pires, A. S., . . . Klamt, F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res*, *1337*, 85-94. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.102
- Lotharius, J., Falsig, J., van Beek, J., Payne, S., Dringen, R., Brundin, P., & Leist, M. (2005). Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-

- lineage kinase pathway. *J Neurosci*, 25(27), 6329-6342.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.1746-05.2005
- Ma, Q., Kintner, C., & Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell*, 87(1), 43-52. doi:10.1016/s0092-8674(00)81321-5
- Maffezzini, C., Calvo-Garrido, J., Wredenber, A., & Freyer, C. (2020). Metabolic regulation of neurodifferentiation in the adult brain. *Cell Mol Life Sci*.  
doi:10.1007/s00018-019-03430-9
- Melino, G., Thiele, C. J., Knight, R. A., & Piacentini, M. (1997). Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J Neurooncol*, 31(1-2), 65-83. doi:10.1023/a:1005733430435
- Morton, A. J., & Howland, D. S. (2013). Large genetic animal models of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis*, 2(1), 3-19. doi:10.3233/JHD-130050
- Moutaoufik, M. T., Maly, R., Amin, S., Zhang, Q., Phanse, S., Gagarinova, A., . . . Babu, M. (2019). Rewiring of the Human Mitochondrial Interactome during Neuronal Reprogramming Reveals Regulators of the Respirasome and Neurogenesis. *iScience*, 19, 1114-1132. doi:10.1016/j.isci.2019.08.057
- Murillo, J. R., Goto-Silva, L., Sanchez, A., Nogueira, F. C. S., Domont, G. B., & Junqueira, M. (2017). Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *EuPA Open Proteom*, 16, 1-11.  
doi:10.1016/j.euprot.2017.06.001
- Nagatsu, T., Levitt, M., & Udenfriend, S. (1964). Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem*, 239, 2910-2917.
- Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278(5335), 58-63. doi:10.1126/science.278.5335.58
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., . . . Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130-133.  
doi:10.1126/science.1134108
- Nicolini, G., Miloso, M., Zoia, C., Di Silvestro, A., Cavaletti, G., & Tredici, G. (1998). Retinoic acid differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells: an in vitro model to assess drug neurotoxicity. *Anticancer Res*, 18(4A), 2477-2481.
- Oe, T., Sasayama, T., Nagashima, T., Muramoto, M., Yamazaki, T., Morikawa, N., . . . Kita, Y. (2005). Differences in gene expression profile among SH-SY5Y neuroblastoma subclones with different neurite outgrowth responses to nerve growth factor. *J Neurochem*, 94(5), 1264-1276. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03273.x
- Ostrowski, J., & Wyrwicz, L. S. (2009). Integrating genomics, proteomics and bioinformatics in translational studies of molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn*, 9(6), 623-630. doi:10.1586/erm.09.41
- Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., & Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Int J Cancer*, 28(5), 583-589. doi:10.1002/ijc.2910280509
- Pahlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., & Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a

- comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*, 14(2), 135-144. doi:10.1016/0045-6039(84)90038-1
- Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., . . . Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem*, 279(18), 18614-18622. doi:10.1074/jbc.M401135200
- Pallier, P. N., Maywood, E. S., Zheng, Z., Chesham, J. E., Inyushkin, A. N., Dyball, R., . . . Morton, A. J. (2007). Pharmacological imposition of sleep slows cognitive decline and reverses dysregulation of circadian gene expression in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, 27(29), 7869-7878. doi:10.1523/JNEUROSCI.0649-07.2007
- Parrow, V., Nanberg, E., Heikkila, J., Hammerling, U., & Pahlman, S. (1992). Protein kinase C remains functionally active during TPA induced neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*, 152(3), 536-544. doi:10.1002/jcp.1041520313
- Pennington, K., Peng, J., Hung, C. C., Banks, R. E., & Robinson, P. A. (2010). Differential effects of wild-type and A53T mutant isoform of alpha-synuclein on the mitochondrial proteome of differentiated SH-SY5Y cells. *J Proteome Res*, 9(5), 2390-2401. doi:10.1021/pr901102d
- Perez-Polo, J. R., Werbach-Perez, K., & Tiffany-Castiglioni, E. (1979). A human clonal cell line model of differentiating neurons. *Dev Biol*, 71(2), 341-355. doi:10.1016/0012-1606(79)90174-x
- Periquet, M., Corti, O., Jacquier, S., & Brice, A. (2005). Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem*, 95(5), 1259-1276. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03442.x
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*, 69, 5 67 61-65 67 21. doi:10.1002/0471141755.ph0567s69
- Podrygajlo, G., Song, Y., Schlesinger, F., Krampfl, K., & Bicker, G. (2010). Synaptic currents and transmitter responses in human NT2 neurons differentiated in aggregate culture. *Neurosci Lett*, 468(3), 207-210. doi:10.1016/j.neulet.2009.10.092
- Poon, H. F., Frasier, M., Shreve, N., Calabrese, V., Wolozin, B., & Butterfield, D. A. (2005). Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 18(3), 492-498. doi:10.1016/j.nbd.2004.12.009
- Presgraves, S. P., Ahmed, T., Borwege, S., & Joyce, J. N. (2004). Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res*, 5(8), 579-598. doi:10.1007/BF03033178
- Prince, J. A., & Orelund, L. (1997). Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull*, 43(6), 515-523. doi:10.1016/s0361-9230(97)00328-6
- Raghunath, M., Patti, R., Bannerman, P., Lee, C. M., Baker, S., Sutton, L. N., . . . Damodar Reddy, C. (2000). A novel kinase, AATYK induces and promotes neuronal differentiation in a human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *Brain Res Mol Brain Res*, 77(2), 151-162. doi:10.1016/s0169-328x(00)00048-6
- Rogers, M. V., Buensuceso, C., Montague, F., & Mahadevan, L. (1994). Vanadate stimulates differentiation and neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12

- cells and neurite extension in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 60(2), 479-494. doi:10.1016/0306-4522(94)90259-3
- Ross, R. A., & Biedler, J. L. (1985). Presence and regulation of tyrosinase activity in human neuroblastoma cell variants in vitro. *Cancer Res*, 45(4), 1628-1632.
- Ruusala, A. I., Mattsson, M., Esscher, T., Abrahamsson, L., Jergil, B., & Pahlman, S. (1985). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced differentiation of human neuroblastoma cells is not accompanied by an increase in the intracellular concentration of cyclic AMP. *Brain Res*, 350(1-2), 27-35. doi:10.1016/0165-3806(85)90247-0
- Sakurada, K., Ohshima-Sakurada, M., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (1999). Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, 126(18), 4017-4026.
- Sarkanen, J. R., Nykky, J., Siikanen, J., Selinummi, J., Ylikomi, T., & Jalonen, T. O. (2007). Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 102(6), 1941-1952. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04676.x
- Schildknecht, S., Poltl, D., Nagel, D. M., Matt, F., Scholz, D., Lotharius, J., . . . Leist, M. (2009). Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 241(1), 23-35. doi:10.1016/j.taap.2009.07.027
- Scott, L., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2017). Trumping neurodegeneration: Targeting common pathways regulated by autosomal recessive Parkinson's disease genes. *Exp Neurol*, 298(Pt B), 191-201. doi:10.1016/j.expneurol.2017.04.008
- Shiple, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp*(108), 53193. doi:10.3791/53193
- Smith, D. L., Portier, R., Woodman, B., Hockly, E., Mahal, A., Klunk, W. E., . . . Bates, G. P. (2001). Inhibition of polyglutamine aggregation in R6/2 HD brain slices—complex dose-response profiles. *Neurobiol Dis*, 8(6), 1017-1026. doi:10.1006/nbdi.2001.0438
- Snowden, J. S., Pickering-Brown, S. M., Mackenzie, I. R., Richardson, A. M., Varma, A., Neary, D., & Mann, D. M. (2006). Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia. *Brain*, 129(Pt 11), 3091-3102. doi:10.1093/brain/awl267
- Spina, M. B., Squinto, S. P., Miller, J., Lindsay, R. M., & Hyman, C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem*, 59(1), 99-106. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb08880.x
- Storch, A., Ludolph, A. C., & Schwarz, J. (2004). Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J Neural Transm (Vienna)*, 111(10-11), 1267-1286. doi:10.1007/s00702-004-0203-2
- Tabrizi, S. J., Orth, M., Wilkinson, J. M., Taanman, J. W., Warner, T. T., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (2000). Expression of mutant alpha-synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Hum Mol Genet*, 9(18), 2683-2689. doi:10.1093/hmg/9.18.2683



- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Teppola, H., Sarkanen, J. R., Jalonen, T. O., & Linne, M. L. (2016). Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res*, *41*(4), 731-747. doi:10.1007/s11064-015-1743-6
- Thrash-Williams, B., Karuppagounder, S. S., Bhattacharya, D., Ahuja, M., Suppiramaniam, V., & Dhanasekaran, M. (2016). Methamphetamine-induced dopaminergic toxicity prevented owing to the neuroprotective effects of salicylic acid. *Life Sci*, *154*, 24-29. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.072
- Timpl, R., & Brown, J. C. (1994). The laminins. *Matrix Biol*, *14*(4), 275-281. doi:10.1016/0945-053x(94)90192-9
- Tojima, T., Kobayashi, S., & Ito, E. (2003). Dual role of cyclic AMP-dependent protein kinase in neuritogenesis and synaptogenesis during neuronal differentiation. *J Neurosci Res*, *74*(6), 829-837. doi:10.1002/jnr.10754
- Tyers, M., & Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. *Nature*, *422*(6928), 193-197. doi:10.1038/nature01510
- Uemura, K., Kitagawa, N., Kohno, R., Kuzuya, A., Kageyama, T., Shibasaki, H., & Shimohama, S. (2003). Presenilin 1 mediates retinoic acid-induced differentiation of SH-SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling. *J Neurosci Res*, *73*(2), 166-175. doi:10.1002/jnr.10641
- Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, *24*(3), 485-493. doi:10.1016/0006-8993(70)90187-3
- Van Laar, V. S., Mishizen, A. J., Cascio, M., & Hastings, T. G. (2009). Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis*, *34*(3), 487-500. doi:10.1016/j.nbd.2009.03.004
- Vercauteren, F. G., Arckens, L., & Quirion, R. (2007). Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. *Amino Acids*, *33*(3), 405-414. doi:10.1007/s00726-006-0460-5
- Walker, A. K., Spiller, K. J., Ge, G., Zheng, A., Xu, Y., Zhou, M., . . . Lee, V. M. (2015). Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. *Acta Neuropathol*, *130*(5), 643-660. doi:10.1007/s00401-015-1460-x
- Walker, L. C., Diamond, M. I., Duff, K. E., & Hyman, B. T. (2013). Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases. *JAMA Neurol*, *70*(3), 304-310. doi:10.1001/jamaneurol.2013.1453
- Weinreb, O., Amit, T., & Youdim, M. B. (2008). The application of proteomics for studying the neurorescue activity of the polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Arch Biochem Biophys*, *476*(2), 152-160. doi:10.1016/j.abb.2008.01.004
- Werner, C. J., Heyny-von Haussen, R., Mall, G., & Wolf, S. (2008). Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteome Sci*, *6*, 8. doi:10.1186/1477-5956-6-8
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., & Binder, L. I. (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-

associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11), 4040-4043.  
doi:10.1073/pnas.83.11.4040

Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*, 12(1), 10.  
doi:10.1186/s13024-017-0149-0

Xie, H. R., Hu, L. S., & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*, 123(8), 1086-1092.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

<b><u>Kişisel Bilgiler</u></b>	
Adı Soyadı	EYLÜL ECE İŞLEK CAMADAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Kocaeli, 25/09/1989
İletişim Adresi	Suadiye Mah., Öncü Sok., Çelem Loft Apartmanı, No:1, Kat:6, Daire:7, Kadıköy/İstanbul
Telefon	0555 655 03 65
E-posta	eceislek@hotmail.com
Eğitim Bilgileri	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2014 - Kocaeli Üniversitesi (Kocaeli, Türkiye) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Doktora Programı) Tez Başlığı: ‘SH-SY5Y Hücre Hattında SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 ve LRRK2 Gen Ürünlerinin Nörojenik Farklılaşma Sırasında Transkripsiyonel ve Translasyonel Düzeyde Gösterdikleri Değişimlerin İncelenmesi’</li><li>• 2012 - 2014 Kocaeli Üniversitesi (Kocaeli, Türkiye) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Programı) Tez Başlığı: ‘Non-alkolik Steatohepatitis (NASH) Hastalığında Rol Oynayan Genlerin Araştırılması’</li><li>• 2007 - 2011 Yeditepe Üniversitesi (İstanbul, Türkiye) Genetik ve Biyomühendislik Lisans Programı Tez Başlığı: ‘Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği’</li></ul>

Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	<ul style="list-style-type: none"> <li>2013 - 2020 Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi.</li> </ul>
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce (YÖKDİL: 88,75)
Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar	Türkiye Proteomik Derneği (TUPA)
<b><u>Bilimsel Etkinlikler</u></b>	
Makaleler	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hazırlık Aşamasında: <b>Camadan EEI</b>, Kasap M., Akpınar G. (2020) Proteomic characterization of SH-SY5Y cells during in vitro neurogenic differentiation. To be submitted to Neuroscience Letters.</li> <li>Hazırlık Aşamasında: Kara B., Uyguner O., Genc H.M., <b>Camadan EEI</b>, Kasap M., Toksoy G., Akpınar G., Yalcin E.U., Anik Y., Ustek, D. (2020) 'BEND4 is a candidate gene for a new neurodegenerative disorder characterized by a cyst and calcification of the pons and cerebellar atrophy'. Submitted to American Journal of Medical Genetics.</li> <li>Abundant proteins in platelet-rich fibrin and their potential contribution to wound healing: An explorative proteomics study and review of the literature. Yaprak E, Kasap M, Akpınar G, <b>Islek EE</b>, Sinanoğlu A. Journal of Dental Sciences. 2018. DOI:10.1016/j.jds.2018.08.004.</li> <li>Proteomics Analysis of Tissue Samples Reveals Changes in Mitochondrial Protein Levels in Parathyroid Hyperplasia over Adenoma. Akpınar G, Kasap M, Canturk NZ, Zulfigarova M, <b>Islek EE</b>, Guler SA, Simsek T, Canturk Z. Cancer Genomics Proteomics. 2017 May-Jun;14(3):197-211. DOI:10.21873/cgp.20031.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Association of rs62063857 variant of the saitojin gene with Parkinson's disease. Sonmez E, Ozel MD, <b>Islek EE</b>, Sazci A, Idrisoglu HA. Cell Mol Neurobiol. 2015 Jan;35(1):115-21. Epub 2014 Aug 29. DOI:10.1007/s10571-014-0102-5.</li> <li>• Genetic variants in the PNPLA3 gene are associated with nonalcoholic steatohepatitis. <b>Islek EE</b>, Sazci A, Ozel MD, Aygun C. Genet Test Mol Biomarkers. 2014 Jul;18(7):489-96. Epub 2014 May 15. DOI:10.1089/gtmb.2014.0019.</li> </ul>
<p>Projeler</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TÜBİTAK Hızlı Destek Programı (No: 118S806) ‘Nörojenik Farklılaşmaya Tabi Tutulmuş Nöroblastoma Hücre Hattında (SH-SY5Y) Parkinson Hastalığı ile İlişkili Genlerin Seviyelerindeki Değişimlerin mRNA ve Protein Düzeyinde İncelenmesi’</li> <li>• Kocaeli Üniversitesi ‘Lisansüstü, Doktora ve Tıpta/Dış Hekimliğinde Uzmanlık Tezlerini Destekleme Projeleri’ (No: 2018/093) ‘SH-SY5Y Hücre Hattında SNCA, PARK2, DJ-1, PINK1 ve LRRK2 Gen Ürünlerinin Nörojenik Farklılaşma Sırasında Transkripsiyonel ve Translasyonel Düzeyde Gösterdikleri Değişimlerin İncelenmesi’</li> <li>• TÜBİTAK Hızlı Destek Programı (No: 116S102) ‘Prostat Kanseri Hücrelerinde Nobiletin Flavonoidinin TLR4 ve TLR9 Reseptörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi’</li> </ul>
<p>Bildiriler</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ‘SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattında In Vitro Nörojenik Farklılaştırma Sırasında Proteom Karakterizasyonu’ (TUPA 2020, İstanbul, Türkiye).</li> </ul>

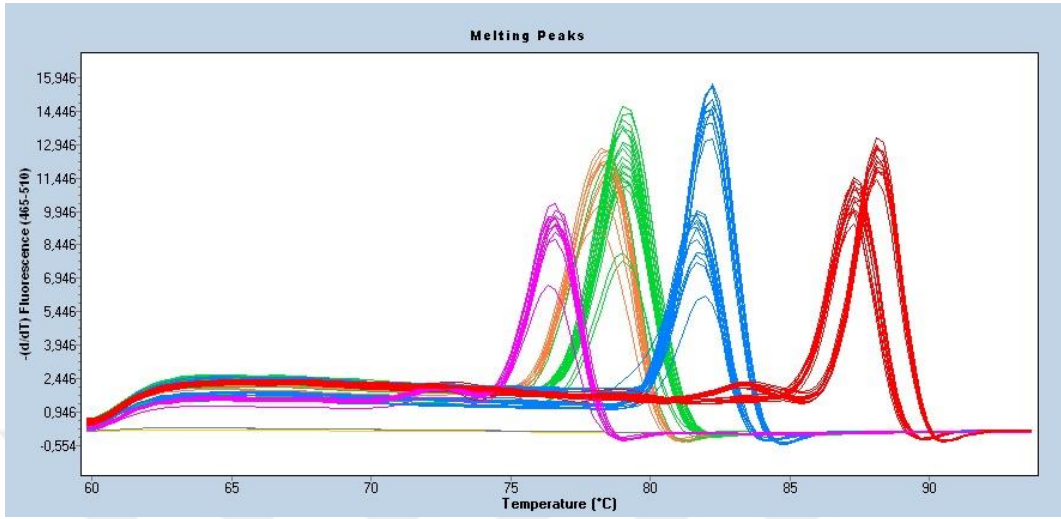
	<ul style="list-style-type: none"><li>• ‘A new neurodegenerative disorder characterized with cystic pontine degeneration and cerebellar atrophy due to BEND4 gene mutation’ (EPNS 2019, Atina, Yunanistan).</li><li>• ‘Effect of Gestational Diabetic Blood Soluble Factors on Beta Cell Function: In vitro Physiological Analysis Combined with Proteomics Approach’ (EASD 2018, Berlin, Almanya).</li><li>• ‘Production and Single-Step Purification of Recombinant Human <math>\beta</math>-Actin from E. coli’ (ASCB 2017, Philadelphia, ABD).</li><li>• ‘2D Jel elektroforez tabanlı zenginleştirilmiş nükleer proteom analizi’ (TUPA 2017, İstanbul, Türkiye)</li><li>• ‘Experiments Leading to a False Sense in Interpretation of Actin Production in Escherichia coli’ (VI. International Congress of Molecular Medicine 2017, İstanbul, Türkiye).</li><li>• ‘Identification of Differentially Regulated Non-Specific Proteins in SH-SY5Y Cells Engineered With Tet-Regulated Protein Expression System’ (VI. International Congress of Molecular Medicine 2017, İstanbul, Türkiye).</li><li>• ‘Trombositten Zengin Fibrinin Total Protein İçeriğinin Proteomiks Yöntemleri Ile İncelenmesi’ (Türk Periodontoloji Derneği 2016, İzmir, Türkiye).</li><li>• ‘Rab6 Prevents the Stalling of Cargo Protein Transport Between Medial and Trans Golgi Cisternae’ (ASCB 2016, San Francisco, ABD).</li><li>• ‘In vitro Expression of BEND4 Shed Some Clues About Its Physiological Function’ (EUPA 2016, İstanbul, Türkiye).</li></ul>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Diğer	<ul style="list-style-type: none"><li>• Arkansas Üniversitesi, Fizyoloji ve Biyofizik Bölümü (2015)<ul style="list-style-type: none"><li>○ Proje 1 (The RUSH, a Powerful System for Studying Intracellular Traffic)</li><li>○ Proje 2 (How Does the Golgi Fragment/Reorganize?)</li></ul></li></ul>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

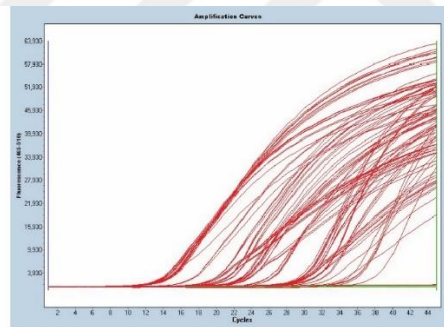


## 9. EKLER

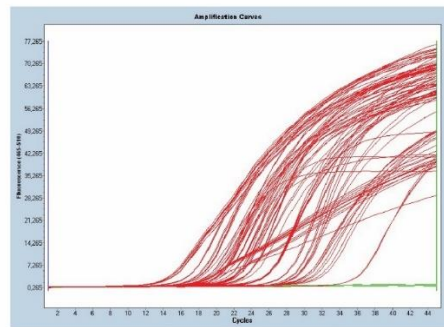
### EK-1: qRT-PCR Çalışmasına Ait Sonuçlar



Her bir gen için yapılan qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen erime eğrileri.



NeuN, Aktin, NeuroD1, Nurr1, Nestin, MAP2, DAT ve GAPDH Genlerine Ait Amplifikasyon Eğrileri



DDC, PARK2, TH, DJ-1, DRD1, PINK1, VPS35 ve GAPDH Genlerine Ait Amplifikasyon Eğrileri

Her bir gen için yapılan qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri.



Her bir gen için yapılan qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen regülasyon oranları (internal kontrol: GAPDH)

Gen Adı	Target CT	REF CT (GAPDH)	$\Delta$ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
<b>DDC</b> <b>0. GÜN</b>	17,52	12,28	5,25	0,00	1,00
<b>DDC</b> <b>3. GÜN</b>	16,58	12,33	4,25	-0,99	1,99
<b>DDC</b> <b>6. GÜN</b>	19,53	16,41	3,12	-2,13	4,38
<b>DDC</b> <b>9. GÜN</b>	16,03	11,97	4,06	-1,19	2,28
<b>Park2</b> <b>0. GÜN</b>	22,65	12,28	10,37	0,00	1,00
<b>Park2</b> <b>3. GÜN</b>	21,62	12,33	9,29	-1,09	2,12
<b>Park2</b> <b>6. GÜN</b>	26,49	16,41	10,08	-0,29	1,23
<b>Park2</b> <b>9. GÜN</b>	20,09	11,97	8,12	-2,25	4,76
<b>TH</b> <b>0. GÜN</b>	24,72	12,28	12,44	0,00	1,00
<b>TH</b> <b>3. GÜN</b>	20,15	12,33	7,82	-4,62	24,59
<b>TH</b> <b>6. GÜN</b>	26,30	16,41	9,89	-2,56	5,88
<b>TH</b> <b>9. GÜN</b>	18,91	11,97	6,94	-5,50	45,36
<b>DJ-1</b> <b>0. GÜN</b>	15,41	12,28	3,13	0,00	1,00
<b>DJ-1</b>	15,38	12,33	3,05	-0,08	1,06

<b>3. GÜN</b>					
<b>DJ-1</b>					
<b>6. GÜN</b>	17,72	16,41	1,31	-1,82	3,54
<b>DJ-1</b>					
<b>9. GÜN</b>	14,06	11,97	2,09	-1,04	2,06
<b>DRD1</b>					
<b>0. GÜN</b>	27,59	12,28	15,32	0,00	1,00
<b>DRD1</b>					
<b>3. GÜN</b>	26,61	12,33	14,28	-1,04	2,05
<b>DRD1</b>					
<b>6. GÜN</b>	33,44	16,41	17,03	1,71	0,30
<b>DRD1</b>					
<b>9. GÜN</b>	26,49	11,97	14,52	-0,80	1,74
<b>PINK1</b>					
<b>0. GÜN</b>	19,62	12,28	7,34	0,00	1,00
<b>PINK1</b>					
<b>3. GÜN</b>	18,06	12,33	5,73	-1,61	3,05
<b>PINK1</b>					
<b>6. GÜN</b>	23,04	16,41	6,63	-0,71	1,64
<b>PINK1</b>					
<b>9. GÜN</b>	17,69	11,97	5,72	-1,62	3,07
<b>VPS35</b>					
<b>0. GÜN</b>	16,94	12,28	4,66	0,00	1,00
<b>VPS35</b>					
<b>3. GÜN</b>	16,59	12,33	4,26	-0,40	1,32
<b>VPS35</b>					
<b>6. GÜN</b>	19,34	16,41	2,93	-1,73	3,32
<b>VPS35</b>					
<b>9. GÜN</b>	16,50	11,97	4,53	-0,13	1,09
<b>NeuN</b>					
<b>0. GÜN</b>	31,79	11,86	19,93	0,00	1,00

<b>NeuN</b> <b>3. GÜN</b>	26,62	11,57	15,06	-4,87	29,31
<b>NeuN</b> <b>6. GÜN</b>	33,56	17,14	16,42	-3,51	11,37
<b>NeuN</b> <b>9. GÜN</b>	27,53	11,87	15,66	-4,27	19,29
<b>Aktin</b> <b>0. GÜN</b>	11,37	11,86	-0,49	0,00	1,00
<b>Aktin</b> <b>3. GÜN</b>	11,17	11,57	-0,39	0,10	0,94
<b>Aktin</b> <b>6. GÜN</b>	14,75	17,14	-2,38	-1,89	3,71
<b>Aktin</b> <b>9. GÜN</b>	10,90	11,87	-0,97	-0,48	1,39
<b>NeuroD1</b> <b>0. GÜN</b>	19,97	11,86	8,11	0,00	1,00
<b>NeuroD1</b> <b>3. GÜN</b>	19,91	11,57	8,34	0,24	0,85
<b>NeuroD1</b> <b>6. GÜN</b>	23,38	17,14	6,25	-1,86	3,63
<b>NeuroD1</b> <b>9. GÜN</b>	19,59	11,87	7,72	-0,39	1,31
<b>Nurr1</b> <b>0. GÜN</b>	27,62	11,86	15,76	0,00	1,00
<b>Nurr1</b> <b>3. GÜN</b>	28,74	11,57	17,17	1,42	0,37
<b>Nurr1</b> <b>6. GÜN</b>	33,25	17,14	16,11	0,36	0,78
<b>Nurr1</b> <b>9. GÜN</b>	26,26	11,87	14,39	-1,37	2,58
<b>Nestin</b>	20,34	11,86	8,48	0,00	1,00

<b>0. GÜN</b>					
<b>Nestin</b>					
<b>3. GÜN</b>	18,21	11,57	6,65	-1,83	3,56
<b>Nestin</b>					
<b>6. GÜN</b>	24,09	17,14	6,95	-1,53	2,89
<b>Nestin</b>					
<b>9. GÜN</b>	18,92	11,87	7,05	-1,43	2,69
<b>MAP2</b>					
<b>0. GÜN</b>	18,34	11,86	6,47	0,00	1,00
<b>MAP2</b>					
<b>3. GÜN</b>	17,13	11,57	5,56	-0,91	1,88
<b>MAP2</b>					
<b>6. GÜN</b>	21,32	17,14	4,19	-2,29	4,88
<b>MAP2</b>					
<b>9. GÜN</b>	17,27	11,87	5,40	-1,08	2,11
<b>DAT</b>					
<b>0. GÜN</b>	26,98	11,86	15,12	0,00	1,00
<b>DAT</b>					
<b>3. GÜN</b>	26,67	11,57	15,10	-0,02	1,01
<b>DAT</b>					
<b>6. GÜN</b>	31,17	17,14	14,03	-1,09	2,13
<b>DAT</b>					
<b>9. GÜN</b>	25,66	11,87	13,79	-1,33	2,51

qRT-PCR çalışması sonucunda elde edilen verilerin 0. Gün'e karşı yapılan **REST** analizi sonuçları.

<b>Gen Adı</b>	<b>Mutlak Gen Regülasyonu</b>	<b>2log (Mutlak Gen Regülasyonu)</b>	<b>Upregülasyon</b>	<b>Down Regülasyon</b>
<b>DDC (3. GÜN)</b>	1,99	0,99	1,99	

<b>DDC (6. GÜN)</b>	4,37	2,13	4,37	
<b>DDC (9. GÜN)</b>	2,28	1,19	2,28	
<b>PARK2 (3. GÜN)</b>	2,12	1,09	2,12	
<b>PARK2 (6. GÜN)</b>	1,23	0,29	1,23	
<b>PARK2 (9. GÜN)</b>	4,76	2,25	4,76	
<b>TH (3. GÜN)</b>	24,59	4,62	24,59	
<b>TH (6. GÜN)</b>	5,88	2,56	5,88	
<b>TH (9. GÜN)</b>	45,35	5,50	45,35	
<b>DJ-1 (3. GÜN)</b>	1,06	0,08	1,06	
<b>DJ-1 (6. GÜN)</b>	3,54	1,82	3,54	
<b>DJ-1 (9. GÜN)</b>	2,06	1,04	2,06	
<b>DRD1 (3. GÜN)</b>	2,05	1,04	2,05	
<b>DRD1 (6. GÜN)</b>	0,30	-1,71		3,28
<b>DRD1 (9. GÜN)</b>	1,74	0,80	1,74	
<b>PINK1 (3. GÜN)</b>	3,05	1,61	3,05	
<b>PINK1 (6. GÜN)</b>	1,64	0,71	1,64	
<b>PINK1 (9. GÜN)</b>	3,07	1,62	3,07	
<b>VPS35 (3. GÜN)</b>	1,32	0,40	1,32	
<b>VPS35 (6. GÜN)</b>	3,32	1,73	3,32	
<b>VPS35 (9. GÜN)</b>	1,09	0,13	1,09	
<b>NeuN (3. GÜN)</b>	29,32	4,87	29,32	
<b>NeuN (6. GÜN)</b>	11,37	3,51	11,37	
<b>NeuN (9. GÜN)</b>	19,29	4,27	19,29	
<b>Aktin (3. GÜN)</b>	0,94	-0,10		1,07
<b>Aktin (6. GÜN)</b>	3,72	1,89	3,72	
<b>Aktin (9. GÜN)</b>	1,39	0,48	1,39	
<b>NeuroD1 (3. GÜN)</b>	0,85	-0,24		1,18
<b>NeuroD1 (6. GÜN)</b>	3,63	1,86	3,63	
<b>NeuroD1 (9. GÜN)</b>	1,31	0,39	1,31	
<b>Nurr1 (3. GÜN)</b>	0,38	-1,42		2,67
<b>Nurr1 (6. GÜN)</b>	0,78	-0,36		1,28

<b>Nurr1 (9. GÜN)</b>	2,58	1,37	2,58	
<b>Nestin (3. GÜN)</b>	3,57	1,83	3,57	
<b>Nestin (6. GÜN)</b>	2,89	1,53	2,89	
<b>Nestin (9. GÜN)</b>	2,69	1,43	2,69	
<b>MAP2 (3. GÜN)</b>	1,88	0,91	1,88	
<b>MAP2 (6. GÜN)</b>	4,88	2,29	4,88	
<b>MAP2 (9. GÜN)</b>	2,11	1,08	2,11	
<b>DAT (3. GÜN)</b>	1,01	0,02	1,01	
<b>DAT (6. GÜN)</b>	2,13	1,09	2,13	
<b>DAT (9. GÜN)</b>	2,51	1,33	2,51	



EK-2: nLC-MS/MS Çalışmasına Ait Sonuçlar

Erişim No.	Tanım	Coverage [%]	# Unique Peptides	MW [kDa]	calc. pI	Abundance Ratio: (3. gün) / (0. gün)	Abundance Ratio: (6. gün) / (0. gün)	Abundance Ratio: (9. gün) / (0. gün)
<b>O95881</b>	Thioredoxin domain-containing protein 12	8	1	19,2	5,4	1000	1000	1000
<b>Q00688</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 OS=Homo sapiens GN=FKBP3 PE=1 SV=1	5	1	25,2	9,28	1000		1000
<b>P06703</b>	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens GN=S100A6 PE=1 SV=1	9	1	10,2	5,48	1000	1000	1000
<b>A8K3B0</b>	cDNA FLJ77877, highly similar to Human ENO2 neuron specific (gamma) enolase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	1	47,3	5,03	1000		1000

<b>P80723</b>	Brain acid soluble protein 1 OS=Homo sapiens GN=BASP1 PE=1 SV=2	6	1	22,7	4,63	1000		1000
<b>E9KL44</b>	Epididymis tissue sperm binding protein Li 14m OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	82,9	9,04		1000	1000
<b>A0A087X1N7</b>	Nebulin OS=Homo sapiens GN=NEB PE=4 SV=1	0	1	990,2	9,01	1000	1000	1000
<b>Q13151</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	4	1	30,8	9,29	1000	1000	1000
<b>Q13315</b>	Serine-protein kinase ATM OS=Homo sapiens GN=ATM PE=1 SV=4	0	1	350,5	6,81	1000	1000	1000
<b>P27695</b>	DNA-(apurinic or aprimidinic site) lyase	3	1	35,5	8,12	1000		1000



	OS=Homo sapiens GN=APEX1 PE=1 SV=2							
<b>Q15323</b>	Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Homo sapiens GN=KRT31 PE=2 SV=3	4	1	47,2	4,88			1000
<b>A0A024R056</b>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=GNB1 PE=4 SV=1	6	2	37,4	6	1000	1000	1000
<b>B2R5M8</b>	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	46,6	7,01	1000	1000	1000
<b>Q14533</b>	Keratin, type II cuticular Hb1 OS=Homo sapiens GN=KRT81 PE=1 SV=3	4	2	54,9	5,47		1000	1000
<b>D3DPK5</b>	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3, isoform CRA_a	4	1	26,8	8,38	1000	1000	1000

	(Fragment) OS=Homo sapiens GN=SH3BGRL3 PE=4 SV=1							
<b>P62917</b>	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=2	4	1	28	11,03	1000	1000	1000
<b>P38159</b>	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=1 SV=3	3	1	42,3	10,05	1000	1000	1000
<b>Q15366</b>	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCBP2 PE=1 SV=1	3	1	38,6	6,79	1000	1000	1000
<b>Q6DEN2</b>	DPYSL3 protein OS=Homo sapiens GN=DPYSL3 PE=2 SV=1	2	1	73,9	6,55			1000
<b>K7ES00</b>	Histone H3.3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=H3F3B PE=1 SV=1	6	1	16,6	11,84	35,754	13,123	52,045

<b>P06748</b>	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	21	4	32,6	4,78	6,739	38,902	47,395
<b>P35580</b>	Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3	1	1	228,9	5,54	42,707	0,001	42,104
<b>A0A0A0MT26</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Homo sapiens GN=ATP1A3 PE=4 SV=1	1	1	133,2	6,1	55,445	60,864	42,059
<b>E5KNY5</b>	Leucine-rich PPR-motif containing OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=4 SV=1	1	1	157,8	6,13	222,899	138,435	32,761
<b>E5RJD8</b>	Tubulin-specific chaperone A OS=Homo sapiens GN=TBCA PE=1 SV=1	8	1	14,3	5,12	3,093	8,766	28,429
<b>Q9UK76</b>	Hematological and neurological expressed 1	6	1	16	5,6	10,837	7,26	19,941

	protein OS=Homo sapiens GN=HN1 PE=1 SV=3							
<b>B2R5M3</b>	cDNA, FLJ92530, highly similar to Homo sapiens chromogranin B (secretogranin 1) (CHGB), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	4	78,2	5,1	1,698	1,059	13,83
<b>Q9UJZ1</b>	Stomatin-like protein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=STOML2 PE=1 SV=1	3	1	38,5	7,39	8,314	15,938	8,66
<b>A0A087X2I6</b>	Keratin, type I cuticular Ha3-II OS=Homo sapiens GN=KRT33B PE=3 SV=1	3	1	46,1	4,84	0,001	0,001	8,54
<b>Q8WVX7</b>	Ribosomal protein S19 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	1	17,3	10,52	0,001	4,24	8,509

<b>F1T0F7</b>	Cellular retinoic acid binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=CRABP1 PE=2 SV=1	9	1	15,6	5,38	1,154	0,001	8,221
<b>Q32Q12</b>	Nucleoside diphosphate kinase OS=Homo sapiens GN=NME1-NME2 PE=2 SV=1	12	2	32,6	8,48	10,418	5,839	8,046
<b>P13521</b>	Secretogranin-2 OS=Homo sapiens GN=SCG2 PE=1 SV=2	3	2	70,9	4,75	3,294	2,801	7,554
<b>Q53F64</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB isoform a variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	2	36	7,42	6,224	3,808	6,852
<b>B0YIW2</b>	Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=4 SV=1	14	1	12,8	8,18	1,768	1,79	6,336

<b>E7EX29</b>	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	21	3	28	4,92	4,575	1,898	6,082
<b>A0A0A6YYJ8</b>	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 OS=Homo sapiens GN=LUC7L2 PE=4 SV=1	3	1	54,2	10,13	6,179	3,719	5,451
<b>O15240</b>	Neurosecretory protein VGF OS=Homo sapiens GN=VGF PE=1 SV=2	52	22	67,2	4,78	1,222	1,254	5,058
<b>Q06587</b>	E3 ubiquitin-protein ligase RING1 OS=Homo sapiens GN=RING1 PE=1 SV=2	7	1	42,4	5,62	0,901	1,404	4,968
<b>A8MU27</b>	Small ubiquitin-related modifier 3 OS=Homo sapiens GN=SUMO3 PE=1 SV=1	8	1	16,9	9,67	5,032	3,197	4,96

<b>E5RJR5</b>	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=SKP1 PE=1 SV=1	7	1	18,7	4,7	5,018	0,223	4,41
<b>B5BUB1</b>	RuvB-like 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=2 SV=1	9	3	50,2	6,42	0,959	1,063	4,395
<b>P68371</b>	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1	26	1	49,8	4,89	4,438	6,134	4,31
<b>P13645</b>	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	22	10	58,8	5,21	0,936	5,626	4,186
<b>P29373</b>	Cellular retinoic acid-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=CRABP2 PE=1 SV=2	7	1	15,7	5,4	7,3	4,223	4,074
<b>Q5U077</b>	L-lactate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=2 SV=1	7	2	36,6	6,05	0,881	0,514	4,05

<b>P35908</b>	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	14	5	65,4	8	0,591	6,23	3,906
<b>B1APY8</b>	ELAV-like protein OS=Homo sapiens GN=ELAVL4 PE=3 SV=1	3	1	42,4	9,38	1,776	3,821	3,627
<b>A0A024R0Q4</b>	Phospholipase D family, member 3, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PLD3 PE=4 SV=1	2	1	54,7	6,47	3,122	5,496	3,129
<b>B2R5W3</b>	cDNA, FLJ92658, highly similar to Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 (PARP1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	113	8,88	2,227	3,737	3,071
<b>P62263</b>	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3	16	2	16,3	10,05	1,617	1,236	3,046



<b>Q5JXB2</b>	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like OS=Homo sapiens GN=UBE2NL PE=1 SV=1	7	1	17,4	5,92	3,692	1,77	2,949
<b>H3BN98</b>	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=2	3	1	27,2	9,55	2,487	3,264	2,645
<b>P13647</b>	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	10	3	62,3	7,74		4,554	2,464
<b>Q14108</b>	Lysosome membrane protein 2 OS=Homo sapiens GN=SCARB2 PE=1 SV=2	4	2	54,3	5,14	4,335	7,365	2,441
<b>H6VRG1</b>	Keratin 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=3 SV=1	24	11	66,1	8,12	0,824	3,2	2,419
<b>Q08211</b>	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4	2	3	140,9	6,84	3,309	4,902	2,417

<b>X5DNI1</b>	Collapsin response mediator protein 1 isoform A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CRMP1 PE=2 SV=1	4	2	74,2	6,86	0,864	1,91	2,405
<b>A0A087X0X3</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=1 SV=1	8	4	77,5	8,78	2,702	3,266	2,399
<b>B3KN29</b>	cDNA FLJ13371 fis, clone PLACE1000656, highly similar to PRA1 family protein 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	1	19,3	9,19	1,735	3,154	2,201
<b>P23246</b>	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2	6	3	76,1	9,44	2,309	2,45	2,149

<b>P11279</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=LAMP1 PE=1 SV=3	5	2	44,9	8,75	2,846	5,777	2,144
<b>P48735</b>	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Homo sapiens GN=IDH2 PE=1 SV=2	5	2	50,9	8,69	2,943	4,188	2,123
<b>P55084</b>	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=1 SV=3	2	1	51,3	9,41	1,914	3,922	2,119
<b>P27348</b>	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1	18	2	27,7	4,78	2,29	1,888	2,117
<b>O75947</b>	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5H PE=1 SV=3	6	1	18,5	5,3	1,953	1,705	2,112

<b>B4DPP6</b>	cDNA FLJ54371, highly similar to Serum albumin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	4	70,3	6,09	0,489	0,604	2,104
<b>A0A090N8Y2</b>	Protein disulfide isomerase related protein (Calcium-binding protein, intestinal-related) OS=Homo sapiens GN=ERP70 PE=4 SV=1	9	5	72,9	5,07	0,681	1,779	1,99
<b>P52209</b>	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3	4	1	53,1	7,23	1,233	2,393	1,976
<b>A0A024R1A3</b>	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing), isoform	1	1	117,8	5,76	2,224	2,304	1,949

	CRA_a OS=Homo sapiens GN=UBE1 PE=3 SV=1							
<b>P14625</b>	Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	21	14	92,4	4,84	1,506	2,554	1,945
<b>V9HWB4</b>	Epididymis secretory sperm binding protein Li 89n OS=Homo sapiens GN=HEL-S-89n PE=2 SV=1	29	13	72,3	5,16	1,101	1,8	1,859
<b>B4DE59</b>	cDNA FLJ60424, highly similar to Junction plakoglobin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	2	62,6	5,17	0,001	8,934	1,858
<b>A0A024R371</b>	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=ARL6IP5 PE=4 SV=1	6	1	21,6	9,77	1,778	2,15	1,845

<b>O14828</b>	Secretory carrier-associated membrane protein 3 OS=Homo sapiens GN=SCAMP3 PE=1 SV=3	5	1	38,3	7,64	1,622	1,751	1,745
<b>P02545</b>	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	17	10	74,1	7,02	0,963	0,669	1,742
<b>P81605</b>	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	20	2	11,3	6,54	0,486	2,245	1,71
<b>B4DT31</b>	cDNA FLJ53425, highly similar to Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	2	69,8	7,36	5,511	0,737	1,694
<b>B1AVU8</b>	Saposin-D OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=1	7	4	61,7	5,22	0,862	0,741	1,675

<b>A8K616</b>	cDNA FLJ75092, highly similar to Homo sapiens golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3 (GGA3), transcript variant long, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	78,2	5,72	0,555	0,598	1,666
<b>Q6ZU64</b>	Coiled-coil domain-containing protein 108 OS=Homo sapiens GN=CCDC108 PE=2 SV=2	1	1	217,1	6,51	1,414	1,803	1,661
<b>B4DR52</b>	Histone H2B OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	16	3	18	10,32	1,158	13,63	1,661
<b>P50454</b>	Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	5	2	46,4	8,69	1,554	2,189	1,634
<b>V9HW80</b>	Epididymis luminal protein 220 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-70 PE=2 SV=1	4	3	89,3	5,26	1,788	1,253	1,63

<b>Q9UK08</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-8 OS=Homo sapiens GN=GNG8 PE=1 SV=1	23	1	7,8	7,14	1,733	2,037	1,612
<b>Q9BS26</b>	Endoplasmic reticulum resident protein 44 OS=Homo sapiens GN=ERP44 PE=1 SV=1	2	1	46,9	5,26	1,37	3,54	1,598
<b>A0A024R713</b>	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=DLD PE=3 SV=1	2	1	54,1	7,85	1,182	2,324	1,587
<b>P27824</b>	Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2	6	3	67,5	4,6	1,085	2,285	1,583
<b>A8K3C3</b>	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	3	57,9	7,83	1,858	2,215	1,485



<b>B2RB70</b>	Neurocalcin delta, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=NCALD PE=2 SV=1	4	1	22,2	5,35	0,676	1,667	1,484
<b>Q9NQ39</b>	Putative 40S ribosomal protein S10-like OS=Homo sapiens GN=RPS10P5 PE=5 SV=1	8	1	20,1	10,13	0,92	1,235	1,478
<b>Q9BVA1</b>	Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2B PE=1 SV=1	36	3	49,9	4,89	1,067	1,992	1,474
<b>Q6IBN6</b>	CBX1 protein OS=Homo sapiens GN=CBX1 PE=2 SV=1	6	1	21,4	4,93	1,623	0,846	1,473
<b>P04406</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	18	5	36	8,46	1,59	1,991	1,462
<b>P51991</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	11	2	39,6	9,01	1,374	1,637	1,46

	OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2							
<b>P35527</b>	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	16	6	62	5,24	1,066	3,182	1,404
<b>A0A0A0MQT0</b>	Retinol binding protein 1, cellular OS=Homo sapiens GN=RBP1 PE=4 SV=1	15	3	22,3	6,13	1,302	1,13	1,387
<b>P30101</b>	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	17	5	56,7	6,35	1,12	1,574	1,385
<b>E9PB61</b>	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ALYREF PE=1 SV=1	4	1	27,5	11,05	1,058	0,366	1,384
<b>V9HW43</b>	Epididymis secretory protein Li 102 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-102 PE=2 SV=1	18	3	22,8	6,4	0,807	0,754	1,367
<b>V5YQU3</b>	Receptor protein-tyrosine kinase OS=Homo sapiens	1	1	172,6	8,07	2,095	2,792	1,366

	GN=FGFR2-BICC1 PE=2 SV=1							
<b>B4DJ30</b>	cDNA FLJ61290, highly similar to Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	5	112,9	6,06	1,372	2,119	1,359
<b>Q8NF91</b>	Nesprin-1 OS=Homo sapiens GN=SYNE1 PE=1 SV=4	0	1	1010,5	5,53	0,759	1,182	1,355
<b>A8K878</b>	cDNA FLJ77177, highly similar to Homo sapiens arginine-rich, mutated in early stage tumors (ARMET), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	1	21,1	8,92	0,596	0,861	1,284
<b>A0A024QZN9</b>	Voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=VDAC2 PE=4 SV=1	9	3	34,5	7,99	1,93	3,164	1,283

<b>Q6FHX6</b>	Flap endonuclease 1 OS=Homo sapiens GN=FEN1 PE=2 SV=1	3	1	42,6	8,62	1,658	2,051	1,279
<b>P63261</b>	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	31	9	41,8	5,48	1,093	3,08	1,249
<b>Q59G24</b>	Activated RNA polymerase II transcription cofactor 4 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	1	15,1	9,38	1	0,618	1,249
<b>Q5U0I6</b>	H.sapiens ras-related Hrab1A protein OS=Homo sapiens GN=RAB1A PE=2 SV=1	15	1	22,7	6,21	1,814	1,871	1,245
<b>P62805</b>	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	39	4	11,4	11,36	2,499	1,137	1,236
<b>B3KNB4</b>	cDNA FLJ14168 fis, clone NT2RP2001440, highly	13	1	28,2	4,89	1,154	0,559	1,228

	similar to 14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>P62913</b>	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=1 SV=2	8	1	20,2	9,6	1,317	2,247	1,227
<b>P23396</b>	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2	18	4	26,7	9,66	1,148	1,712	1,216
<b>Q99714</b>	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=3	11	2	26,9	7,78	1,959	2,602	1,214
<b>P49411</b>	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2	17	7	49,5	7,61	1,891	2,221	1,191
<b>P56385</b>	ATP synthase subunit e, mitochondrial OS=Homo	25	2	7,9	9,35	1,194		1,183

	sapiens GN=ATP5I PE=1 SV=2							
<b>Q9Y277</b>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=VDAC3 PE=1 SV=1	7	1	30,6	8,66	1,85	2,268	1,179
<b>B2RBD5</b>	cDNA, FLJ95457, highly similar to Homo sapiens tubulin, beta, 4 (TUBB4), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	16	1	50,4	4,93	1,053	1,699	1,177
<b>P09382</b>	Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2	6	1	14,7	5,5	0,319	0,233	1,171
<b>P23284</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2	12	2	23,7	9,41	1,135	1,447	1,164

<b>B2RDW0</b>	cDNA, FLJ96792, highly similar to Homo sapiens calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) (CALM2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	38	6	16,8	4,22	0,743	0,54	1,156
<b>Q59GB4</b>	Dihydropyrimidinase-like 2 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	68,1	6,24	0,976	1,171	1,154
<b>P13073</b>	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX4I1 PE=1 SV=1	6	1	19,6	9,51	1,554	2,136	1,149
<b>A8K3H8</b>	cDNA FLJ77680, highly similar to Homo sapiens protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory	7	3	65,3	5,11	1,434	1,834	1,148

	subunit A (PR 65), alpha isoform (PPP2R1A), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>Q9Y5B9</b>	FACT complex subunit SPT16 OS=Homo sapiens GN=SUPT16H PE=1 SV=1	2	2	119,8	5,66	1,702	1,643	1,145
<b>P31150</b>	Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=GDI1 PE=1 SV=2	4	1	50,6	5,14	0,893	1,164	1,139
<b>P68104</b>	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	13	6	50,1	9,01	1,368	2,012	1,13
<b>P99999</b>	Cytochrome c OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=2	18	2	11,7	9,57	0,665	0,52	1,103



<b>O75367</b>	Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens GN=H2AFY PE=1 SV=4	2	1	39,6	9,79	2,396	0,824	1,102
<b>Q59GX6</b>	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	74,5	7,75	1,116	1,51	1,102
<b>Q13435</b>	Splicing factor 3B subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SF3B2 PE=1 SV=2	3	2	100,2	5,67	0,855	0,445	1,098
<b>B5BUE6</b>	ATP-dependent RNA helicase DDX5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DDX5 PE=2 SV=1	11	7	69,1	8,92	1,168	1,479	1,083
<b>A0A024RAD5</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo	2	1	50,7	6,4	1,061	2,872	1,063

	sapiens GN=DDOST PE=3 SV=1							
<b>V9HWE0</b>	Annexin OS=Homo sapiens GN=HEL-S-7 PE=2 SV=1	12	3	35,9	5,05	1,285	1,776	1,06
<b>Q5JWF2</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas OS=Homo sapiens GN=GNAS PE=1 SV=2	1	1	111	5,03	0,957	1,31	1,05
<b>A0A087WWD4</b>	Neural cell adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens GN=NCAM1 PE=4 SV=1	3	2	97,3	4,93	1,165	1,296	1,048
<b>P00338</b>	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	6	2	36,7	8,27	1,883	0,585	1,041
<b>Q14257</b>	Reticulocalbin-2 OS=Homo sapiens GN=RCN2 PE=1 SV=1	3	1	36,9	4,4	1,149	1,58	1,037

<b>P51149</b>	Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1	18	3	23,5	6,7	0,935	1,095	1,035
<b>P60866</b>	40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1	9	1	13,4	9,94	0,998	1,145	1,027
<b>V9HW26</b>	ATP synthase subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HEL-S-123m PE=2 SV=1	17	8	59,7	9,13	1,204	1,726	1,026
<b>A0A024R0L6</b>	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, gamma subunit 29kDa, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PAFAH1B3 PE=4 SV=1	7	1	25,7	6,84	1,043	1,466	1,019
<b>P04843</b>	Dolichyl- diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase	6	3	68,5	6,38	1,264	1,736	1,015

	subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1							
<b>P62851</b>	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1	8	1	13,7	10,11	1,566	1,456	1,014
<b>E9KL48</b>	Epididymis tissue sperm binding protein Li 18mP OS=Homo sapiens GN=GLUD1 PE=2 SV=1	2	1	61,4	7,8	1,442	1,618	1,009
<b>O43175</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4	4	2	56,6	6,71	0,843	1,598	1,005
<b>A8K3Q7</b>	Annexin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	75,8	5,55	1,017	1,376	1,004
<b>B2R9K8</b>	cDNA, FLJ94440, highly similar to Homo sapiens chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)(CCT6A),	7	4	57,9	6,8	1,299	1,488	1,003

	mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>Q9UMX5</b>	Neudesin OS=Homo sapiens GN=NENF PE=1 SV=1	12	2	18,8	5,69	0,557	0,814	0,998
<b>H7BZJ3</b>	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=1	38	1	13,5	7,3	0,717	0,972	0,995
<b>Q01844</b>	RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens GN=EWSR1 PE=1 SV=1	4	2	68,4	9,33	0,931	0,709	0,993
<b>P17987</b>	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1	10	5	60,3	6,11	1,371	1,55	0,993
<b>P04259</b>	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5	13	1	60	8	0,293	0,298	0,983
<b>P45974</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 OS=Homo	4	2	95,7	5,03	1,527	1,017	0,976

	sapiens GN=USP5 PE=1 SV=2							
<b>F4ZW66</b>	NF110b OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	2	95,7	8,81	1,183	1,532	0,97
<b>F5H5D3</b>	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1	25	1	57,7	5,07	1,06	1,415	0,97
<b>F8WAR4</b>	MICOS complex subunit MIC19 OS=Homo sapiens GN=CHCHD3 PE=1 SV=1	5	1	27,7	6,64	1,14	0,972	0,969
<b>Q00839</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6	8	6	90,5	6	1,371	1,591	0,968
<b>A0A024RDS1</b>	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1, isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=HSPH1 PE=3 SV=1	2	1	96,8	5,39	1,722	1,32	0,952

<b>Q6IPH7</b>	RPL14 protein OS=Homo sapiens GN=RPL14 PE=2 SV=1	5	1	23,8	10,93	0,001	2,804	0,95
<b>Q16352</b>	Alpha-internexin OS=Homo sapiens GN=INA PE=1 SV=2	6	2	55,4	5,4	0,789	1,14	0,948
<b>P21796</b>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2	20	4	30,8	8,54	1,627	2,297	0,946
<b>Q14204</b>	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	1	2	532,1	6,4	0,957	1,453	0,942
<b>A2A3R6</b>	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RPS6 PE=2 SV=1	5	1	28,7	10,84	1,45	2,429	0,913
<b>Q16658</b>	Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3	11	5	54,5	7,24	1,218	1,592	0,908

<b>Q99623</b>	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2	20	6	33,3	9,83	1,64	2,335	0,898
<b>Q5SU16</b>	Beta 5-tubulin OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=2 SV=1	33	2	49,6	4,89	0,855	1,824	0,897
<b>Q71U36</b>	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	28	1	50,1	5,06	1,489	0,485	0,885
<b>P62269</b>	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3	13	2	17,7	10,99	2,076	0,421	0,872
<b>H3BNX8</b>	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=1	6	1	17,2	6	0,842	0,973	0,871
<b>A8K401</b>	Prohibitin, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PHB PE=2 SV=1	42	10	29,8	5,76	1,496	1,95	0,862



<b>I3L0A0</b>	HCG2044781 OS=Homo sapiens GN=TMEM189-UBE2V1 PE=4 SV=1	3	1	42,2	6,71	1,035	0,001	0,862
<b>B2R7W4</b>	cDNA, FLJ93632, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (HNRPR), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	3	70,9	7,74	1,182	1,2	0,86
<b>P07737</b>	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	39	4	15	8,27	0,834	0,494	0,86
<b>Q9Y2V2</b>	Calcium-regulated heat stable protein 1 OS=Homo sapiens GN=CARHSP1 PE=1 SV=2	11	1	15,9	8,21	0,294	0,471	0,859
<b>B7Z268</b>	Single-stranded DNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=2 SV=1	14	2	18,5	10,1	1,457	0,872	0,857

<b>P05141</b>	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7	16	2	32,8	9,69	1,265	1,534	0,855
<b>P49327</b>	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3	0	1	273,3	6,44	0,961	0,938	0,845
<b>P35998</b>	26S protease regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMC2 PE=1 SV=3	3	1	48,6	5,95	1,181	2,503	0,844
<b>A0A087WYR3</b>	Tumor protein D54 OS=Homo sapiens GN=TPD52L2 PE=1 SV=1	4	1	23,8	6,55	0,932	0,687	0,834
<b>B2RDE1</b>	cDNA, FLJ96568, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 3 (TPM3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	27	7	29	4,75	0,542	0,24	0,83

<b>P08238</b>	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	26	7	83,2	5,03	1,019	0,962	0,828
<b>V9HW88</b>	Calreticulin, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=HEL-S-99n PE=2 SV=1	9	2	48,1	4,44	0,865	0,83	0,827
<b>A8K3B9</b>	Reticulon OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	9	2	23,5	8,91	1,597	1,709	0,824
<b>A0A024RAM4</b>	Microtubule-associated protein 1B, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=MAP1B PE=4 SV=1	2	2	270,5	4,81	0,884	0,7	0,82
<b>V9HW22</b>	Epididymis luminal protein 33 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-72p PE=2 SV=1	23	7	70,9	5,52	0,863	0,881	0,815
<b>Q59EI9</b>	ADP,ATP carrier protein, liver isoform T2 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	12	1	35,4	9,85	0,784	1,378	0,814

<b>P22626</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	28	8	37,4	8,95	0,962	0,803	0,811
<b>G8JLB6</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1	9	3	51,2	6,8	1,042	1,463	0,805
<b>Q15084</b>	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	18	6	48,1	5,08	1,008	1,293	0,803
<b>P30050</b>	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1	15	2	17,8	9,42	0,766	0,648	0,802
<b>H7C2I1</b>	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=PRMT1 PE=4 SV=1	3	1	42,4	5,35	2,142	2,306	0,799

<b>G9K388</b>	YWHAE/FAM22A fusion protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAE/FAM22A fusion PE=2 SV=1	14	3	41,2	4,97	1,035	0,747	0,79
<b>A0A024R1N4</b>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=4 SV=1	2	1	69,8	6,64	1,302	0,965	0,788
<b>F8WF69</b>	Clathrin light chain A OS=Homo sapiens GN=CLTA PE=1 SV=1	10	3	27,8	4,91	0,621	0,325	0,786
<b>F5GXR3</b>	Parathyrosin OS=Homo sapiens GN=PTMS PE=1 SV=1	11	1	12,1	11	1,388	0,826	0,782
<b>Q17RC7</b>	Exocyst complex component 3-like protein 4 OS=Homo	1	1	79,8	6,32	2,519	1,032	0,78

	sapiens GN=EXOC3L4 PE=2 SV=2							
<b>E9KL35</b>	Epididymis tissue sperm binding protein Li 3a OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	10	3	35,1	7,69	1,575	1,467	0,774
<b>Q06323</b>	Proteasome activator complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSME1 PE=1 SV=1	4	1	28,7	6,02	0,775	0,324	0,772
<b>Q53GR7</b>	Solute carrier family 25, member 13 (Citrin) variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	74,1	8,38	1,644	1,972	0,772
<b>Q53HB7</b>	Diablo isoform 1 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	27,1	6,4	0,993	0,579	0,77
<b>P10809</b>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo	32	13	61	5,87	1,334	1,618	0,768

	sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2							
<b>D6R956</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens GN=UCHL1 PE=1 SV=1	7	2	26,8	5,81	0,738	0,502	0,764
<b>P13639</b>	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	5	4	95,3	6,83	1,274	1,177	0,763
<b>B4DH02</b>	cDNA FLJ50510, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	94,3	5,19	1,023	0,999	0,763
<b>P14866</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens GN=HNRNPL PE=1 SV=2	11	4	64,1	8,22	1,05	1,148	0,748
<b>A0A087WVQ6</b>	Clathrin heavy chain OS=Homo sapiens GN=CLTC PE=3 SV=1	3	4	191,9	5,69	1,436	1,367	0,746

<b>Q8N1C8</b>	HSPA9 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=2 SV=1	8	4	73,8	6,37	0,94	1,018	0,745
<b>A0A024R5Z9</b>	Pyruvate kinase OS=Homo sapiens GN=PKM2 PE=3 SV=1	21	8	58	7,71	0,954	1,038	0,745
<b>J3KPS3</b>	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=3 SV=1	8	3	39,8	8,09	0,781	0,699	0,742
<b>B4DL85</b>	cDNA FLJ60660, highly similar to Hematological and neurological expressed1-like protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	13	2	22,1	9,31	0,328	0,281	0,741
<b>B4DJQ5</b>	cDNA FLJ59211, highly similar to Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	3	60,1	4,42	0,866	1,202	0,736



<b>Q13185</b>	Chromobox protein homolog 3 OS=Homo sapiens GN=CBX3 PE=1 SV=4	6	1	20,8	5,33	0,671	0,386	0,726
<b>P07900</b>	Heat shock protein HSP 90- alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	22	6	84,6	5,02	1,229	1,143	0,725
<b>B2R4P2</b>	cDNA, FLJ92164, highly similar to Homo sapiens peroxiredoxin 1 (PRDX1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	14	2	22,2	8,38	0,791	0,951	0,725
<b>V9HW77</b>	Epididymis luminal protein 211 OS=Homo sapiens GN=HEL-211 PE=2 SV=1	10	3	42,6	5,59	0,754	0,754	0,721
<b>A0A024QZK8</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HNRPH3 PE=4 SV=1	16	5	36,9	6,87	0,739	1,012	0,719

<b>P30044</b>	Peroxisredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5 PE=1 SV=4	17	3	22,1	8,7	0,71	0,469	0,716
<b>Q9H9B4</b>	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens GN=SFXN1 PE=1 SV=4	5	1	35,6	9,07	1,207	0,001	0,713
<b>P30626</b>	Sorcin OS=Homo sapiens GN=SRI PE=1 SV=1	5	1	21,7	5,59	0,688	0,358	0,708
<b>Q5EC54</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K transcript variant OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=2 SV=1	18	7	51	5,33	1,066	1,149	0,703
<b>A8K7F6</b>	cDNA FLJ78244, highly similar to Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1 (EIF4A1), mRNA	9	4	46,1	5,48	1,526	1,48	0,699

	OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>Q59H77</b>	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	2	63,5	6,43	1,033	1,104	0,697
<b>A0A024RDR0</b>	High-mobility group box 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HMGB1 PE=4 SV=1	6	1	24,9	5,74	0,768	0,674	0,694
<b>Q9UMS4</b>	Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Homo sapiens GN=PRPF19 PE=1 SV=1	4	1	55,1	6,61	0,669	1,031	0,691
<b>A0A024R8S5</b>	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=3 SV=1	12	6	57,1	4,87	0,802	0,853	0,684
<b>P50990</b>	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4	11	5	59,6	5,6	1,18	1,101	0,68

<b>P20700</b>	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	6	3	66,4	5,16	0,772	0,585	0,675
<b>P58546</b>	Myotrophin OS=Homo sapiens GN=MTPN PE=1 SV=2	14	1	12,9	5,52	0,515	0,347	0,672
<b>J7M2B1</b>	Tyrosine-protein kinase receptor OS=Homo sapiens GN=EZR-ROS1 PE=2 SV=1	1	1	98,9	6,13	0,664	0,001	0,671
<b>V9HW12</b>	Epididymis secretory sperm binding protein Li 2a OS=Homo sapiens GN=HEL-S-2a PE=2 SV=1	23	4	21,9	5,97	0,766	0,721	0,67
<b>P12268</b>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens GN=IMPDH2 PE=1 SV=2	4	2	55,8	6,9	1,425	1,454	0,67
<b>V9HW31</b>	ATP synthase subunit beta OS=Homo sapiens GN=HEL-S-271 PE=2 SV=1	20	8	56,5	5,4	1,087	1,187	0,661

<b>A0A024R2P0</b>	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=3 SV=1	19	4	32,8	4,87	1,155	0,821	0,661
<b>B2RDY9</b>	Adenylyl cyclase-associated protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	51,6	8,22	0,645	0,468	0,657
<b>B8ZWD9</b>	Diazepam binding inhibitor, splice form 1D(2) OS=Homo sapiens GN=DBI PE=2 SV=1	6	1	16,1	5,05	0,569	0,44	0,657
<b>B2R8R5</b>	cDNA, FLJ94025, highly similar to Homo sapiens tripartite motif-containing 28 (TRIM28), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	5	88,5	5,77	0,906	0,97	0,648
<b>B5MDF5</b>	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens GN=RAN PE=4 SV=1	14	3	26,2	7,01	1,758	1,197	0,644

<b>A8K9A4</b>	cDNA FLJ75154, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	6	2	33,6	5,14	0,951	0,928	0,64
<b>Q14103</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=1	6	1	38,4	7,81	0,587	0,413	0,639
<b>Q9Y230</b>	RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=3	2	1	51,1	5,64	0,853	0,861	0,637
<b>P22234</b>	Multifunctional protein ADE2 OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=1 SV=3	8	3	47	7,23	1,084	0,744	0,632
<b>P30040</b>	Endoplasmic reticulum resident protein 29	5	1	29	7,31	0,438	0,524	0,619

	OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4							
<b>P78371</b>	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4	3	1	57,5	6,46	0,897	0,661	0,615
<b>P00558</b>	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3	6	2	44,6	8,1	0,718	0,663	0,614
<b>Q15717</b>	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELAVL1 PE=1 SV=2	4	1	36,1	9,17	0,812	0,245	0,61
<b>P61604</b>	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2	35	3	10,9	8,92	0,397	0,345	0,609
<b>P49321</b>	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Homo sapiens GN=NASP PE=1 SV=2	4	3	85,2	4,3	1,28	0,746	0,608

<b>Q15008</b>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens GN=PSMD6 PE=1 SV=1	2	1	45,5	5,62	0,884	1,305	0,606
<b>B5BU83</b>	Stathmin OS=Homo sapiens GN=STMN1 PE=2 SV=1	41	6	17,3	5,97	0,435	0,269	0,597
<b>O00148</b>	ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens GN=DDX39A PE=1 SV=2	14	4	49,1	5,68	0,987	1,117	0,591
<b>P10606</b>	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5B PE=1 SV=2	9	1	13,7	8,81	0,702	0,754	0,586
<b>O60925</b>	Prefoldin subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PFDN1 PE=1 SV=2	9	1	14,2	6,81	0,413	0,239	0,584
<b>P23528</b>	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3	40	5	18,5	8,09	0,619	0,337	0,58



<b>Q9UBL6</b>	Copine-7 OS=Homo sapiens GN=CPNE7 PE=2 SV=1	1	1	70,2	6,38	0,803	1,183	0,578
<b>P06733</b>	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	17	4	47,1	7,39	0,899	0,431	0,577
<b>P62979</b>	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2	22	3	18	9,64	0,673	0,627	0,576
<b>P21333</b>	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	1	1	280,6	6,06	0,854	0,681	0,572
<b>P27635</b>	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=4	4	1	24,6	10,08	1,508	2,3	0,57
<b>P37802</b>	Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3	19	3	22,4	8,25	1,19	0,348	0,568
<b>A0A024RDF6</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like,	4	1	46,4	9,57	0,482	0,361	0,568

	isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HNRPDL PE=4 SV=1							
<b>Q15019</b>	Septin-2 OS=Homo sapiens GN=SEPT2 PE=1 SV=1	2	1	41,5	6,6	1,184	0,85	0,567
<b>B7Z525</b>	cDNA FLJ55039, moderately similar to Hepatoma-derived growth factor OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	1	28,8	5,15	0,758	0,517	0,566
<b>Q5JR94</b>	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=2 SV=1	6	1	24,2	10,32	0,972	1,345	0,563
<b>B4DI54</b>	cDNA FLJ56386, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1L OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	1	77,5	8,06	0,457	0,478	0,558
<b>Q92804</b>	TATA-binding protein-associated factor 2N	4	2	61,8	8,02	0,619	0,351	0,552

	OS=Homo sapiens GN=TAF15 PE=1 SV=1							
<b>V9HWC7</b>	Epididymis secretory sperm binding protein Li 128m OS=Homo sapiens GN=HEL-S-128m PE=2 SV=1	4	1	25	6,38	0,834	0,745	0,549
<b>Q16643</b>	Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1 PE=1 SV=4	9	4	71,4	4,45	0,466	0,415	0,549
<b>P25398</b>	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3	31	3	14,5	7,21	0,685	0,498	0,549
<b>P0C0S5</b>	Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2	23	1	13,5	10,58	0,722	0,512	0,545
<b>E9PRY8</b>	Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D PE=1 SV=1	2	1	76,5	7,05	0,88	0,606	0,537

<b>Q86SX6</b>	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLRX5 PE=1 SV=2	9	1	16,6	6,79	0,409	0,001	0,526
<b>H9ZYJ2</b>	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=2 SV=1	21	2	11,7	4,92	0,402	0,135	0,525
<b>P12004</b>	Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1	7	1	28,8	4,69	0,656	0,841	0,524
<b>E9PL57</b>	Protein NEDD8-MDP1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NEDD8-MDP1 PE=4 SV=1	6	1	19,5	7,43	0,404	0,126	0,523
<b>P23526</b>	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4	5	2	47,7	6,34	0,927	0,993	0,523

<b>Q99497</b>	Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2	14	1	19,9	6,79	0,519	0,348	0,519
<b>B7Z6Z4</b>	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1	11	2	26,7	5,08	0,621	0,42	0,514
<b>A0A024R3W7</b>	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=3 SV=1	6	1	24,7	4,67	0,523	0,462	0,513
<b>V9HW37</b>	Epididymis secretory protein Li 69 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-69 PE=2 SV=1	4	2	59,6	5,66	0,641	0,744	0,507
<b>A0A024R5Z7</b>	Annexin OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=3 SV=1	3	1	38,6	7,75	0,914	0,304	0,505
<b>A0A087WTP3</b>	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo	3	2	73	7,71	0,561	0,54	0,504

	sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=1							
<b>B3KQF5</b>	cDNA FLJ90381 fis, clone NT2RP2005035, highly similar to Calumenin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	27	8	37	4,67	0,725	1,003	0,502
<b>A8K690</b>	cDNA FLJ76863, highly similar to Homo sapiens stress-induced- phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) (STIP1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3	2	62,6	6,8	0,447	0,249	0,493
<b>A8K4Z4</b>	cDNA FLJ75549, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), transcript variant 1,	13	2	34,2	5,97	0,959	0,784	0,476

	mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>B2R9U2</b>	cDNA, FLJ94557, highly similar to Homo sapiens FK506 binding protein 4, 59kDa (FKBP4), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	2	51,8	5,43	0,768	0,584	0,474
<b>Q8WW12</b>	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein OS=Homo sapiens GN=PCNP PE=1 SV=2	8	1	18,9	7,49	0,495	0,308	0,467
<b>H0Y449</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=1	11	2	42	10,43	0,277	0,039	0,46
<b>P13010</b>	X-ray repair cross-complementing protein 5	1	1	82,7	5,81	0,873	0,785	0,455

	OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3							
<b>P40926</b>	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	13	3	35,5	8,68	0,792	0,645	0,45
<b>A0A024RAZ7</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=HNRPA1 PE=4 SV=1	11	3	38,7	9,13	0,422	0,514	0,449
<b>A8K486</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	27	4	18	6,9	0,639	0,382	0,443
<b>P29966</b>	Myristoylated alanine-rich C- kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=4	25	3	31,5	4,45	0,425	0,03	0,433



<b>P60174</b>	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=3	14	3	30,8	5,92	0,532	0,364	0,43
<b>J3QRS3</b>	Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=4 SV=1	6	1	20,4	4,75	0,528	0,255	0,428
<b>Q9H2G2</b>	STE20-like serine/threonine- protein kinase OS=Homo sapiens GN=SLK PE=1 SV=1	2	1	142,6	5,15	1,667	1,468	0,428
<b>A8K6V3</b>	cDNA FLJ78677, highly similar to Homo sapiens splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa (SF3B3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1	1	135,5	5,21	0,758	0,812	0,415
<b>A0A024R6W0</b>	Aspartate aminotransferase OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=3 SV=1	6	2	47,4	9,01	0,74	0,554	0,412

<b>P30048</b>	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 PE=1 SV=3	5	1	27,7	7,78	0,785	0,544	0,404
<b>B2R6F3</b>	Splicing factor arginine/serine-rich 3 OS=Homo sapiens GN=SFRS3 PE=2 SV=1	13	2	19,3	11,65	0,441	0,362	0,4
<b>H9STE0</b>	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=COX2 PE=3 SV=1	4	1	25,9	4,82	0,892	1,271	0,398
<b>Q9BRL6</b>	Serine/arginine-rich splicing factor 8 OS=Homo sapiens GN=SRSF8 PE=1 SV=1	3	1	32,3	11,72	0,582	0,27	0,397
<b>P16402</b>	Histone H1.3 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1D PE=1 SV=2	17	1	22,3	11,02	0,583	0,21	0,392

<b>D9IAI1</b>	Epididymis secretory protein Li 34 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-34 PE=2 SV=1	7	1	21	7,53	0,413	0,241	0,39
<b>A8K651</b>	cDNA FLJ75700, highly similar to Homo sapiens complement component 1, q subcomponent binding protein (C1QBP), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	31,4	4,84	0,413	0,319	0,385
<b>H3BVE0</b>	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=3 SV=1	6	1	27,6	6,71	0,496	0,194	0,382
<b>A0A024R5H0</b>	Barrier to autointegration factor 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=BANF1 PE=4 SV=1	13	1	10,1	6,09	0,88	1,925	0,365

<b>P10645</b>	Chromogranin-A OS=Homo sapiens GN=CHGA PE=1 SV=7	14	4	50,7	4,6	0,414	0,29	0,363
<b>A8K588</b>	cDNA FLJ76823, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 6 (SFRS6), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	12	4	39,5	11,4	0,435	0,322	0,359
<b>P46776</b>	60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens GN=RPL27A PE=1 SV=2	14	2	16,6	11	1,163	0,856	0,354
<b>Q86U42</b>	Polyadenylate-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PABPN1 PE=1 SV=3	9	2	32,7	5,06	0,534	0,46	0,346
<b>P05387</b>	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1	70	5	11,7	4,54	0,383	0,144	0,336

<b>P19338</b>	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3	11	8	76,6	4,7	0,465	0,215	0,336
<b>E9PQY2</b>	Prefoldin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PFDN4 PE=1 SV=1	9	1	15,6	4,58	0,354	0,09	0,333
<b>E9PAV3</b>	Nascent polypeptide- associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Homo sapiens GN=NACA PE=1 SV=1	1	2	205,3	9,58	0,502	0,215	0,333
<b>B2R4R9</b>	HCG26477 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=2 SV=1	17	1	7,8	10,7	0,311	0,155	0,33
<b>A8K3M9</b>	cDNA FLJ76387, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 9 (SFRS9), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	1	25,5	8,65	0,397	0,27	0,329

<b>Q16629</b>	Serine/arginine-rich splicing factor 7 OS=Homo sapiens GN=SRSF7 PE=1 SV=1	5	1	27,4	11,82	0,56	0,437	0,328
<b>Q9UHV9</b>	Prefoldin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PFDN2 PE=1 SV=1	9	1	16,6	6,58	0,375	0,138	0,325
<b>P62310</b>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3 OS=Homo sapiens GN=LSM3 PE=1 SV=2	33	2	11,8	4,7	0,303	0,234	0,318
<b>P07954</b>	Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=FH PE=1 SV=3	3	1	54,6	8,76	0,581	0,817	0,312
<b>Q53HU8</b>	Vimentin variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	11	4	53,7	5,12	0,945	0,341	0,305
<b>B2R5B3</b>	Histone H2A OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	27	1	14,1	11,06	0,733	0,415	0,303

<b>J3KTL2</b>	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SRSF1 PE=4 SV=1	17	4	28,3	10,08	0,324	0,274	0,303
<b>Q5STK2</b>	Prefoldin subunit 6, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PFDN6 PE=2 SV=1	6	1	14,6	8,88	0,214	0,234	0,3
<b>Q5VXV3</b>	SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=2 SV=1	18	4	33,5	4,32	0,54	0,189	0,293
<b>I3L504</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=1	11	2	20,5	5,25	0,312	0,24	0,292
<b>Q13442</b>	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein OS=Homo sapiens GN=PDAP1 PE=1 SV=1	7	1	20,6	8,87	0,248	0,122	0,29
<b>P67936</b>	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3	19	3	28,5	4,69	0,335	0,174	0,286

<b>P55081</b>	Microfibrillar-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=MFAP1 PE=1 SV=2	3	1	51,9	4,98	0,34	0,106	0,283
<b>Q15056</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens GN=EIF4H PE=1 SV=5	9	2	27,4	7,23	0,354	0,001	0,258
<b>A0A024RBB7</b>	Nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=3 SV=1	4	1	45,3	4,46	0,612	0,368	0,244
<b>P39687</b>	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN=ANP32A PE=1 SV=1	8	2	28,6	4,09	0,539	0,217	0,236
<b>P49915</b>	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Homo	2	1	76,7	6,87	0,77	1,148	0,222



	sapiens GN=GMPS PE=1 SV=1							
<b>Q13595</b>	Transformer-2 protein homolog alpha OS=Homo sapiens GN=TRA2A PE=1 SV=1	5	1	32,7	11,27	0,371	0,401	0,203
<b>B2R7B5</b>	cDNA, FLJ93365, highly similar to Homo sapiens KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1 (KHDRBS1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	9	1	48,2	8,66	0,001	0,694	0,165
<b>P30939</b>	5-hydroxytryptamine receptor 1F OS=Homo sapiens GN=HTR1F PE=2 SV=1	8	1	41,7	8,87	0,588	0,434	0,157

<b>P39023</b>	60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=2	2	1	46,1	10,18	0,526	0,091	0,096
<b>O43707</b>	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2	1	1	104,8	5,44	0,886	0,34	0,001
<b>Q15293</b>	Reticulocalbin-1 OS=Homo sapiens GN=RCN1 PE=1 SV=1	4	1	38,9	5	0,487	0,181	0,001
<b>P61026</b>	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1	17	1	22,5	8,38	0,987	1,297	0,001
<b>A0A024R6C9</b>	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=DLST PE=3 SV=1	3	1	48,7	8,95	1,477	1,744	0,001

<b>B7Z7U0</b>	cDNA FLJ61739, highly similar to Serine/arginine repetitive matrix protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	103,7	11,82	0,001	0,001	0,001
<b>O75643</b>	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=SNRNP200 PE=1 SV=2	1	1	244,4	6,06	0,739	0,832	0,001
<b>P29401</b>	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	2	1	67,8	7,66	1,127	0,619	0,001
<b>A0A024R1K7</b>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=3 SV=1	13	1	28,2	4,84	10,435	0,001	0,001

<b>P43246</b>	DNA mismatch repair protein Msh2 OS=Homo sapiens GN=MSH2 PE=1 SV=1	1	1	104,7	5,77	1,543	3,91	0,001
<b>Q6ZN40</b>	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_f OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=2 SV=1	10	1	37,4	4,72	0,001	0,001	0,001
<b>P33316</b>	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DUT PE=1 SV=4	5	1	26,5	9,36	0,325	0,001	0,001
<b>Q59GX9</b>	Ribosomal protein L5 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	5	1	35,2	9,85	0,001	0,001	0,001
<b>A0A024R1A4</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=UBE2L3 PE=3 SV=1	14	1	17,9	8,51	0,327	0,001	0,001

<b>P06454</b>	Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=1 SV=2	23	2	12,2	3,78			
<b>Q01469</b>	Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=3	7	1	15,2	7,01			
<b>A0A090N8Y5</b>	LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) OS=Homo sapiens GN=LSM5 PE=4 SV=1	22	1	9,9	4,54			
<b>P26641</b>	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	3	1	50,1	6,67			
<b>Q16891</b>	MICOS complex subunit MIC60 OS=Homo sapiens GN=IMMT PE=1 SV=1	1	1	83,6	6,48	1000	1000	

<b>O75934</b>	Pre-mRNA-splicing factor SPF27 OS=Homo sapiens GN=BCAS2 PE=1 SV=1	13	1	26,1	5,66			
<b>O75822</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Homo sapiens GN=EIF3J PE=1 SV=2	10	1	29	4,83			
<b>O43324</b>	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1 OS=Homo sapiens GN=EEF1E1 PE=1 SV=1	7	1	19,8	8,54			
<b>Q9NPD3</b>	Exosome complex component RRP41 OS=Homo sapiens GN=EXOSC4 PE=1 SV=3	5	1	26,4	6,52			
<b>B5BU08</b>	U2 small nuclear RNA auxillary factor 1 isoform a OS=Homo sapiens GN=U2AF1 PE=2 SV=1	5	1	27,9	8,54			

<b>P12270</b>	Nucleoprotein TPR OS=Homo sapiens GN=TPR PE=1 SV=3	0	1	267,1	5,02			
<b>A8K5T7</b>	cDNA FLJ75365, highly similar to Homo sapiens SUGT1B (SUGT1) mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	41	5,16			
<b>Q6QNY1</b>	Biogenesis of lysosome- related organelles complex 1 subunit 2 OS=Homo sapiens GN=BLOC1S2 PE=1 SV=1	8	1	16	4,86			
<b>A0A087WU53</b>	Magnesium transporter protein 1 OS=Homo sapiens GN=MAGT1 PE=1 SV=1	2	1	41,5	9,94			
<b>Q53GL6</b>	RNA binding protein (Autoantigenic, hnRNP- associated with lethal yellow) long isoform variant	3	1	32,5	9,17			

	(Fragment) OS=Homo sapiens GN=RALY PE=2 SV=1							
<b>Q53GB0</b>	Mitochondrial import receptor Tom22 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	15	1	15,5	4,34			
<b>Q53GW1</b>	Vesicle transport-related protein isoform a variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	72,3	6,38			
<b>P59768</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2 OS=Homo sapiens GN=GNG2 PE=1 SV=2	18	1	7,8	7,99			
<b>Q7Z5L9</b>	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	2	1	61	8,69			



	OS=Homo sapiens GN=IRF2BP2 PE=1 SV=2							
<b>P52434</b>	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3 OS=Homo sapiens GN=POLR2H PE=1 SV=4	9	1	17,1	4,68			
<b>A8K525</b>	cDNA FLJ76817, highly similar to Homo sapiens non- POU domain containing, octamer-binding (NONO), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	7	1	54,3	9,2	1000	1000	
<b>V9HW44</b>	Epididymis secretory protein Li 303 OS=Homo sapiens GN=HEL-S-303 PE=2 SV=1	10	1	25,6	5,92			
<b>P63313</b>	Thymosin beta-10 OS=Homo sapiens GN=TMSB10 PE=1 SV=2	34	1	5	5,36			

<b>O76003</b>	Glutaredoxin-3 OS=Homo sapiens GN=GLRX3 PE=1 SV=2	8	1	37,4	5,39			
<b>J3KPC8</b>	Serine/threonine-protein kinase SIK3 OS=Homo sapiens GN=SIK3 PE=1 SV=1	2	1	144,8	6,79			
<b>Q08945</b>	FACT complex subunit SSRP1 OS=Homo sapiens GN=SSRP1 PE=1 SV=1	2	1	81	6,87			
<b>B7Z596</b>	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=2 SV=1	11	1	31,7	4,89			
<b>Q8NDC0</b>	MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like OS=Homo sapiens GN=MAPK1IP1L PE=1 SV=4	7	1	24,3	5,62			

<b>A0A024RDY0</b>	RAN binding protein 5, isoform CRA_d OS=Homo sapiens GN=RANBP5 PE=4 SV=1	2	1	123,6	4,94			
<b>Q9Y654</b>	Heterochromatin-specific nonhistone protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CBX1 PE=1 SV=1	7	1	17,5	4,89			
<b>Q9P019</b>	14 kDa phosphohistidine phosphatase OS=Homo sapiens GN=PHPT1 PE=2 SV=1	11	1	19,9	10,76			
<b>E3VSK7</b>	NUP98/RARG fusion protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	8	1	31,7	8,59			
<b>B2RBX8</b>	cDNA, FLJ95758, highly similar to Homo sapiens GCIP-interacting protein p29	12	1	28,7	8,28			

	(P29), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>Q96P67</b>	Probable G-protein coupled receptor 82 OS=Homo sapiens GN=GPR82 PE=2 SV=1	13	1	38,4	9,03			
<b>P16403</b>	Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2	17	1	21,4	10,93			
<b>A0A024R5H8</b>	RAB6A, member RAS oncogene family, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=RAB6A PE=3 SV=1	11	1	23,5	5,54			
<b>O60869</b>	Endothelial differentiation-related factor 1 OS=Homo sapiens GN=EDF1 PE=1 SV=1	9	1	16,4	9,95			
<b>Q15691</b>	Microtubule-associated protein RP/EB family	6	1	30	5,14			

	member 1 OS=Homo sapiens GN=MAPRE1 PE=1 SV=3							
<b>Q3T8J9</b>	GON-4-like protein OS=Homo sapiens GN=GON4L PE=1 SV=1	2	1	248,5	5,01			
<b>A0A024R6D4</b>	Enhancer of rudimentary homolog OS=Homo sapiens GN=ERH PE=3 SV=1	12	1	12,3	5,92			
<b>A0A023HJ61</b>	HRES-1/RAB4 variant OS=Homo sapiens GN=RAB4A PE=2 SV=1	20	1	13,6	8,18			
<b>Q15637</b>	Splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SF1 PE=1 SV=4	2	1	68,3	8,98			
<b>Q96BY7</b>	Autophagy-related protein 2 homolog B OS=Homo sapiens GN=ATG2B PE=1 SV=5	0	1	232,6	5,76			

<b>E9PI68</b>	Signal peptidase complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SPCS2 PE=1 SV=1	4	1	28,5	8,79			
<b>L7RXH5</b>	Mitogen-activated protein kinase OS=Homo sapiens GN=MAPK3 PE=2 SV=1	4	1	43,1	6,74			
<b>P09417</b>	Dihydropteridine reductase OS=Homo sapiens GN=QDPR PE=1 SV=2	5	1	25,8	7,37			
<b>P61803</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1 OS=Homo sapiens GN=DAD1 PE=1 SV=3	10	1	12,5	7,08			
<b>A4D0W0</b>	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) OS=Homo	11	1	10,4	4,48			

	sapiens GN=LSM8 PE=2 SV=1							
<b>Q16186</b>	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 OS=Homo sapiens GN=ADRM1 PE=1 SV=2	4	1	42,1	5,07			
<b>O00231</b>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens GN=PSMD11 PE=1 SV=3	3	1	47,4	6,48			
<b>Q14028</b>	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1 OS=Homo sapiens GN=CNGB1 PE=1 SV=2	3	1	139,6	4,81			
<b>O43681</b>	ATPase ASNA1 OS=Homo sapiens GN=ASNA1 PE=1 SV=2	10	1	38,8	4,91			
<b>A8K548</b>	cDNA FLJ75008, highly similar to Homo sapiens	3	1	119,6	4,34			

	proline-, glutamic acid-, leucine-rich protein 1 (PELP1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1							
<b>B4DLJ3</b>	cDNA FLJ51495, highly similar to ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4	1	25,4	7,66			
<b>Q9NWH9</b>	SAFB-like transcription modulator OS=Homo sapiens GN=SLTM PE=1 SV=2	2	1	117,1	7,87			
<b>Q9NWW7</b>	Uncharacterized protein C2orf42 OS=Homo sapiens GN=C2orf42 PE=2 SV=1	3	1	64	8,92			
<b>Q02978</b>	Mitochondrial 2- oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens GN=SLC25A11 PE=1 SV=3	5	1	34	9,91			



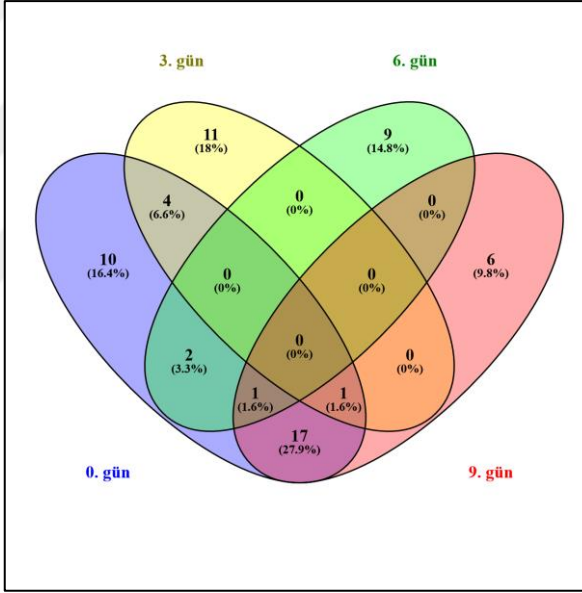
<b>H7C1J8</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=1 SV=1	63	1	11,3	9,7			
<b>Q8N1G4</b>	Leucine-rich repeat-containing protein 47 OS=Homo sapiens GN=LRRC47 PE=1 SV=1	3	1	63,4	8,28			
<b>Q9NP79</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog OS=Homo sapiens GN=VTA1 PE=1 SV=1	5	1	33,9	6,29			
<b>A0A024R127</b>	Adhesion molecule with Ig-like domain 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=AMIGO2 PE=4 SV=1	2	1	57,9	8,4			

<b>I6TRR8</b>	SND1-BRAF fusion OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	109,1	9,29			
<b>Q96P70</b>	Importin-9 OS=Homo sapiens GN=IPO9 PE=1 SV=3	2	1	115,9	4,81			
<b>K7EM18</b>	Eukaryotic translation initiation factor 1 OS=Homo sapiens GN=EIF1 PE=1 SV=1	15	1	13,6	7,9			
<b>A0A024R8Z4</b>	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide- forming] OS=Homo sapiens GN=FMO3 PE=3 SV=1	4	1	60	7,78			
<b>P40429</b>	60S ribosomal protein L13a OS=Homo sapiens GN=RPL13A PE=1 SV=2	6	1	23,6	10,93			

<b>P27708</b>	CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3	1	1	242,8	6,46			
<b>B1AKK2</b>	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=DDAH1 PE=2 SV=1	4	1	31,1	5,81			
<b>P40425</b>	Pre-B-cell leukemia transcription factor 2 OS=Homo sapiens GN=PBX2 PE=1 SV=2	6	1	45,9	7,56			
<b>P08559</b>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 PE=1 SV=3	3	1	43,3	8,06			
<b>Q96C90</b>	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	18	1	15,9	4,86			

	OS=Homo sapiens GN=PPP1R14B PE=1 SV=3							
<b>V9HW04</b>	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Homo sapiens GN=HEL-S-80p PE=2 SV=1	4	1	37,2	6,19			
<b>P14868</b>	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=DARS PE=1 SV=2	2	1	57,1	6,55			
<b>Q7KZ85</b>	Transcription elongation factor SPT6 OS=Homo sapiens GN=SUPT6H PE=1 SV=2	1	1	198,9	4,91			
<b>B2R7C5</b>	DNA helicase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	2	1	91	5,77			
<b>P07741</b>	Adenine phosphoribosyltransferase	7	1	19,6	6,02			

	OS=Homo sapiens GN=APRT PE=1 SV=2								
--	--------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--



Ara zaman noktalarına göre nLC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin PANTHER yolak analizi sonucunda elde edilen venn şeması.

<b>YALNIZCA 0. GÜN</b> <b>PANTHER yolak analizi</b>	<b>YALNIZCA 3. GÜN</b> <b>PANTHER yolak analizi</b>	<b>YALNIZCA 6. GÜN</b> <b>PANTHER yolak analizi</b>	<b>YALNIZCA 9. GÜN</b> <b>PANTHER yolak analizi</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• P02723 (Adenine and hypoxanthine salvage pathway)</li> <li>• P04386 (Histamine H2 receptor mediated signaling pathway)</li> <li>• P04385 (Histamine H1 receptor mediated signaling pathway)</li> <li>• P05913 (Enkephalin release)</li> <li>• P02768 (Proline biosynthesis)</li> <li>• P06959 (CCKR signaling map)</li> <li>• P00028 (Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P00008 (Axon guidance mediated by Slit/Robo)</li> <li>• P00007 (Axon guidance mediated by semaphorins)</li> <li>• P00006 (Apoptosis signaling pathway)</li> <li>• P00034 (Integrin signalling pathway)</li> <li>• P00005 (Angiogenesis)</li> <li>• P00031 (Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway )</li> <li>• P00021 (FGF signaling pathway)</li> <li>• P00018 (EGF receptor signaling pathway)</li> <li>• P04393 (Ras Pathway)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P02772 (Pyruvate metabolism)</li> <li>• P00013 (Cell cycle)</li> <li>• P02739 (De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis)</li> <li>• P02738 (De novo purine biosynthesis)</li> <li>• P00010 (B cell activation)</li> <li>• P00053 (T cell activation)</li> <li>• P00024 (Glycolysis)</li> <li>• P02777 (Succinate to proprionate conversion)</li> <li>• P02721 (ATP synthesis)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P00037 (Ionotropic glutamate receptor pathway)</li> <li>• P00002 (Alpha adrenergic receptor signaling pathway)</li> <li>• P00001 (Adrenaline and noradrenaline biosynthesis)</li> <li>• P00029 (Huntington disease)</li> <li>• P04375 (5HT3 type receptor mediated signaling pathway)</li> <li>• P05734 (Synaptic vesicle trafficking)</li> </ul>

<p>segment phototransduction)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• P00026 (Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway)</li> <li>• P05731 (GABA-B receptor II signaling)</li> <li>• P05730 (Endogenous cannabinoid signaling)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P00016 (Cytoskeletal regulation by Rho GTPase)</li> <li>• P06587 (Nicotine pharmacodynamics pathway)</li> </ul>		
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--



**0. GÜN & 3. GÜN  
Kesişimlerinin  
PANTHER yolak  
analizi**

**0.GÜN & 6. GÜN  
Kesişimlerinin  
PANTHER yolak  
analizi**


**0. GÜN & 9. GÜN  
Kesişimlerinin  
PANTHER yolak analizi**


**0. GÜN & 6. GÜN & 9.  
GÜN Kesişimlerinin  
PANTHER yolak analizi**

**0. GÜN & 3. GÜN & 9.  
GÜN Kesişimlerinin  
PANTHER yolak analizi**

<ul style="list-style-type: none"><li>• P05911 (Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin)</li><li>• P00049 (Parkinson disease)</li><li>• P00048 (PI3 kinase pathway)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• P00060 (Ubiquitin proteasome pathway)</li><li>• P00057 (Wnt signaling pathway)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• P00039 (Metabotropic glutamate receptor group III pathway)</li><li>• P05917 (Opioid proopiomelanocortin pathway)</li><li>• P05916 (Opioid prodynorphin pathway)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• P06664 (Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• P05912 (Dopamine receptor mediated signaling pathway)</li></ul>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------

<ul style="list-style-type: none"> <li>• P00027 (Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• P05915 (Opioid proenkephalin pathway)</li> <li>• P04380 (Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway)</li> <li>• P04394 (Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway)</li> <li>• P00044 (Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway)</li> </ul>		
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

- 
- |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |  |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
|  |  | <ul style="list-style-type: none"><li>• P04391 (Oxytocin receptor mediated signaling pathway)</li><li>• P00043 (Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway)</li><li>• P00042 (Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway)</li><li>• P00040 (Metabotropic glutamate receptor group II pathway)</li><li>• P04379 (Beta3 adrenergic receptor signaling pathway)</li></ul> |  |  |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|

- 
- |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |  |
|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
|  |  | <ul style="list-style-type: none"><li>• P04378 (Beta2 adrenergic receptor signaling pathway)</li><li>• P04377 (Beta1 adrenergic receptor signaling pathway)</li><li>• P04376 (5HT4 type receptor mediated signaling pathway)</li><li>• P04374 (5HT2 type receptor mediated signaling pathway)</li><li>• P04373 (5HT1 type receptor mediated signaling pathway)</li></ul> |  |  |
|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|