



TC.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİYELİN İNTERAKTOMU: İKİLİ GRAF TABANLI PROTEİN-  
PROTEİN ETKİLEŞİMLİ AĞLARLA MULTİPL SKLEROZ'DA  
HÜCRE-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİNİN TANIMLANMASI**

EŞREF ÇELİK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL – 2018



TC.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİYELİN İNTERAKTOMU: İKİLİ GRAF TABANLI PROTEİN-  
PROTEİN ETKİLEŞİMLİ AĞLARLA MULTİPL SKLEROZ'DA  
HÜCRE-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİNİN TANIMLANMASI**

EŞREF ÇELİK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL – 2018

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji  
Tez Sahibi : Eşref ÇELİK  
Tez Başlığı : Miyelin İnteraktomu: İkili Graf Tabanlı Protein-Protein Etkileşimli Ağlarla Multipl Skleroz'da Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Tanımlanması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversite Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 10.12.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Doç.Dr.Bilal Ersen KERMAN

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza



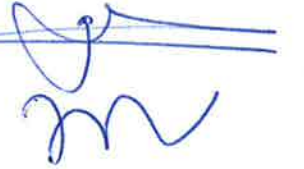
### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Serçin  
KARAHÜSEYİNOĞLU

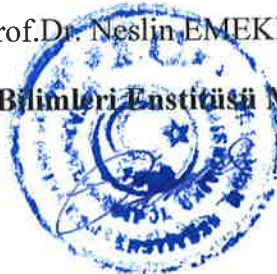
Koç Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun **17./12./2018** tarih ve **2018/...47... - 05** sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Eşref ÇELİK

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin bilimsel araştırmalara sağladığı olanak ve desteklerle yapılmıştır. Sağladığı standartların üstündeki imkanlar için REMER Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, desteklerinden ötürü Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a,

Öncelikle çalışmamın her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca yol göstericiliği, öğreticiliği, sabrı ve her anlamda tükenmeyen desteği ile her zaman yanımda olan teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğum danışman hocam Doç. Dr. Bilal Ersen Kerman'a,

Sınırsız desteklerini gördüğüm hayatıma renk katan ekip arkadaşlarım; Burcu Kurt Vatandaşlar, Fatmagül İlayda Aydınlı, Tuba Oğuz, Emre Vatandaşlar ve Zeynep Aladağ'a,

Tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım Histoloji ve Embriyoloji bölüm hocalarımdan başta Doc. Dr. İlknur Keskin olmak üzere tüm hocalarıma,

Proteomiks analizinde bilgi ve deneyimleriyle ön sonuçlara ulaşmamızda katkısı bulunan Yrd. Doç. Dr. Emre Karakoç'a ve öğrencisi Meltem Eda Ömür'e,

Dostlukları ve destekleriyle her zaman yanımda olan Histoloji ve Embriyoloji doktora ve yüksek lisans bölümündeki arkadaşlarım başta olmak üzere tüm REMER ailesine,

Hayatım boyunca her türlü desteklerini gördüğüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ.....	vii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Miyelin Yapısı.....	6
4.2. Miyelinizasyonun Düzenlenmesi.....	7
4.3. Oligodendrositlerin Yapısı ve Gelişimi.....	8
4.4. Multipl Skleroz.....	8
4.4.1. Multipl Skleroz'da Epidemiyoloji.....	10
4.4.2. Multipl Skleroz'da Etiyoloji.....	11
4.4.3. Multipl Skleroz'da Patogenez.....	13
4.4.4. Hastalığın Seyri.....	16
4.4.5. Hastalığın Tanı Yöntemleri.....	18
5. MATERYAL ve METOD.....	20
5.1. Malzeme Listesi.....	20
5.2. Veri Toplama ve Analizi.....	21
5.3. Kültür Öncesi Hazırlıklar.....	23
5.4. Oligodendrosit Hücre Kültürü.....	24
5.4.1. Oligogenik Nöral Öncül Hücrelerin (O-NÖH) Eldesi.....	24

5.4.2. NÖH'lerin Oligodendrositlere Farklılaştırılması .....	24
5.5. Makrofaj Hücre Kültürü.....	25
5.6. İmmünotokimya Boyaması .....	26
5.7. Perfüzyon Fiksasyonu .....	27
5.8. Kesit Alma .....	27
5.9. İmmünohistokimya Boyaması .....	27
5.10. Görüntülerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme .....	28
6. BULGULAR.....	29
6.1. Protein-Protein Etkileşim Atlasının –İnteraktomun– Oluşturulması .....	29
6.2. MS ile ilişkili Proteinlerin Tanımlanması .....	31
6.3. EphA7'nin Makrofajlarda İfade Edildiği Gözlendi .....	32
6.4. EfrinA1, A3, A4 ve A5 Proteinleri Oligodendrosit Hücrelerinde Gözlendi .....	37
6.5. EfrinA1, A3, A4 ve A5 Proteinleri Astrosit Hücrelerinde Gözlendi .....	46
6.6. EfrinA1, A3, A4 ve A5 Proteinleri İzole Edilmiş Primer Makrofajlarda Gözlendi .....	49
6.7. EphA7 Fare Beyin Kesitlerindeki Oligodendrositlerde Gözlenmedi .....	51
7. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	52
8. KAYNAKLAR .....	62
9. ETİK KURULU ONAYI .....	67
10. ÖZGEÇMİŞ.....	69

## **TABLO LİSTESİ**

<b>Tablo 5.1.1.:</b> Malzeme Listesi.....	20
<b>Tablo 5.2.1.:</b> Proteom Kaynakları.....	21
<b>Tablo 5.2.2.:</b> MS İfade Kaynakları.....	23
<b>Tablo 5.6.1.:</b> İmmünohisto/sitokimya Birincil Antikor Listesi.....	28
<b>Tablo 5.6.2.:</b> İmmünohisto/sitokimya İkincil Antikor Listesi.....	28
<b>Tablo 6.1.1.:</b> Elde Edilen Membran, ECM ve Salınan Proteinlerin Sayılarının Hücresel Dağılımı.....	31
<b>Tablo 6.1.2.:</b> İnteraksiyona Giren Proteinler Arasından MS Plaklarında Gözlenenlerin Oranı.....	32
<b>Tablo 6.2.1.:</b> İnteraktom Analizinde Öne Çıkan 5 Protein.....	34



## ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 4.2.1.: Miyelin Kılıf Oluşumunun Şematik Gösterimi .....	8
Şekil 4.4.1.: MS’de Gözlenen Başlıca Semptomlar .....	9
Şekil 4.4.1.1.: 1453 Kişinin MS Başlangıç Yaşları .....	11
Şekil 4.4.3.1.: MS Patogenezi.....	15
Şekil 4.4.3.2.: MS’de T-Hücrelerinin, Makrofajların Sitotoksik Etkisi ve Yerel Olarak Üretilen Antikorların Komplement Sistemini Aktive Etmesi ile Ortaya Çıkan Demiyelinizasyon .....	16
Şekil 4.4.4.1.: MS Hastalık Seyri .....	18
Şekil 5.2.1.: İnteraktomun Haritasının Elde Edilmesinde İzlenen İş Akışının Şeması.....	22
Şekil 5.2.2.: Sinyal Yolaklarının Tanımlamanın Sistematiğinin Özeti.....	23
Şekil 5.4.2.1.: Nöral Öncül Hücrelerin Büyütülmesi ve Oligodendrositlere Farklılaşması.....	25
Şekil 6.1.1.: Oligodendrosit-Makrofaj İnteraktomu. Kırmızı Kutu Aradalık Merkezliliği Değeri Yüksek Olan Yani Networkte Merkezi Konumda Bulunan Bir Proteini Göstermektedir.....	32
Şekil 6.2.1.: Oligodendrosit-Makrofaj İnteraktomunun Topolojik Analizi. Aradalık Merkezliliği Değerleri Histogram Olarak Dağıtılmıştır. EphA7 En Yüksek İkinci Değere Sahip Proteindir.....	34
Resim 6.3.1.1.: Makrofaj Hücre Kültüründe Aktive Edilmemiş, 0.1 ve 0.5 mg/mikrolitre LPS ile Aktive Edilmiş Hücrelerde EphA7, F4/80 (Makrofaj) ve DAPI ile Birleştirilmiş Örnek Boyama Görüntüleri.....	37
Şekil 6.3.1.1.: EphA7 Reseptörünün Makrofaj Hücre Kültüründeki İfade Seviyesinin Kantitasyonu.....	37
Resim 6.3.1.2.: Fare Beyin (Hipotalamus) Kesitlerinde EphA7 (A), Cd11b (Makrofaj-Mikroglia) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) Örnek Boyama Görüntüleri.....	38

<b>Resim 6.3.1.3.:</b> Fare Beyin (Hipotalamus) Kesitlerinde EphA7 (A), F4/80 (Makrofaj-Mikroglia) (B) ve Üçünün Birleştirilmiş (C) Örnek Boyama Görüntüleri.....	39
<b>Resim 6.4.1.1.:</b> Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA1 (A), MBP (Saçaklar-Oligodendrosit) (B), GalC (Hücre Gövdesi-Oligodendrosit) (C) ve DAPI ile Birleştirilmiş (D) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	41
<b>Resim 6.4.1.2.:</b> Fare Beyin (Hipotalamus) Kesitlerinde EfrinA1 (A), GalC (Oligodendrosit) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	42
<b>Resim 6.4.2.1.:</b> Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA3 (A), MBP (Saçaklar-Oligodendrosit) (B), GalC (Hücre Gövdesi-Oligodendrosit) (C) ve DAPI ile Birleştirilmiş (D) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	43
<b>Resim 6.4.2.2.:</b> Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EfrinA3 (A), GalC (Oligodendrosit) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	44
<b>Resim 6.4.3.1.:</b> Oligodendrosit hücre kültüründe EfrinA4 (A), MBP/Oligodendrosit (B), GalC/Oligodendrosit (C) ve DAPI ile birleştirilmiş (D) örnek boyama görüntüleri .....	45
<b>Resim 6.4.3.2.:</b> Fare beyin (Korpus Kallosum) kesitlerinde efrinA4 (A), GalC/Oligodendrosit (B) ve DAPI ile birleştirilmiş(C) immunohistokimya örnek boyama görüntüleri.....	46
<b>Resim 6.4.4.1.:</b> Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA5 (A), MBP/Oligodendrosit (B), GalC/Oligodendrosit (C) ve DAPI ile Birleştirilmiş (D) Örnek Boyama Görüntüleri.....	47
<b>Resim 6.4.4.2.:</b> Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde efrinA5 (A), GalC/Oligodendrosit (B) ve DAPI ile birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	48

<b>Resim 6.5.1.:</b> Fare Beyin (Korpus Kallosum-Hipotalamus) Kesitlerinde EfrinA1 ve A3 (A), GFAP (Astrosit) (B) DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	50
<b>Resim 6.5.2.:</b> Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EfrinA4 ve A5 (A), GFAP (Astrosit) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	51
<b>Resim 6.6.1.:</b> Makrofaj Hücre Kültüründe EfrinA1, A3, A4 ve A5, F480 (Makrofaj) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	53
<b>Şekil 6.7.1.:</b> Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EphA7 (A), MBP (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri.....	54
<b>Şekil 7.1.:</b> Epha7 Reseptörünün ve Ligandlarının Gösterimi .....	55
<b>Şekil 7.2.:</b> Epha7 Reseptörünün Etkileşim Kurduğu Ligandları.....	56
<b>Şekil 7.3.:</b> Efrin Reseptör/Ligand Etkileşimindeki Bazı Sinyal Mekanizmaları.....	59

## 1. ÖZET

### MİYELİN İNTERAKTOMU: İKİLİ GRAF TABANLI PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMLİ AĞLARLA MULTİPL SKLEROZ'DA HÜCRE-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİNİN TANIMLANMASI

Miyelin kılıfı, bilginin nöronlar üzerinde verimli transferini sağlar ve nöronların işlevi ve sağ kalımı için elzemdir. Miyelin gelişiminde gözlenen bozuklukların veya miyelin hasarının (demyelinizasyon), elektriksel sinyal iletimini sekteye uğratarak, nöronları atrofiye iterek ve kalıcı fonksiyonel bozukluğa neden olarak multipl skleroz (MS) gibi birçok nörolojik hastalığın kökeninde yattığı bilinmektedir. Bu çalışmada merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyonu anlamak için oligodendrosit ve makrofaj hücreleri arasındaki protein-protein etkileşimlerinin belirleyerek MS'de etkili olan ve ilaçlar tarafından hedeflenebilecek yeni sinyal yollarının tanımlanmasını amaçladık. Bu amaçlara ulaşmak için, büyük veri yöntemlerini kullanarak oligodendrositler ile makrofaj hücreleri arasındaki protein-protein etkileşimlerinin bir atlası oluşturuldu. Benzersiz bir şekilde, metodolojimiz, tek bir hücre tipi içindeki proteinlerden ziyade hücre-hücre interakt eden proteinleri analiz etti. Ayrıca, MS hastalarının ve kontrollerinin gen ifade profilleri, protein etkileşim verileri ile birlikte değerlendirildi. Sonuç olarak, MS ile ilişkili membran ve hücre dışı proteinler tanımlanmıştır. Bu proteinlerden nörogenezde etkili ve reseptör-ligand gibi özel ilişkisi olan tirozin kinaz ailesinden efrin A7 reseptörü (EphA7) seçilerek hücre kültürü ve fare beyin kesitlerinde boyanıp mikroskopta incelendi. İncelemeler sonucunda EphA7'nin makrofaj hücrelerinde in vivo ve in vitro ifade olduğu gözlemlendi. EphA7'nin bilinen ligandlarından olan EfrinA1, A3, A4 ve A5'in oligodendrosit hücrelerinde farelerde in vivo ve in vitro ifade olduğu gözlemlendi. EphA7'nin oligodendrositlerde ekspresyonu gözlemlenmezken, makrofajlarda efrinA1, efrinA3, A4 ve A5'in ifade edildiği gözlemlendi. Ayrıca efrin ligandlarının astrositlerde de ifade edildiği gözlemlendi. Sonuç olarak EphA7'nin makrofajlarda/mikroglialarda ifade edildiği gözlemlendi. EfrinA1, A3, A4 ve A5 ligandlarının oligodendrosit ve astrosit hücrelerinde ifade edildiği gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Bağışıklık Hücreleri, Multipl Skleroz, Oligodendrosit, Proteom

## 2. ABSTRACT

### MYELIN INTERACTOME: IDENTIFICATION OF CELL-CELL INTERACTIONS IN MULTIPLE SCLEROSIS WITH BINARY GRAF BASED PROTEIN-PROTEIN INTERACTION NETWORKS

Myelin sheath facilitates efficient transfer of information over neurons and is essential for the function and survival of neurons. Thus, incorrect development of myelin or myelin damage is at the root of many neurological diseases such as multiple sclerosis (MS). Dysmyelination or demyelination disrupts electrical signal transmission, causing neuronal atrophy and permanent functional damage. In order to investigate demyelination in the central nervous system, we aimed to identify the novel MS-associated signaling pathways by identifying protein-protein interactions between oligodendrocyte and immune cells. To achieve this goal, a map of protein-protein interactions between oligodendrocytes and immune system cells was generated using large data methodologies. Uniquely, our methodology analyzed cell-to-cell interacting proteins rather than proteins within a single cell type. In addition, gene expression profiles of MS patients and controls were evaluated along with the protein interaction data. Consequently, MS-associated membrane and extracellular proteins were identified. Ephrin A7 receptor (EphA7) is a member of the tyrosine kinase family and functions in neurogenesis emerged as the top candidate protein. I examined EphA7's expression in cell culture and mouse brain sections using microscopy. EphA7 was expressed macrophages in vitro and in vivo in mouse. Moreover, Ephrins A1, A3, A4, and A5, which are known ligands of EphA7, were expressed in oligodendrocytes in vitro and in vivo in mouse. EphA7 was not present in oligodendrocytes. Ephrins A1, A3, A4, and A5 were expressed in macrophages and Ephrins A1, A3, A4, and A5 was also expressed in astrocytes. As a result, it was observed that EphA7 was expressed in macrophages/microglia. EfrinA1, A3, A4 and A5 ligands were observed to be expressed in oligodendrocyte and astrocyte cells.

**Key words:** Immune Cells, Multiple Sclerosis, Oligodendrocyte, Proteom

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Merkezi sinir sisteminde (MSS) bir glia hücresi olan oligodendrositlerin plazma membranlarının aksonlar etrafında oluşturdukları özelleşmiş yapıya miyelin denir (1). Miyelin kılıfı, bilginin nöronlar üzerinde verimli transferini sağlar ve nöronların işlevi ve sağ kalımı için gereklidir. Aksonları saran miyelin kılıfı, yalıtkan bir yapı olması nedeniyle sinir iletiminin hızını artırır ve aksonları hem besleyerek hem de onlara destek sağlayarak yaşamalarında önemli görevler üstlenir (2).

Miyelin yapısının nörolojik bir durum karşısında yıkılması/parçalanması durumuna demiyelinizasyon denir. Demiyelinizasyon, multipl sklerozun (MS) da içinde olduğu çeşitli nörolojik hastalıklar esnasında gözlenebilen bir durumdur. Yıkılan miyelinin, oligodendrosit progenitör hücrelerinin olgunlaşması ile yeniden oluşumuna ise remiyelinizasyon adı verilir (3).

MS immün kökenli, enflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı süreci ile karakterize olan; MSS'nin kronik ve ilerleyici bir hastalığıdır (4). Hastalığın nedeni ve kimlerde görüleceği tam olarak bilinmese de genetik yatkınlığın yanında çevresel faktörlerin ve otoimmün mekanizmaların hastalığın etiyojisinde etkili olabileceği kanısı mevcuttur. MS fiziksel, duygusal, sosyal ve bilişsel işlevlerde önemli kısıtlamalara neden olup bireyin yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Hastalığın görülme sıklığı 0.5-1/1000 olup genellikle 18-50 yaşları arasındaki genç erişkinlerde görülür. Kadınlarda erkeklere nazaran daha fazla MS hastalığına rastlanır (4-8).

MS tanısını koymada özel bir yöntem olmayıp, MS'nin belirlenmesinde magnetik rezonans (MR), beyin omurilik sıvısı (BOS) analizi ve nörofizyolojik testlerden yararlanır (9). MS tiplerinin belirlenmesi prognoz ve tedavinin seçiminde önem arz eder. Hastadan hastaya değişiklik gösteren MS tipleri patolojik ve klinik açıdan relapslı remisyon MS (RRMS), sekonder progresif MS (SPMS), primer progresif MS (PPMS) ve progresif relapslı MS (PRMS) olmak üzere 4 tipte görülür (10).

MS kesin tedavisi olmayan hastalıklar arasındadır. Ancak hastalık sürecini, atak sıklığını ve bir ölçüde hastalık seyrini değiştirmek için hormon, immün modülatör ve immün baskılayıcı ilaçlar kullanılır (11).

MS çalışmaları için hastaların MSS'den örnek almak zordur. Bu yüzden MS hastalığını taklit eden otoimmün, viral, mutant ve kimyasal temelli modeller oluşturulur. (12)

MS hastalığının oluşumunda veya hastalığın ilerlemesinin durdurulmasında birçok hücre tipi görev alır. Bu hücreler bağışıklık hücreleri ve glia hücrelerinden olan oligodendrosit ve astrosit gibi hücrelerdir. Hastalığın hem patogenezi hem de tedavi önündeki engellerini daha iyi anlamak adına literatürde farklı yaklaşımlar olduğu görülmüştür. Literatür çalışmalarında MS'nin de içinde olduğu nörodejeneratif hastalıklarla ilgili yukarıda bahsi geçen hücrelerin proteom ve/veya ifade verileri farklı yaklaşım ve her bir hücre için ayrı ayrı elde edilerek hastalığın dinamiğini ve mekanizmasını aydınlatmaya katkıda bulunulmuştur (13-17). Bu çalışmaların ortak yanı her hücre tipini birbirlerinden bağımsız bir şekilde ele alarak ifade ve lokalizasyon farklarından yola çıkmış olmalarıdır. Oysa MS gibi kompleks bir hastalığın mekanizmasını anlamak için proteinlerin yer aldıkları sinyal yollarındaki değişimlerin değerlendirilmesi gerekir. Buna ek olarak MS birden çok hücrenin birbiriyle etkileşimde olduğu bir hastalıktır. Dolayısıyla MS'ye karşı tedavi geliştirirken hücreler arası sinyallerin de göz önünde bulundurulması gerekir. (13-17).

Çalışmamızda kullandığımız proteomik ve biyoinformatik yöntemler ile bu açığı kapatarak MS'de rol alan hücreler arası sinyal yollarını bulmayı planlamamız tezin özgün değerlerinden biridir. Canlı bir organizmada meydana gelebilecek protein etkileşimlerinin tam haritası interaktom olarak adlandırılır (18). Bu yöntem ile elde edilen miyelin interaktomlarında öne çıkan protein-protein etkileşimlerinin miyeline karşı bağışıklık sistemi saldırısında rol alan sinyal yolları olacağı hipoteziyle analizimizi gerçekleştirdik. Literatürde yapılanlardan farklı olarak bizim bu çalışmadaki amacımız, oligodendrosit ve bağışıklık hücrelerinin proteomlarını karşılaştırarak bu hücreler arasındaki protein-protein etkileşimlerini tanımlayıp merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyonun ve remiyelinizasyonun hücresel mekanizmasında etkili olan sinyal yollarını belirlemektir. Bu sayede MS'ye karşı etkili ilaç üretilmesi için hedef proteinlerin belirlenmesini amaçlıyoruz. Amacımıza yönelik geliştirmiş olduğumuz iş akış yöntemi de, başka hastalıkların incelenmesi için de uygulanabileceğinden başlı başına bir özgün değere sahiptir. Önceki

yöntemlerin yanında bizim geliştirdiğimiz iş akışı iki ayrı hücrede bulunan membran proteinleri veya hücre dışı proteinler arasındaki etkileşimlerden yola çıkararak hücre içinde etkili sinyal yolaklarını bulmaya yöneliktir. Bunun sonucu olarak tedavi amacıyla tek bir hücre tipindeki sorunu gidermek yerine sistemin tümündeki dengeyi sağlamaya yönelik sonuçlar üretme değerinde bir yöntemdir.





## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Miyelin Yapısı

Merkezi sinir sisteminde (MSS) bir glia hücresi olan oligodendrositlerin plazma membranlarının aksonlar etrafında oluşturdukları özelleşmiş yapıya miyelin denir. Lipit:Protein oranı yüksek olan bu membran yapısı hem intraselüler hem de plazma membranından farklı olarak daha az sayıda protein ile zenginleştirilmiş bir yapıdadır (1).

Miyelin kılıfı, bilginin nöronlar üzerinde verimli transferini sağlar ve nöronların işlevi ve sağkalımı için gereklidir. Aksonları saran miyelin, yalıtkan bir yapı olması nedeniyle sinir iletiminin hızını artırır ve aksonları hem besleyerek hem de destek sağlayarak yaşamalarında önemli görevler üstlenir (2).

Miyelin esas olarak, MSS'nin ak maddesinde ve geniş motor aksonları içeren periferik sinirlerde bulunan, %70'i lipid, %30'u proteinden oluşan bir membrandır. Miyelin kılıfını oluşturan lipitlerin bileşiminde kolesterol %25, galaktoserebrozidinin de major olarak içinde bulunduğu galaktolipidler %29 ve fosfolipitler %46 oranında bulunur. Miyelin kılıfı iç içe geçmiş sıkı tabakalar şeklinde olup, aksonu düzenli bir şekilde yerleşmiş ranvier boğumlarından dolayı segmentler şeklinde sarar. Miyelin kılıfı ranvier boğumlarında bulunan sodyum kanalları sayesinde aksiyon potansiyelinin iletiminde rol oynar (19).

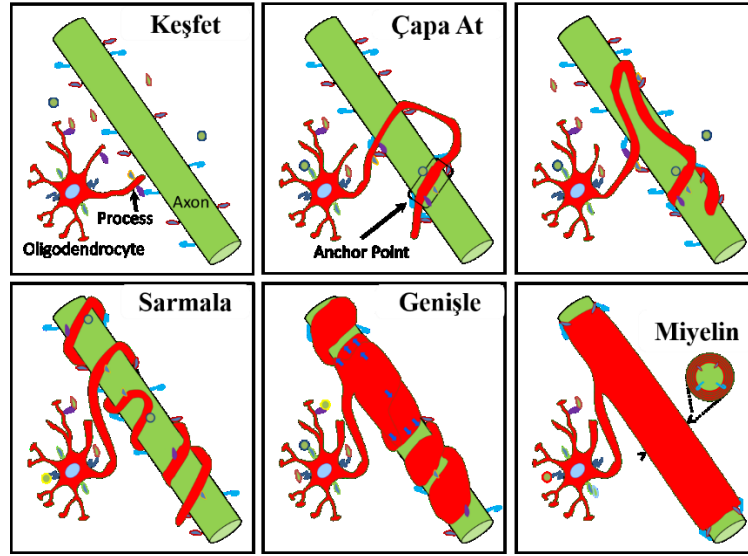
Miyelin proteinlerinin bazıları hem MSS hem de periferik sinir sisteminde (PSS) bulunurken, kompakt miyelin proteinleri olan proteolipit protein (PLP), oligodendrosit-spesifik protein (OSP), miyelin-oligodendrosit glikoprotein (MOG), miyelin-asosiyel oligodendrosit temel protein (MOBP) ve miyelin temel protein (MBP) gibi proteinler MSS'ye spesifik proteinlerdir. PSS'de ise miyelin protein sıfır (P0), periferik miyelin protein 22 (PMP-22) ve MBP gibi proteinler yer alır ve PSS'nin kompakt olmayan yapıda PLP, (PMP-22), OSP ve connexin-32 (Cx-32) gibi miyelin proteinleri yer bulunur (20).

## 4.2. Miyelinizasyonun Düzenlenmesi

Miyelinizasyon, sinir sisteminin gelişim döneminde sinir hücresi aksonunun çevresinde oligodendrositler tarafından miyelin kılıfın oluşmasıdır. Oligodendrositlerin gelişim basamakları ve miyelinizasyonun oluşumu tanımlanmasına rağmen, bu gelişim basamaklarının transkripsiyonel olarak organizasyonu tam bir açıklığa kavuşamamıştır. Ama erken gelişim evrelerinde etkili olan ve matür oligodendrositlerde ifade edilen oligodendroglial-spesifik transkripsiyon faktörleri Olig-1 ve Olig-2, hem MSS hem de PSS'de çeşitli hücreler tarafından ifade edilen Sox10 ve myelin-transcription factor-1 (MyT-1), transkripsiyon spesifik faktör 1 (Sp-1), nükleer faktör-1, siklik adenozin monofosfattan sorumlu bağlayıcı protein ve c-jun gibi bilinen bazı transkripsiyonel faktörleri mevcuttur (20).

Miyelin yapımından sorumlu olan oligodendrosit hücreleri astrositler, nöronlar ve aksonlarla etkileşim halinde olup bu etkileşimlerle nöronlar, oligodendrositleri proliferasyon, yaşama ve fonksiyon devamlılığı konusunda etkilerken oligodendrositler de nöronları etkileyebilen bir ağ oluşturmaktadırlar. Oligodendrositin miyelinleyeceği aksonu seçmesi, aksona çapa atması, sarması ve oligodendrosit membranının genişleyerek miyelin kılıfı oluşturması miyelinizasyon sürecinde izlenen adımlardır (Şekil 4.2.1.) (21).

MSS'de in vitro koşullarda oligodendrositlerde miyelin gen ifadeleri artabilir ancak miyelin yapısının oluşabilmesi ve bu ifadelerin yüksek seviyelere ulaşabilmesi için aksonal etkileşimin olması elzemdir. PSS'de ise Schwann hücrelerinin miyelin oluşumuna katılabilmesi için gelişimi, farklılaşması ve miyelin üretimi akson varlığına zorunludur (20).



Şekil 4.2.1.: Miyelin Kılıf Oluşumunun Şematik Gösterimi (22).

### 4.3. Oligodendrositlerin Yapısı ve Gelişimi

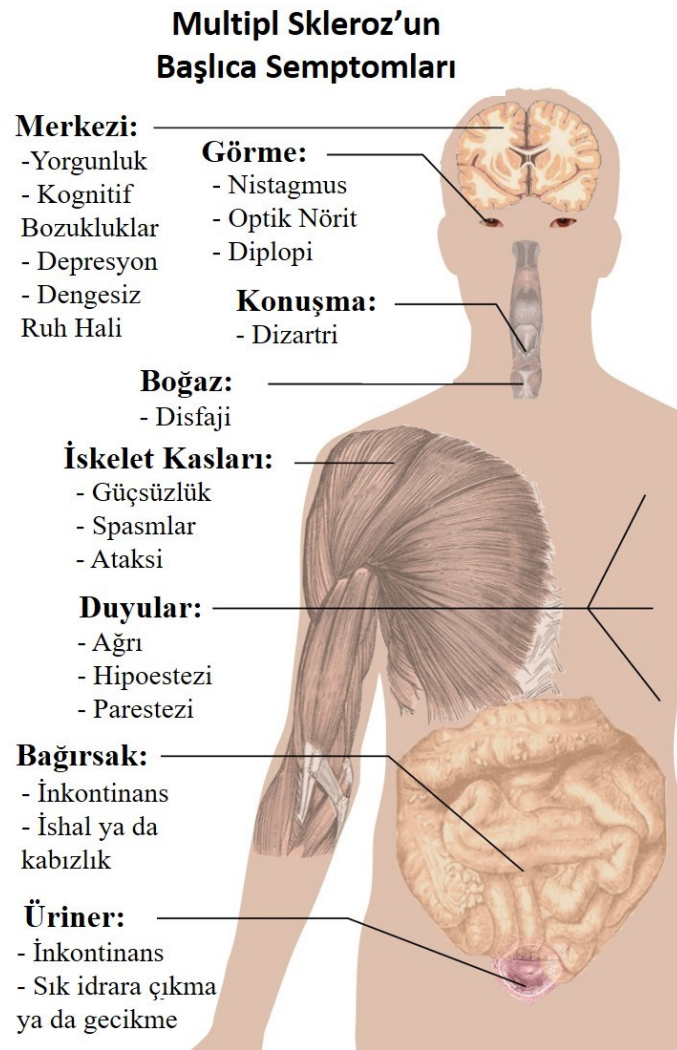
Embriyonik dönemde tüm makroglia (oligodendrosit ve astrositler) ve nöronların öncül hücrelerinin nişi ventriküler tabaka iken erişkinlerde glial öncül hücrelerin kaynağı subventriküler zondur. Gelişim esnasında subventriküler zondan köken alan ve progenitör hücre özelliği olan nöral kök hücreler (NSC) nöron, oligodendrosit ve astrosite farklılaşabilirler. Matür bir MSS'de oligodendrositler farklılaşmış olarak buldukları için, yeni oligodendrositler nöral kök hücrelerden ve öncül oligodendrositlerden köken alırlar (23).

### 4.4. Multipl Skleroz

Multipl skleroz immün kökenli, inflamasyon, demiyelinizasyon ve akson hasarı süreci ile karakterize olan MSS'deki kronik ve ilerleyici bir hastalıktır (4). Hastalığın nedeni ve kimlerde görüleceği tam olarak bilinmese de genetik yatkınlığın temelinde çevresel faktörlerin ve otoimmün mekanizmaların da etkisinin olabileceği düşünülür.

MS fiziksel, duygusal, sosyal ve bilişsel işlevlerde önemli kısıtlamalara neden olup bireyin yaşam kalitesini olumsuz etkiler (Şekil 4.4.1.). Hastalığın görülme sıklığı 0,5-1/1000 olup genellikle 18-50 yaşları arasındaki genç erişkinlerde görülür. Kadınlarda erkeklere nazaran daha sık MS'ye rastlanır. (4, 8, 24-26). MS, "Sclerose en plaques" olarak isimlendirilip 1868 yılında ilk kez Fransız Nörolog Jean Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır (27).

MS'li hastalarda genellikle öngörülemez aralıklarla tekrarlayan ataklar ortaya çıkar. Hastalık MS'li hastaların bir bölümünde ataklarla seyrederken diğer bir bölümünde ise başlangıçta veya sonradan ilerleyici olarak seyreder. Bu inflamatuvar ataklar, hem oligodendrositlere hem de miyelin kılıfına zarar verirken aynı zamanda sinir hücrelerine ve sinir hücresi oluşum süreçlerine de zarar verir (9, 28-34).



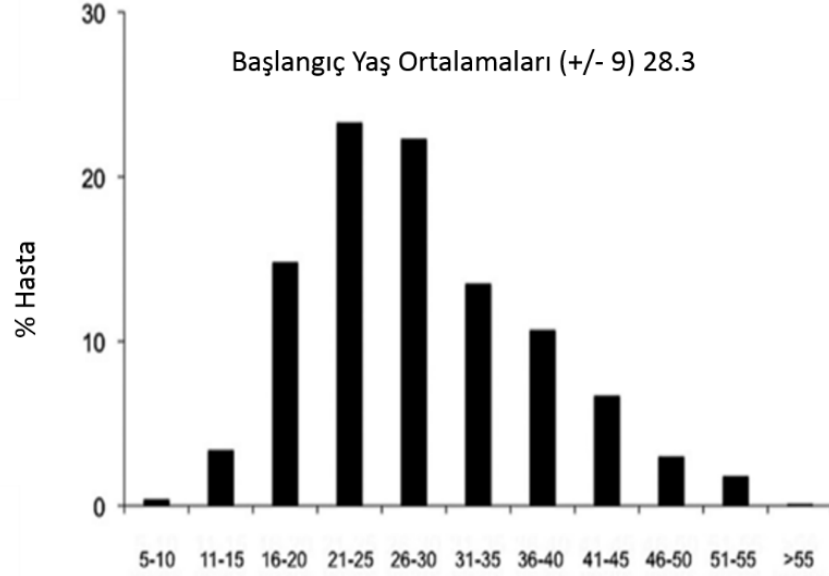
Şekil 4.4.1.: MS'de Gözlenen Başlıca Semptomlar (35)

#### 4.4.1. Multipl Skleroz'da Epidemiyoloji

Travmaya bağlı olmadan nörolojik kayıplara sebebiyet veren hastalıklar arasında ilk sırada yer alan MS, dünyada yaklaşık 2–2.5 milyon insanı etkilemektedir (36). Coğrafi ve ırksal farklılıklar MS'nin insidansını ve prevelansını değiştirmektedir. Prevelansın yüksek olduğu yerden düşük olduğu yerlere göç edenlerin yaşı 15'in altında iken prevelans göç edilen ülkeye uymakta ancak göç edenlerin yaşı 15'in üstünde ise prevelans terk edilen ülkeye göre şekillenmektedir. Bu durum puberte öncesinde MS üzerinde çevresel etkenlerin etkili olduğunu göstermektedir (37).

Hastaların %90'dan fazlası beyaz ırka mensuptur. MS için en riskli bölgeler olan Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ülkeleri ve Kanada'da hastalığın prevelansı %0,1–0,2 insidansı ise 5-6/100 000 olarak görölmektedir. Kuzeyden güneye gidildikçe hastalığın insidansında ve prevelansında bir düşüş görölmektedir (4).

Coğrafi ve ırksal farklılıklar gibi cinsiyet ve yaş farklılığı da hastalığın görölmesinde farklılık göstermektedir. Erkeklerle nazaran kadınlarda 2-3 kat daha fazla görölür. Hastalığın ilk belirtileri 15-59 yaşları arasında görölse de 20-40 yaşları arasında insidansı daha yüksektir (Şekil 4.4.1.1.). Çocuklarda nadir görölüp kırklı yaşlardan sonra az rastlanmaktadır. Geç tanı aldığı veya geç başlangıçlı olduğu düşünölen altmış yaş sonrası MS hastalarına da rastlanılmaktadır. Ancak MS, özellikle genç erişkinlerde görölen bir hastalık olarak literatürde yer almıştır (4, 8, 38, 39).



Şekil 4.4.1.1.: 1453 Kişinin MS Başlangıç Yaşları (40).

#### 4.4.2. Multipl Skleroz'da Etiyoloji

MS'nin nedeni her ne kadar bir sır olsa da, temelinde patolojik otoimmünitenin önemli rol aldığı düşünülür. Otoimmüniteyi genetik faktörlerin, çevresel faktörlerin ve infeksiyonların etkilediği heterojen, kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (41).

**Genetik Faktörler:** Yaygın kanı, MS'in genetik kalıtsal bir hastalık olmadığı yönündedir; ancak ikizlerde ve yakın akrabalarda yapılan çalışmalar MS'in kalıtsal olabileceğini göstermiştir. Her iki ebeveyni de MS hastalığı geçirmiş çocuklarda MS görülme riski %25 iken, tek ebeveyni etkilenen çocuklarda görülme durumunun %15 olduğu gösterilmiştir. Ailevi olgulardaki MS görülme durumunun %3-23 arasında değiştiği görülmüştür (42, 43). MS'li hastaların yaklaşık %20'sinin en az bir akrabasında da MS olduğu gözlenmiştir. Risk birinci derece akrabalar arasında daha yüksek iken uzak akrabalar arasında daha düşüktür. Kardeşlerde MS'nin ortaya çıkma olasılığı toplumdaki diğer potansiyellerden 30-50 kat daha yüksektir. Genetik risk için yapılan monozigot ikizlerdeki çalışmalara göre MS'nin ortaya çıkmasında %25-35 arasında etkisi olduğu öngörülmektedir (36, 44, 45). Yapılmış çalışmalara göre MS ile yakından ilişkili 50'ye yakın genin olduğu düşünülmektedir (46, 47).

GWAS taramalarından sonra büyük doku uyumu antijenler (MHC) lokusu dışında Avrupa popülasyonunda 110 tane MS riski taşıyan varyant keşfedilmiştir (43).

**Çevresel Faktörler:** Genetik açıdan hastalığa yatkın kişilerde MS'yi tetiklediği düşünülen nedenlerden biri çevresel etkenlerdir. Coğrafi konum, yetersiz güneş ışığına maruz kalma, D vitamini yetersizliği, sigara içme, beslenme şekli, stres ve kimyasal maddelere maruz kalma MS oluşma riskini artıran çevresel etkenler arasında görülmektedir. Bunun dışında 15 yaşından önce geçirilen enfeksiyonların da hastalığı tetiklediği düşünülmektedir (46, 48, 49).

Çocukluk döneminde veya 15 yaşından önce geçirilen enfeksiyonların patolojik otoimmüniteyi tetiklediği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada MS hastasının beyinde disregüle halde Epstein-Barr virüs (EBV) enfeksiyonu olduğuna dair kanıtlar görülmüştür (50). MS ile ilişkili olduğu düşünülen başlıca virüs çeşitleri EBV, insan herpes virüsü 6 (HHV-6) ve kızamık virüsü olarak kabul edilmektedir. Enfeksiyonu sonrasında MS riskini artıran EBV tüm dünyada yaygın olarak bulunan kalıcı bir enfeksiyona yol açar. Tüm çocukları 2 yaşına kadar enfekte edebilen HHV-6 ajanı MS plaklarında gözlenmiştir. Ayrıca MS plaklarının yakınlarındaki oligodendrositlerde de HHV-6'nın bulunması MSS'de devam eden bir enfeksiyon işareti olduğunu düşündürmektedir (51).

Yapılan bir çalışmaya göre ultraviyole ışınının T hücre aracılı bağışıklık yanıtını azalttığı gösterilmiştir (41). Serumda bulunan 25-hidroksivitamin D seviyesinin ultraviyole B'ye maruz kalması orantılı bir korelasyon göstermektedir. Bu ekvatordan uzaklaştıkça ultraviyole ışına maruziyetin azalmasından dolayı MS riskinin artırdığına dair çalışmaları desteklemektedir (52). Bu durum gen-çevre etkileşimi için güzel bir örnek sunmaktadır.

MS ile vitamin D ilişkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (53, 54). Serum 25-hidroksivitamin D düzeylerindeki artış ile MS'de klinik aktivite düşüşüne yol açan çalışmalara imza atılmıştır (55, 56). MS riskine karşı koruyucu etkisi olan vitamin D'nin alımının sadece güneş ışığıyla olduğunu söylemek zordur. Bu yüzden bu koruyucu etkiyi D vitamini açısından zengin deniz ürünleriyle ve diyetle alınan magnezyum ve kalsiyum ile destekleyerek sağlandığı düşünülmektedir (57, 58).

#### 4.4.3. Multipl Skleroz'da Patogenez

Ataklar (relaps) ve iyileşmelerle (remisyonlar) seyreden MS'de beyin ya da spinal kord başta olmak üzere MSS'nin her alanında ak maddede çok sayıda plaklar/lezyonlar görülebilir. Lezyonların histopatolojisinde fokal inflamasyon, demiyelinizasyon, oligodendrosit kaybı, remiyelinizasyon ve astrogliozis görülmektedir. Bu plakların geliştiği beyin ve spinal kord alanlarındaki miyelin bölümlerinde skar oluşumu söz konusudur. MS'de demiyelinizasyon durumunda miyelin yıkımı görülmektedir ama hastalığın erken evrelerinde bu hasar geri dönüşümsüz değildir ve iyileşmeler görülebilmektedir. MS ataklarının hedefi miyelin kılıfı ve onu üreten/devamlılığını sağlayan oligodendrositler iken öncelikli hedefin miyelin mi yoksa oligodendrositler mi olduğu bilinmemektedir (59).

MS'yi başlatan sebep/sebepler bilinmese de patogenezinde aksonal hasar ve inflamatuvar demiyelinizasyonu gösteren ve hastalığın otoimmün aracılı olduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur. MS'de miyelin kılıfı hasarı ile sinir iletilerinin bozulmasının arkasında, T lenfositlerinin miyeline karşı reaksiyon göstererek mikroglialar ile makrofajları aktive ettiği düşüncesi en güçlü hipotezdir. MS'ye genetik olarak yatkın bir bireyin prepubertal dönemde spesifik/nonspesifik bir ajanla karşılaşması ile oluşan immün aktivasyonu sonrasında yeni bir enfeksiyonun otoimmün durumu tetiklemesi ve MSS'ye ilişkin otoimmün hastalığın ortaya çıkmasına neden olduğu MS ile ilgili hipotezler arasındadır. Başka bir görüş ise, MSS'de ara sıra oluşan alevlenmelerle yeni demiyelinizasyonlara yol açan kalıcı bir viral enfeksiyon veya T hücre aktivitesinin olduğudur. Bilinen tek gerçek miyelin proteinleri olan MBP, MOG, MAG ve PLP'nin immün atağın hedefi olduğudur (60, 61).

Bilinen bu tek gerçeğin primer bir reaksiyon mu olduğu yoksa hastalık sırasında mı meydana geldiği bilinmemektedir. Otoreaktif T hücrelerinin MSS'ye migrasyonlarını ve sonraki aktivasyonlarını hangi faktör veya faktörlerin tetiklediği açık olmayıp, otoimmün olayların yardımcı T hücrelerini aktive edici ve gama interferonun salınımına yol açan bir enfeksiyon ile başladığı düşünülmektedir. Kan beyin bariyerini (KBB) geçen yardımcı T hücreleri MSS'ye girdikten sonra makrofaj ve astrositlerin üzerindeki büyük doku uyumu antijenleri (MHC class II) tarafından



sunulan antijene karşı T hücre yanıtı oluşturmaktadırlar (Şekil 4.4.3.1.). Antijen- T hücre reseptör etkileşiminde yardımcı T hücrelerin uyarılması ve çoğalması, B hücrelerinin ve makrofajların aktivasyonu, bazı sitokinlerin (gama interferon, doku nekroz faktörü, interlökinler ve proteazlar gibi) salınımı gibi olaylar görülmektedir. İnflamatuvar cevap sırasında aktif makrofajlar veya mikroglial hücreler gibi immün mekanizmalar, TNF- $\alpha$  veya IFN- $\gamma$  gibi sitokinler salgılayarak oligodendrositleri hasara uğratabildiği bilinmektedir (62, 63).

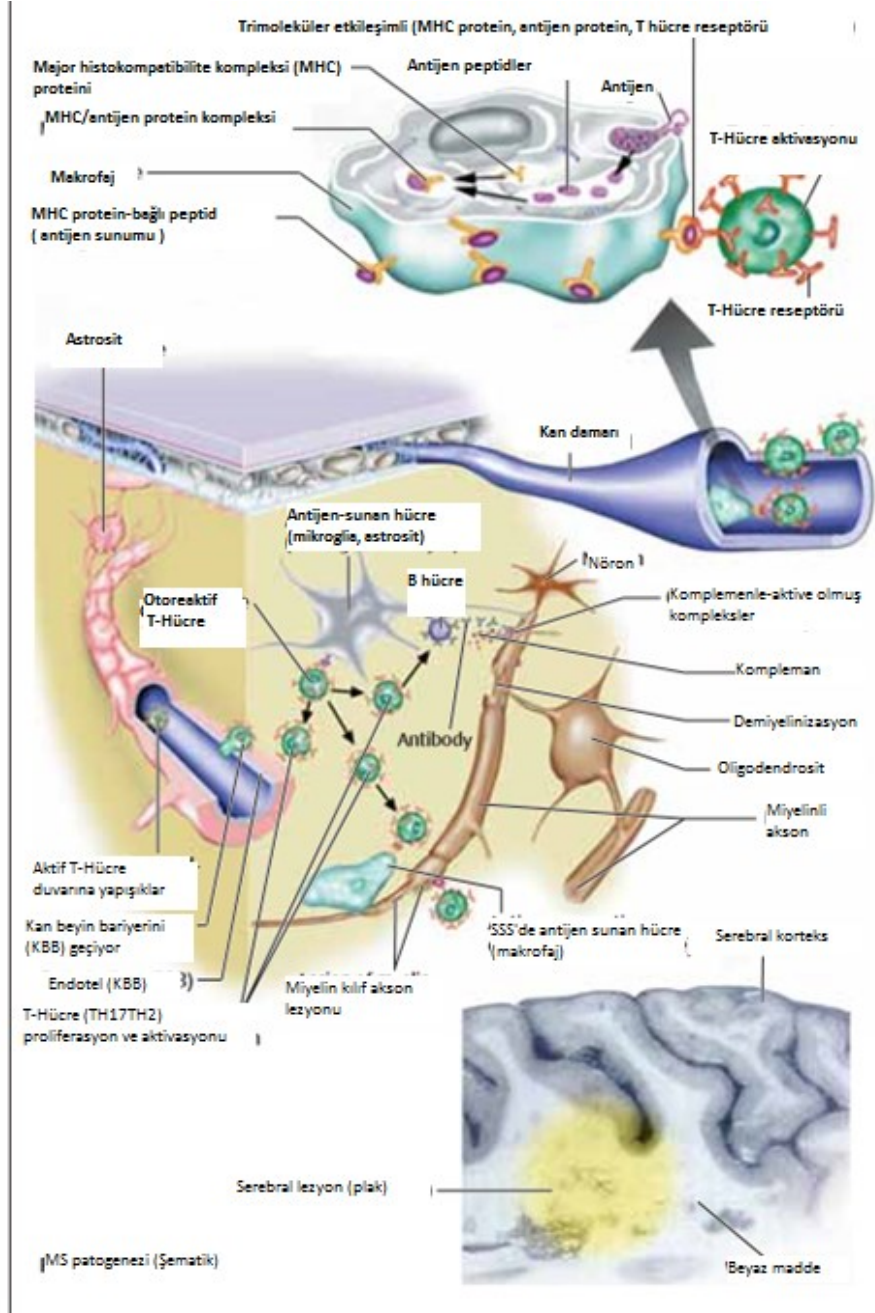
Aktif demiyelinizasyon olan MS'li bir bireyin lezyonlarındaki inflamatuvar infiltrattan izole edilen hücrelerin neredeyse % 10'unu T-hücreleri oluştururken geri kalanın ise monosit ve mikroglial köken alan makrofajlardan oluştuğunu gözlemlemiştir (64).

MS'de görülen bu hücre grubu oligodendrositleri ve aksonları hasara uğratabilecek oksijen radikalleri, nitrik oksit, proteazlar, sitokinler ve inflamasyonun diğer faktörlerini salgılayabilirler (Şekil 4.4.3.2.). Sitokinlerin lokal inflamasyonu uyurarak KBB'nin daha fazla bozulmasına yol açması ve miyelin kılıfta hasar meydana gelmesi, sinir iletilerinin bozulması/engellenmesine yol açarak MS semptomlarının görülmesine zemin sağlamaktadır (65, 66).

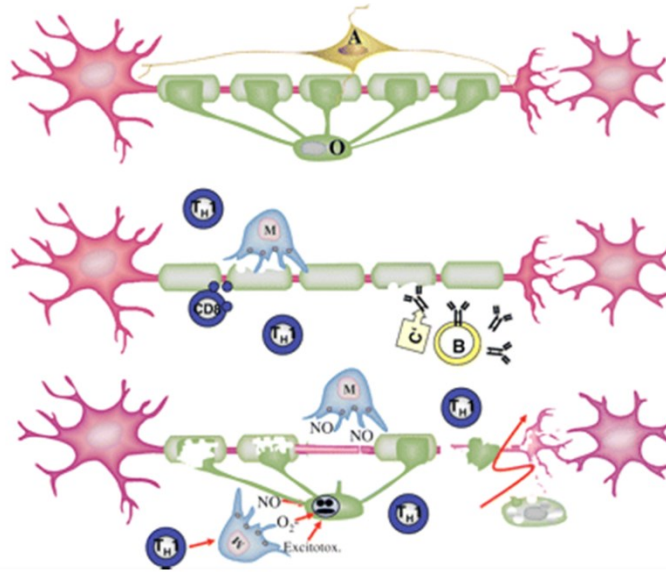
MS'de demiyelinizasyon dışında, inflamasyon veya inflamatuvar mediatörlerin sinir iletiminin bloklanmasına ve nörolojik defisite yol açarak işlev kaybına neden olduğu bilinmektedir. İnflamasyonun KBB'yi bozarak aksonların intravasküler bazı faktörlerle etkileşimi sonucunda sinir iletimini bozabileceği düşünülmektedir. KBB değişikliğine ait bulguların bazılarında endotelial hücreleri ile ilişkili astrositlere ait perisitlerle de ilişkili olduğu düşünülmektedir. KBB'nin hasarlanması MS'de erken ve kalıcı bir olay olsa da bu durumun doku hasarının öncesinde mi geliştiği, yoksa doku hasarı sonucu mu oluştuğu tartışmalıdır. MS'de immün sistem bazında birçok değişiklik görülmektedir. Ancak bu değişikliklerin hangilerinin patogeneze rolü olduğu ve hangilerinin hastalığın sonucu olarak meydana geldiği açıklığa kavuşmamıştır (67).

Demiyelinizasyon ardından gelişen remiyelinizasyon (iyileşme) safhası hastadan hastaya değişiklik göstermektedir. Bu dönemde miyelin kılıfı oluşturan ve devamlılığını sağlayan oligodendrositlerin hasar gören aksonları onardığı,

inflamasyonun gerilediği, sinaptik değişikliklerle iletinin tekrar sağlandığı ve semptomların kısmen veya tamamen kaybolduğu belirtilmektedir. Ancak hastalık ilerlediğinde miyelin kılıf tamamen zarar görüp yerini plaklar ve glial skar dokusu almaktadır. Bu durum MS’de geri dönüşümsüz fonksiyon kaybıyla sonuçlanmaktadır (68).



şekil 4.4.3.1.: MS Patogenezi (69).



**Şekil 4.4.3.2.:** MS’de T-hücrelerinin, Makrofajların Sitotoksik Etkisi ve Yerel Olarak Üretilen Antikorların Komplemant Sistemini Aktive Etmesi İle Ortaya Çıkan Demiyelinizasyon (70).

#### 4.4.4. Hastalığın Seyri

MS, hastalığı tanımlayacak bir genel isim olsa da MS’in patolojik ve klinik açıdan farklı tipleri vardır. Bu farklı tipler arasında geçiş durumu söz konusu olabilmektedir. MS tiplerinin ayırt edilmesi prognozun ve tedavi planının belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Bireyler arasında değişiklik gösteren heterojen hastalık seyri relapslı remisyon MS (RRMS), sekonder progresif MS (SPMS), primer progresif MS (PPMS) ve progresif relapslı MS (PRMS) olmak üzere 4 kategoriye ayrılmaktadır (Şekil 4.4.4.1.) (10).

**Relapslı remisyonlu MS (RRMS):** Ataklar arasında hastalığın stabil kalması ile karakterize %80-85’lik oranla en sık rastlanan formdur. Akut ataklar ve bunları izleyen kısmi ya da tama yakın düzelleme dönemleri görülmektedir. Günler haftalar içinde ilerleyen ayrı ayrı ataklarla seyreder. Genellikle takip eden haftalar-aylar içinde tam düzelleme görülür. İleriki ataklar tahmin edilemeyen aralar ile ortaya çıkar. Her bir ataktan sonra hastaya ait özürülük giderek artar. İlerleyen dönemde bu tipin sekonder progresif forma dönebilme eğilimi vardır (71).

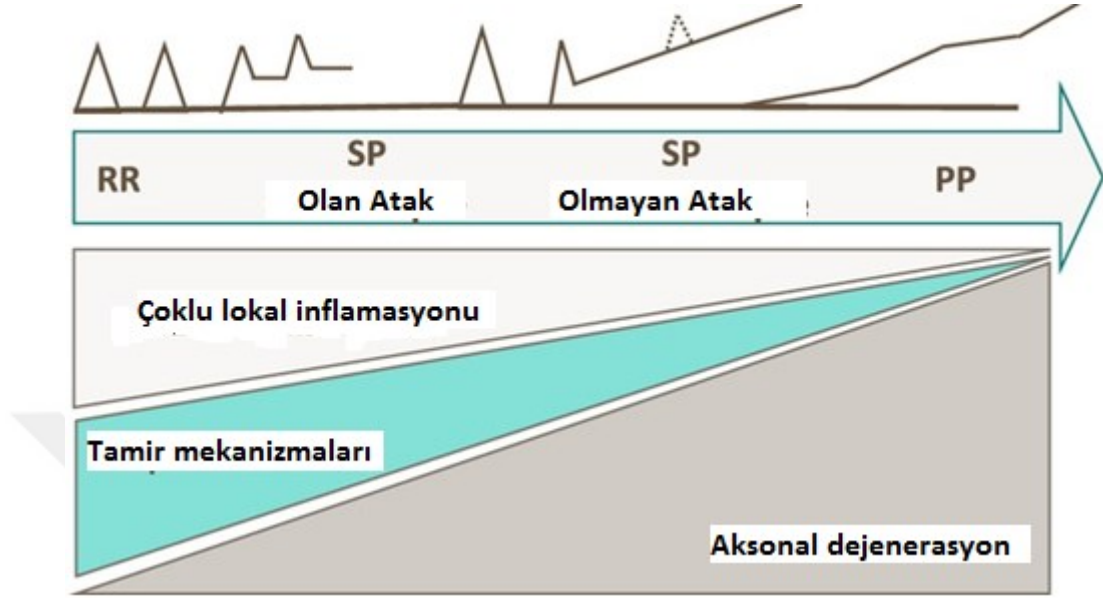
***Sekonder progresif MS (SPMS):*** RRMS ile seyreden klinik form ortalama 5-6 yıl sonra bu forma dönüşmektedir. Relapsların sıklaşıp remisyonların azaldığı bu formda fonksiyon kaybı da söz konusudur. Nörodejenerasyonun ön planda olduğu bu aşamada beyin hacmi azalır ve hastalık yükü artar. Aynı hastalığın daha ileri evresini temsil eden SPMS, RRMS'li hastaların yaklaşık % 50'sinde 15 yıldan sonra gelişir (71).

***Primer Progresif MS (PPMS):*** Hastaların % 15'inin içinde olduğu bu grupta atak görülmez ama hastalık başlangıcından itibaren devamlı olarak fonksiyonel düşüş görülmektedir (72). Fonksiyonel gerileme SPMS'e göre daha hızlı olup diğer MS tiplerine kıyasla daha farklı patogeneze sergiler. Beyindeki lezyon görülme durumu daha az olup, genellikle ön planda olan spastik paraparezi (%83) ve omurilikte atrofi ve miyelopatidir. Diğer fonksiyonel kayıplar serebellar bozukluk (%6), hemipleji (%1), beyin sapı sendromları (%1), görme kaybı (%1) ve kognitif bozukluklardır (%1). MS'in bu alt tipi çoğunlukla 40 yaş civarında olanlarda görülüp, mevcut tedavi yöntemlerine karşı dirençlidir (73, 74).

***Progresif relapslı MS (PRMS):*** Tüm MS'lilerin % 5-28'ini oluşturan bu tip MS'de primer ve sekonder progresif MS örtüşmekte ve temelde progresyon olurken üzerine ataklar görülmektedir. Hastaların % 50'sinde ilk 10 yılda ataklar görülürken geri kalanlarda ise başlangıcından 20 veya daha fazla sürede ataklar görülmektedir. Atak araları sık olmayıp, ataklar genelde hafif iyileşmelerle seyredip tama yakın düzelmelere kadar devam etmektedir. Hastalık progresyon durumu PPMS'e benzer olup yaklaşık 8-10 yıl içinde harekette kısıtlılık oluşmaktadır (71, 73-75).

Bu dört MS tipi dışında iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) MS tipleri de görülmektedir. Hastalığın başlangıcında hafif duyuşsal ve silik motor belirtileri veya optik nörit görülse de yaşamları etkilenmeden tamamen iyileşen MS tipine iyi huylu MS denir. Tüm MS çeşitleri arasında %10-15 arasında görülüp RRMS'nin bir alt grubudur. İyi huylu başlayıp zamanla RRMS'ye dönüşebilen iyi huylu MS'de 25 yıldan sonra atak ve progresyon görülebilir. Görülme durumu nadir olsa da, hastalık

başlangıcından kısa bir süre sonra hızla ilerleyip beş yıl içinde ciddi olabilecek özürllüklere ve hatta ölüme yol açabilecek MS tipine ise kötü huylu MS denir (10).



Şekil 4.4.4.1.: MS Hastalık Seyri (76).

#### 4.4.5. Hastalığın Tanı Yöntemleri

MS'de kesin tanı büyük önem taşır. Çünkü doğru tanı hem hastalığın seyrine etkili olabilen immün modülatör ve immüsupressif tedavilerin uygulanmasına hem de hastanın hastalığı ile ilgili ve yapılabilecekler konusunda bilgilendirilmesine olanak sağlar. MS tanısını koymak, belirtilerinin çok farklı olması ve hastalığın seyrinin kolay olmamasından dolayı zordur. Her ne kadar tanı için özel bir yöntem olmasa da, MS olup olmadığına semptomlar, fiziksel bulgular ve laboratuvar testlerine bakılarak karar verilmektedir. MR, nörofizyolojik testler ve BOS incelemesi tanıya ulaşmada önemli katkılar sağlar (9).

MS tanısı koymada gereklilik durumuna göre şu sıra izlenmektedir:

1. Nörolojik inceleme
2. Göz hareketleri ve görme kabiliyeti
3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

4. Uyarılmış Potansiyeller (EP)
5. Görsel Uyarılmış Potansiyeller (VEP)
6. Lomber Ponksiyonu (Beyin Omurilik sıvısı, BOS)
7. McDonald's Kriterleri (77).

MS tanısında asıl önemli olan nörolojik öykü ve muayenedir. Bu konuda Schumacher Kurulu kesin MS tanısı koymada 6 maddelik bir yol izlemişler.

1. Başlangıç yaşı 10-50 arasında olmalıdır.
2. MSS'ye ait objektif nörolojik bulgular gereklidir.
3. MSS'de 2 ya da daha fazla bölge etkilenmiş olmalıdır.
4. Relapsing-remitting ya da progresif seyir (> 6ay) olmalıdır.
5. Tablo başka bir nörolojik hastalık ile daha iyi açıklanabilir olmamalıdır.
6. Tanı bir nörolog tarafından konulmalıdır (78).

## 5. MATERYAL ve METOD

### 5.1. Malzeme Listesi

**Tablo 5.1.1.** Malzeme Listesi

Malzeme	Firma – Katalog No
İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1)	BioVision, 4119-100
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	R&D Systems, 233-FB-025
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	R&D Systems, 236-EG-200
Trombosit kökenli büyüme faktörü- $\alpha$ (PDGF- $\alpha$ )	Biovision, 4482-10
Laminin	Sigma, L2020
Poly-L-Ornithine	Sigma, P3655
Siliar nörotrofik faktör (CNTF)	Biovision, 4017-20
Nörotrofin-3 (NT3)	Biovision, 4306-10
Triiodothyronine (T3)	Sigma, T6397
DMEM	Multicell, 319-005-CL
DMEM-F12	Capricorn, DMEM-12-A
N2 Supplement	Thermo Fisher, 17502048
B27 Supplement	Thermo Fisher, 12587010
FBS	Sigma-F4135
PBS	Sigma-P4417
PFA	Sigma-158127
Tween-20	Sigma-P9416
Triton-X	Sigma-T8787
Goat Serum	Sigma-G9023

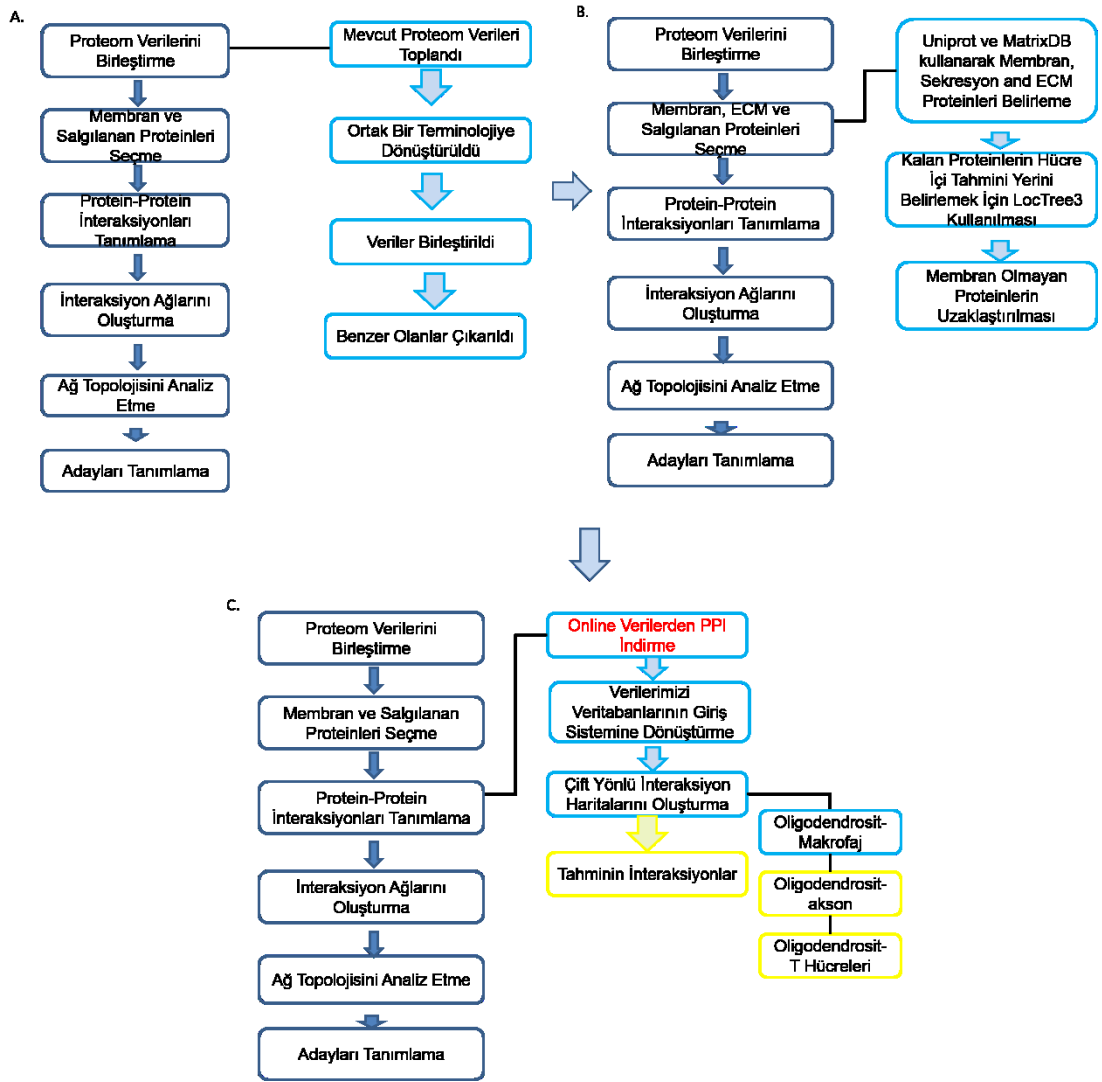
## 5.2. Veri Toplama ve Analizi

Literatürde oligodendrositler ve makrofajlar için değişik formatlarda yayınlanmış proteom verileri toplandı ve aynı formata getirilerek birleştirildi (Tablo 5.2.1.). Toplanan veri tabanlarında ortak bir dil kullanılmamıştır mesela proteinler gen ID'si, Uniprot ID'si ve gen ismi gibi farklı şekilde isimlendirilmiştir. Bu nedenle birleştirilmiş veri tabanının evrensel olması için tüm proteinlerin gen ID, Uniprot ID ve gen isimleri elde edilerek güncellendi (Şekil 5.2.1.A). Uniprot, Cell Atlas, Synergizer, NCBI veri tabanları kullanılarak öncelikle var olan genlerin (UniprotID, GeneID ve GeneName) bilgileri doğru mu diye kontrol edildi. Bazı genler birden çok farklı isimle literatürde bulunduğu için dolaylı kargaşayı gidermek adına tüm proteinler NCBI'daki evrensel gen ismiyle listelendi. Son aşamada tüm veriler manuel olarak kontrol edilerek doğrulandı ve birleştirme işlemi tamamlandı. Membran, ekstraselüler matriks (ECM) ve hücre dışına salınan proteinler Uniprot ve LocTree3 veri tabanları kullanılarak seçildi (Şekil 5.2.1.B). Birbirleriyle etkileşime giren protein çiftlerini belirlemek için STRING, BioGrid, IRefIndex, IntAct ve MINT veri tabanlarından yararlanıldı (Şekil 5.2.1.C). Cytoscape programı kullanarak etkileşim ağları oluşturuldu ve analiz edildi (Şekil 5.2.2.). Proteinlerin, merkezi konumda olmayı gösteren aradalık merkezliliği skorları hesaplandı.

**Tablo 5.2.1.:** Proteom Kaynakları

HÜCRE GRUPLARI	PROTEİN SAYISI	REFERANS	HÜCRE KAYNAĞI
Makrofaj	134	(79)	Monosit Türevli Makrofajlar
	127	(13)	PBMC Monosit Türevli Makrofajlar
	225	(80)	PBMC Monosit Türevli Makrofajlar
Miyelin/Oligodendrosit	1280	(15)	İnsan MSS Miyelin Proteomu
	952	(16)	İnsan MSS Miyelin Proteomu
	2300	(17)	İnsan MO3.13 Hücre Hattının Proteome Analizi



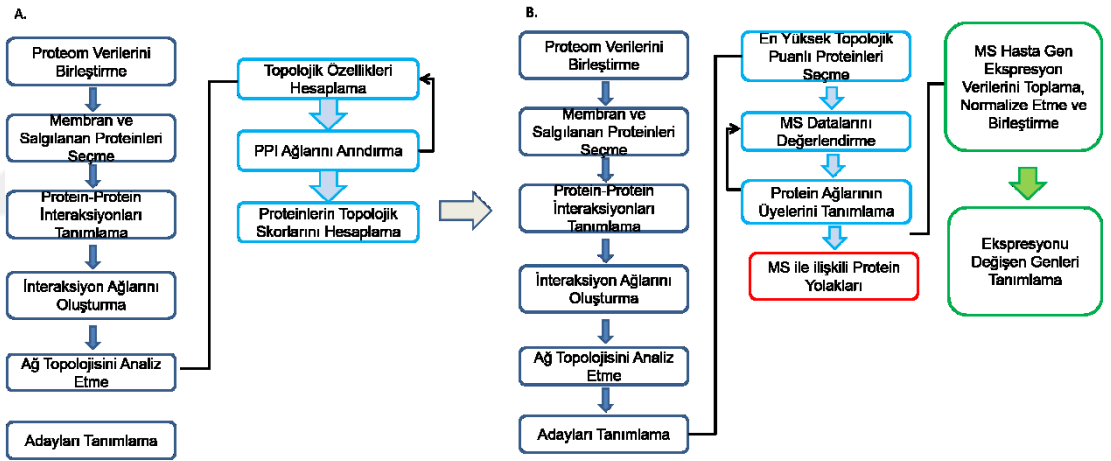


Şekil 5.2.1.: İnteraktomun Haritasının Elde Edilmesinde İzlenen İş Akışının Şeması

MS ifade ham veri kümeleri olan RNA-seq ve mikroarray verileri derlendi ve proteom verilerine benzer şekilde birleştirildi (Tablo 5.2.2. A). Daha sonra beyaz maddede hastalarda ifadesi değişen genler bulundu (14, 81-83) ve bunların p değerleri hesaplandı. Aradalık merkezliliği değeri en yüksek olan proteinler arasında hastalarda ifadesi istatistiksel olarak değişen ( $p < 0.05$ ) proteinler belirlendi (Şekil 5.2.2. B).

**Tablo 5.2.2.: MS İfade Kaynakları**

GEN SAYISI	REFERANS	HÜCRE KAYNAĞI
6606	(14)	MS Hasta Lezyonları ve Kontrol Beyinleri
378	(81)	MS Hasta Lezyonları ve Kontrol Beyinleri
1400	(82)	MS Hasta Lezyonları ve Kontrol Beyinleri
336	(83)	MS Hasta Kanı ve Kontrol Kanı



**Şekil 5.2.2.: Sinyal Yolaklarını Tanımlamanın Sistematığının Özeti**

### 5.3. Kültür Öncesi Hazırlıklar

Hücrelerin büyütüleceği 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara %0,1'lik poly-l-ornitin içeren 2 ml, steril ddH<sub>2</sub>O eklenip gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 2 kez steril ddH<sub>2</sub>O ile yıkanan flasklara %1'lik laminin içeren 2 ml, 1X steril PBS eklenip kaplanması için gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Flasklar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi. Hücrelerin ekim aşamasına geldiğinde 37 °C'lik etüvde ısıtılan flaskların içindeki laminin çekilip atılarak ekim

işlemi için hazır hale getirildi. Hücrelerin büyütülme ve farklılaştırma aşamalarında kullanılan vasatlar taze olarak hazırlandı.

#### **5.4. Oligodendrosit Hücre Kültürü**

D3 fare embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılmış nöral progenitor kök hücrelerden elde edilen oligodendrositler kullanıldı. Bu hücreleri önceden yayınlanmış protokole göre ürettik ve büyüttük (22).

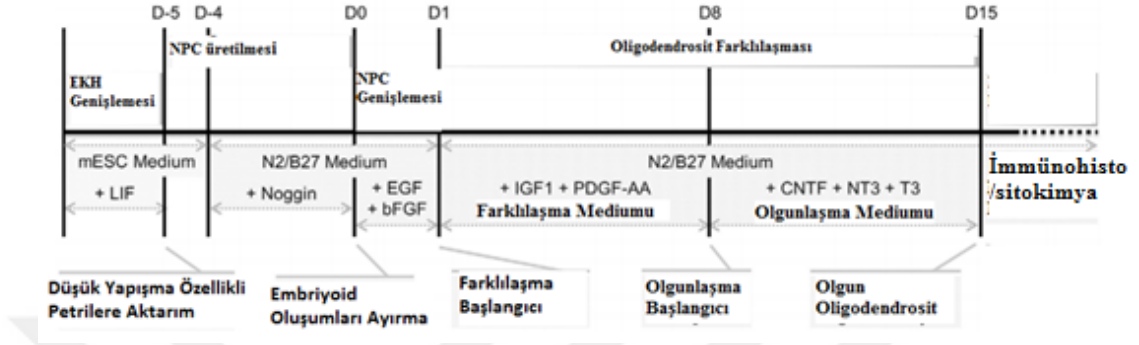
##### **5.4.1. Oligogenik Nöral Öncül Hücrelerin (O-NÖH) Eldesi**

Oligodendrositler fare embriyonik kök hücrelerinden (EKH) elde edilmiştir. Fare embriyonik fibroblastları ile kaplı petri kaplarında büyütülen fare D3 EKH'ler; KnockOut DMEM, 15% KnockOut serum takviyesi, Glutamax, 1X Esensiyal olmayan amino asit karışımı ve 55 µM 2-merkaptoetanol içeren EKH vasatına 1,000 U/ml fare Lösemi inhibitör faktör (LIF) eklenerek her gün beslendi. Nöral öncül hücrelerin üretimi için süspansiyondaki EKH'ler ilk gün LIF içermeyen EKH vasatı içinde ardından 500 ng/ml Noggin'e ek olarak 1X Glutamax, 1X N2 ve 1X B27 içeren DMEM/F12 (NÖH vasatı) ile dört gün boyunca büyütüldü. Dördüncü günün sonunda oluşan embriyoid gövdeler ayrıştırıldı ve 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) ve 20 ng/ml fibroblast büyüme faktörü-bazik (bFGF) ilave edilmiş NÖH vasatı içinde laminin kaplı petrilere ekildi. Büyütülen nöral öncül hücreler pasajlanarak çoğaltılabildi ve istenildiğinde kullanılmak üzere -80 °C'de donduruldu.

##### **5.4.2. NÖH'lerin Oligodendrositlere Farklılaştırılması**

Oligodendrosit üretimi için nöral öncül hücreler çözdürüldü. 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda %60-70 oranında hücre doluluğuna erişilene kadar büyütüldü. Ardından hücreler yedi gün boyunca NPC vasatına eklenen 10 ng/ml İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), 10 ng/ml Trombosit kökenli büyüme faktörü-α (PDGF-α)'dan oluşan farklılaştırma vasatına alındı. Sekizinci günde olgunlaşmanın başlaması için

hücrelerin vasatı NPC vasatına eklenen, 10 ng/ml siliar nörotrofik faktor (CNTF), 5 ng/ml nörotrofin-3 (NT3) ve 40 ng/ml triiodothyronine (T3) içeren olgunlaştırma vasatı ile değiştirildi. Hücreler bu vasatta 15. güne kadar tutuldu. 15. Günde oligodendrositler immünohistokimya için hazır hale geldi (Şekil 5.4.2.1.).



Şekil 5.4.2.1.: Nöral Öncül Hücrelerin Üretimi, Büyütülmesi ve Oligodendrositlere Farklılaşması (22)

## 5.5. Makrofaj Hücre Kültürü

Peritoneal kaviteden makrofaj alınması için önce buz, 27g iğne ile 5ml şırınga, strafor blok ve fare montaj pimleri, makas ve forseps hazırlandı. Balb-c erkek fare strafor blok üzerine sırt üstü pozisyonu sabitlendi. %70 etanol ile sterilize edildikten sonra makas ve forseps yardımı ile derisi kesildi. 27g iğne kullanılarak peritoneal kavite içine 5ml %3 FBS içeren PBS enjekte edildi. PBS enjekte edildikten sonra peritoneal kaviteye hafif masaj yaparak organ etrafında yapışık olabilecek makrofajlar PBS içine alındı. Daha sonrasında peritoneal kavite içindeki PBS geri çekilerek falkon tüp içine alındı ve buz üstünde muhafaza edildi. 1500 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelletteki hücreler, DMEM (%1 glutamax, %1 antibiyotik) içinde çözüldü ve kültüre tabi tutuldu. Lipopolisakkarit (LPS) verilecek hücrelere aynı anda LPS eklenip 2 saat inkübe edilerek aktif hale gelmeleri sağlandı.

## 5.6. İmmünohistokimya Boyaması

Sekiz kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücrelerin içerisinde bulunduğu yaşam vasatları çekilerek 2 kez 1 ml 1x PBS ile yıkandı ve her bir kuyucuğa 300 µl %4 lük paraformaldehid (PFA) eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildikten sonra PFA çekilip atıldı ve 500 µl 1x PBS ile 2 kez yıkandı. Bloklama için %3 BSA, %0,1 Triton X, %0,1 sodyum azid ve %1 keçi serumu içeren PBS eklenip oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 500 µl 1x PBS ile 2 kez yıkandı. Ardından hücrelere %3 BSA, %1 keçi serum, %0,1 sodyum azid ve %0,1 Tween 20 içeren sulandırma solüsyonu içinde birincil antikolarlar (Tablo 5.6.1.) eklendi ve +4 °C’de gece boyunca inkübe edildi. Gece boyu inkübasyonun ardından hücreler %0,1 Tween 20 içeren 1X PBS ile 3 kez 5’er dakika boyunca yıkandı ve yine aynı sulandırma solüsyonu içinde ikincil antikolarlar (Tablo 5.6.2.) eklenip oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler %0,1 Tween 20 içeren 1X PBS ile 4 kez 5’er dakika boyunca yıkandı ve hücrelerin üzerine 1 µg/ml DAPI eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 5 dakika sonunda hücreler 2 kez 5 dakika 1X PBS ile yıkandı. Kapama solüsyonu (Sigma, Lot: SLBT1064) ile kapatılan hücrelerin kurumaları beklendi ve görüntülenene kadar bekletilmesi için +4 °C’ye alındı.

**Tablo 5.6.1.:** İmmünohisto/sitokimya Birincil Antikor Listesi

BİRİNCİL ANTİKORLAR	FİRMA	ORAN
Epha7 fare antikor	Santa Cruz, sc-393973	1/200
EfrinA1 tavşan antikor	Thermo Fisher, 34-3300	1/200
EfrinA3 tavşan antikor	Thermo Fisher, 36-7500	1/200
EfrinA4 tavşan antikor	Thermo Fisher, 34-3700	1/200
EfrinA5 tavşan antikor	Thermo Fisher, 38-0400	1/200
GFAP fare antikor	Thermo Fisher, PA3-16727	1/400
GalC fare antikor	Milipore, MAB342	1/200
MBP sıçan antikor	BIO-RAD, aa82-87	1/100
F480 sıçan antikor	E-BioScience, 53-481-82	1/500
Cd11b tavşan antikor	Novus, nb11089474	1/500

**Tablo 5.6.2.: İmmünohisto/sitokimya İkincil Antikor Listesi**

<b>İKİNCİL ANTİKORLAR</b>	<b>FİRMA</b>	<b>ORAN</b>
488 keçi anti tavşan antikor	AAT Bioquest, 16800	1/500
555 keçi anti fare antikor	AAT Bioquest, 16460	1/500
633 keçi anti sıçan antikor	AAT Bioquest, 16638	1/500

### **5.7. Perfüzyon Fiksasyonu**

İzofloran (Piramal critical care, isoflurane-usp) ile fareler (6 fare kullanıldı) bayıltıldı. Periton bölgesinden kalbe ulaşmak için farelerin deri ve kaburgaları kaldırıldı ve sol antriuma kesi atıldı. İnsülin iğnesinin takılı olduğu pompa ile kalbin sol ventrikülüne girilip 1X'lik fosfat buffer salini (PBS) fare kanı tamamen uzaklaşana kadar manuel olarak (yaklaşık 5 ml) verildi. Kan uzaklaştıktan sonra %4'lük PFA ile hayvanın fikse olduğu anlaşıldıktan sonra beyin çıkarıldı. Beyin %4'lük PFA'da 2-6 saat tutulup kesit alınana kadar %30'lük sükrözde (Multicell, Lot:800081017) tutuldu.

### **5.8. Kesit Alma**

Sükrözde bekletilen beyin peçete üzerine alınarak sükröz uzaklaştırıldı. Beynin ilgilenilmeyen ön ve arka kısmı neşterle düz bir şekilde kesilip atıldı. Beyinler vibratom (LEICA VT1000 S) havuzunda yapıştırıcı ile yüzeye sabitlendi. Soğuk 1X'lik PBS içinde vibratomda kesit alma işlemi kesitin kalınlığı, kesit alma hızı, frekansı ve beyin kesilecek başlangıç ile bitiş noktaları ayarlandıktan sonra başlatıldı. Kesitler 24'lük kuyucuklara PBS ile birlikte alınıp konuldu. En iyi kesitler seçildikten sonra lamlara alınıp boyama için kurumaya bırakıldı.

### **5.9. İmmünohistokimya Boyaması**

PFA ile fikse edilmiş 24 kuyucuktaki kesitler PBS'den uzaklaştırıldı. 300 µL bloklama solüsyonundan (%5 keçi serumu, %2 Triton-X ve 1X PBS) koyuldu ve 1,5 saat shaker üzerinde 110 RPM'de inkübe edildi. Bloklama solüsyonu çekildi ve 2x10

200 µL PBS-Triton-X ile yıkandı. 200 µL bloklama solüsyonuna birincil antikor (Tablo 5.6.1.) eklenip +4 °C’de shakerda bir gece inkübe edildi. Kesitler 24’lük well içinde 3x20 dakika PBS-Triton-X ile yıkandı. 200 µL bloklama solüsyonunun içine ikincil antikorlar (Tablo 5.6.2.) eklenip 2 saat shaker üzerinde üstü kapalı bir şekilde inkübe edildi. 3x20 dakika PBS-Triton-X ile yıkandı. 500 µL DAPI eklenip 5 dakika bekletildi. DAPI çekilip atıldı ve 2x10 dakika PBS-Triton-X ile yıkandı. Kesitler lama alınıp kuruması beklendi. Kuruduktan sonra kapatma medyumuyla (Sigma, Lot: SLBT1064) kapatıldı. Görüntülenmesi için +4 °C’ye alındı.

### **5.10. Görüntülerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme**

Hücreler ve beyin kesitleri lazer taramalı konfokal mikroskopu (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) 20X, 40X ve 60X büyütme objektif kullanılarak görüntüledi. Alınan görüntüler Zen (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ve ImageJ (84) programları kullanarak işlendi.

LPS verilen ve verilmeyen hücrelerde EphA7 ifade yoğunluğu ImageJ programı kullanılarak kör bir araştırmacı tarafından ölçüldü. Hücreler rastgele seçilerek sınırları belirlendi ve hem EphA7 hem de F4/80 için ayrı ayrı hesaplama yapıldı. İfade yoğunluklarının ortalamaları ve standart hesaplamaları yapıp Mann-Whitney U Testi ile gruplar karşılaştırıldı.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Protein-Protein Etkileşim Atlasının –İnteraktomun– Oluşturulması

Daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilen 13738 veriyi birleştirdik. Aynı zamanda birden çok kere bulunan yani duplike olan proteinleri çıkardık. Kalan protein listesinden membran, ECM ve hücre dışına salınan proteinleri seçtik (Tablo 6.1.1). Elde edilen protein listesinde kriterlere uyan oligodendrositlerde 1517 protein, makrofajlarda 164 protein bulduk (Tablo 6.1.1). Bu bulunan proteinler arasında 59730 etkileşim tanımladık (Tablo 6.1.2 ve Şekil 6.1.1). İnteraksiyona giren proteinlerin %56'sının hasta plaklarında bulunduğunu yayınlanmış hasta plak proteom verilerine (14) bakarak gözlemledik. Sonraki adımda sadece oligodendrositler ve sadece makrofajlarda bulunan proteinler arasındaki etkileşimleri tanımladık (3875 etkileşim). Bu spesifik etkileşimleri gerçekleştiren 789 proteinden 454'ü (%57,5) yayınlanmış verilerde MS plaklarında (14) gözlemledik (Tablo 6.1.2).

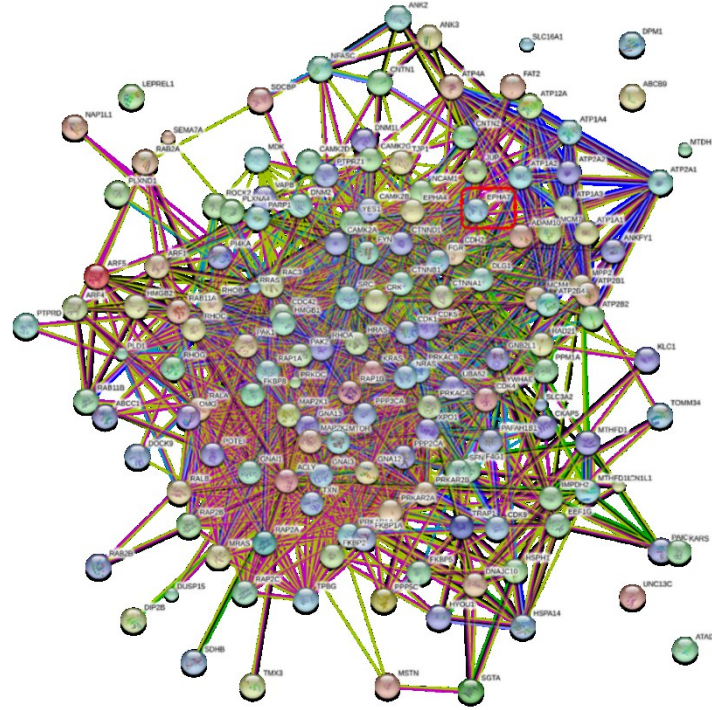
**Tablo 6.1.1.:** Elde Edilen Membran, ECM ve Salınan Proteinlerin Sayılarının Hüresel Dağılımı

Hücre	Toplam Protein Sayısı	Membran, ECM ve Salınan Protein Sayısı	Hücre Spesifik Protein Sayısı
Oligodendrosit	3023	1517	1387
Makrofaj	289	164	34



**Tablo 6.1.2.:** İnteraksiyona Giren Proteinler Arasından MS Plaklarında Gözlenenlerin Oranı

Hücreler	Protein Sayısı	İnteraksiyon Sayısı	MS'de Bulunan Protein Oranı
Oligodendrosit-Makrofaj	1517-164	59730	%56
Oligodendrosit-Makrofaj Hücre Spesifik	1387-34	3875	%57,5



**Şekil 6.1.1.:** Oligodendrosit-Makrofaj İnteraktomu. Kırmızı Kutu Aradalık Merkezliliği Değeri Yüksek Olan Yani Networkte Merkezi Konumda Bulunan Bir Proteini Göstermektedir.

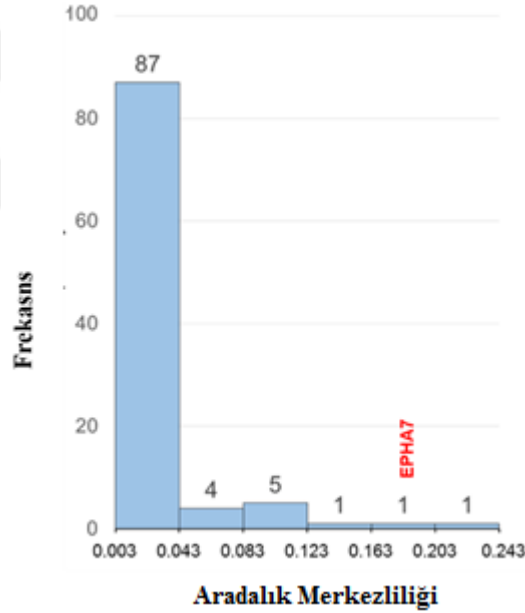
## 6.2. MS ile ilişkili Proteinlerin Tanımlanması

MS hastalığı sürecinde oligodendrosit ve makrofajlar arasındaki etkileşimde rol alan önemli proteinleri tanımlamak için interaktom verilerini ve gen ifadesi verilerini birleştirdik. İlk olarak, topolojik analiz sonucunda en yüksek aradalık merkezliliği değerine sahip proteinleri belirledik (Şekil 6.2.1.). Aradalık merkezliliği, bir ağdaki bir düğümün merkezliyetinin bir ölçüsü olup ilgili düğümden geçen düğüm çiftleri arasındaki en kısa yolların kesiti olarak hesaplanır (85). Yani aradalık merkezliliği değeri yüksek proteinler hücre-hücre bağlanmasında önemli bir konumda bulunmaktadır. Ayrıca MS hastalarının ve sağlıklı kontrollerin gen ifade seviyelerini literatürdeki verileri birleştirerek tek bir veri tabanında topladık. Hastaların beyaz maddesindeki ifadesi değişen genleri belirledik. Hem merkezi konumda bulunan hem de hastalarda ifadesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişen ( $p < 0.05$ ) en tepedeki beş protein; EphA7, HRAS, HSPD1, TF ve MYH14'tür (Tablo 6.2.1). Bu proteinler arasından, dört tanesi (EphA7, TF, HSPD1 ve HRAS) daha önceki yayınlarda MS ile ilişkilendirilmiştir (86-89). Bu sonuç, interaktom analizi ile MS hastalığına ilişkin proteinlerin bulunabileceğini göstermektedir.

Listenin en başında olan EphA7'nin literatür taramasıyla incelediğimizde reseptör-ligand özelliğine sahip olduğunu, membran proteini olduğunu, MS ve deneysel otoimmün ensefalomyelitis (EAE) ile ilişkisi bulunduğunu, nörogenezde rol aldığını ve makrofajlarda (13, 90, 91) bulunduğunu gördük. İmmünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizimize EphA7 ile devam etmeye karar verdik.

**Tablo 6.2.1.:** İnteraktom Analizinde Öne Çıkan 5 Protein

Protein İsmi	Aradalık Merkezliliği	Log2 Değişimi	P Değeri	Bulunduğu Hücre Grubu	Referans
<b>EphA7</b>	<b>0,203</b>	<b>3,69</b>	<b>0,00014</b>	<b>Makrofaj</b>	[13]
MYH14	0,014	-2,08	0,00080	Oligodendrosit	[16]
TF	0,017	-2,3	0,00336	Oligodendrosit	[15]
HSPD1	0,022	0,64	0,01415	Oligodendrosit/Makrofaj	[16, 93]
HRAS	0,010	0,77	0,01737	Oligodendrosit	[15]

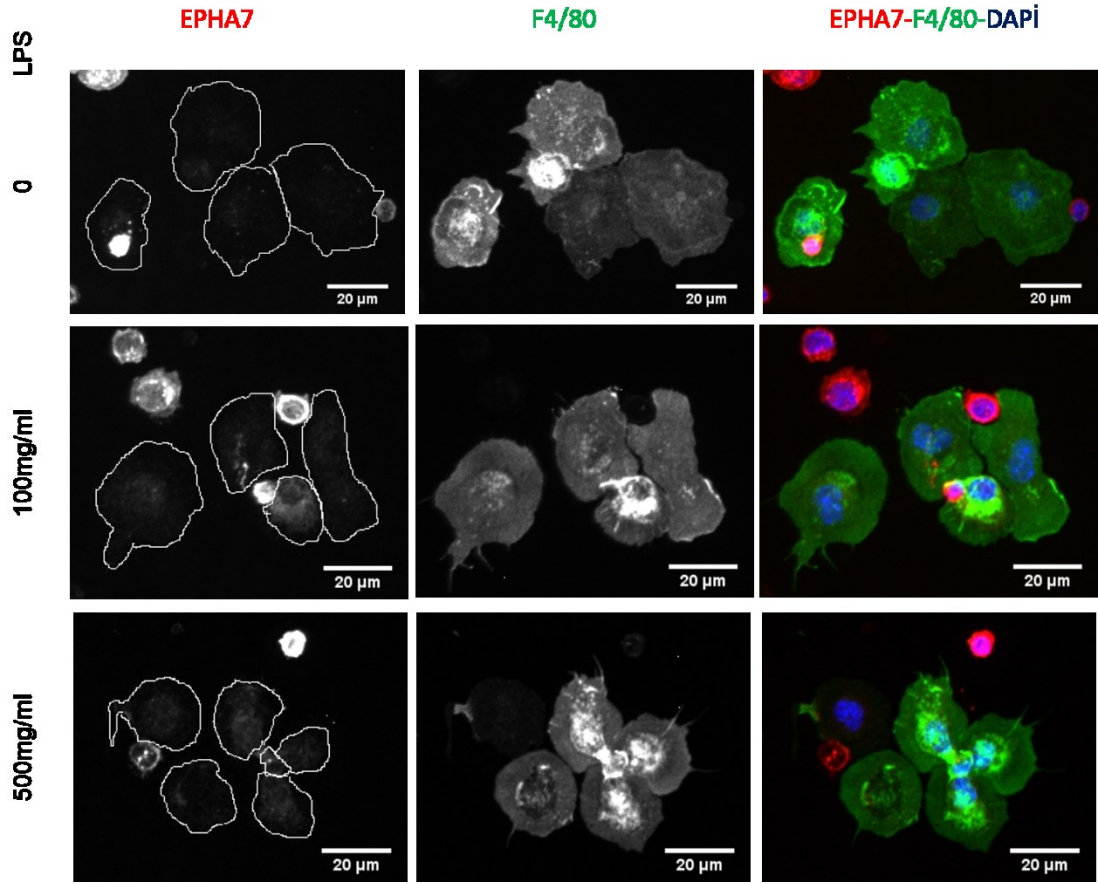


**Şekil 6.2.1.:** Oligodendrosit-Makrofaj İnteraktomunun Topolojik Analizi. Aradalık Merkezliliği Değerleri Histogram Olarak Dağıtılmıştır. EphA7 En Yüksek İkinci Değere Sahip Proteindir.

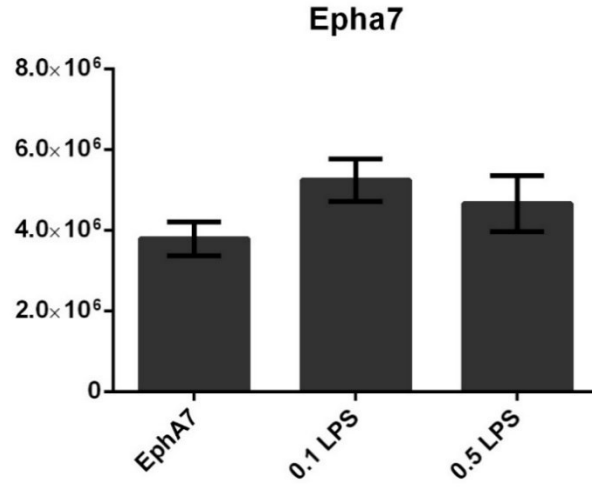
### 6.3. EphA7'nin Makrofajlarda İfade Edildiği Gözlendi

Makrofaj hücre kültüründe yapılan immünohistokimya boyamalarında makrofajları aktive etmek için 100 mg/ml ve 500 mg/ml dozlarında gram negatif bakteri duvarında bulunan lipopolisakarit (LPS) kullandık. Makrofajları işaretlemek

için F4/80 antikoru kullandık. Aktive edilmemiş (LPS'siz) ve aktive edilmiş (LPS'li) makrofajların boyama sonuçlarına göre EphA7 reseptörünün ifade seviyesini ölçtük (Resim 6.3.1.1.). Analizlere göre 100 mg/ml LPS verilen aktive olmuş makrofajlarda LPS verilmeyen makrofajlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde EphA7 reseptör ifadesi yapma eğiliminde olduğunu gözlemledik (Şekil 6.3.1.1.; aktive edilmemiş göre 100 mg/ml LPS  $p=0,00714$  ve 500 mg/ml LPS  $p=0,33204$ ).

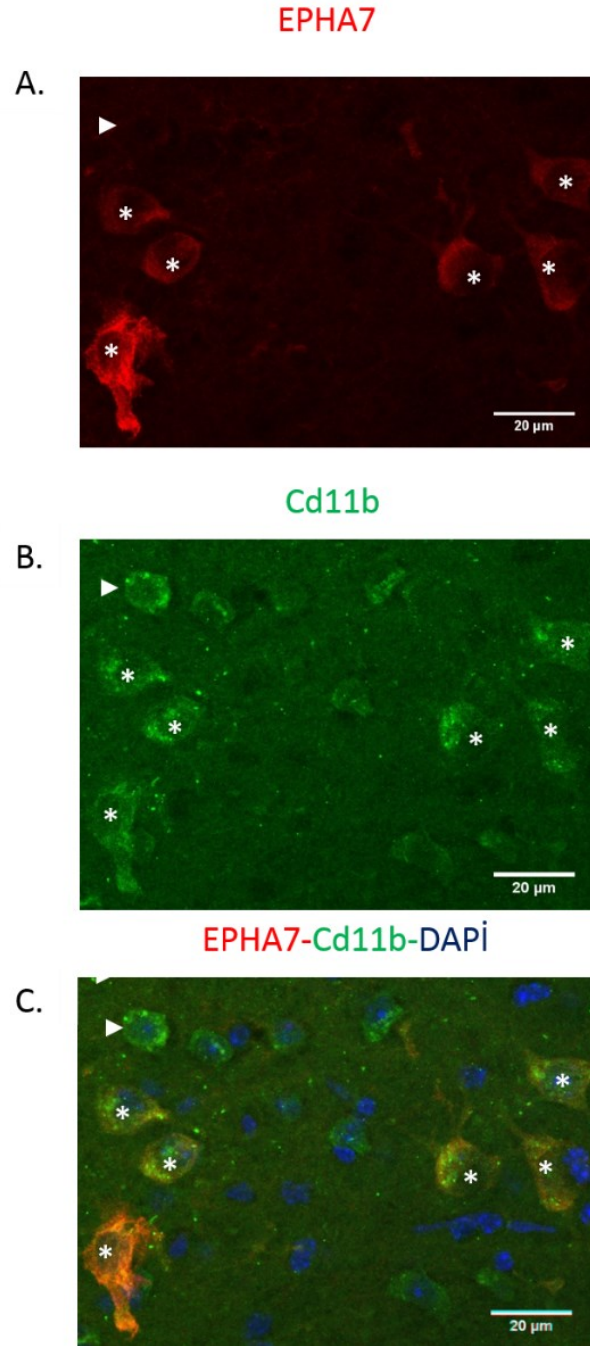


**Resim 6.3.1.1.:** Makrofaj Hücre Kültüründe Aktive Edilmemiş, 0,1 ve 0,5 mg/µL LPS ile Aktive Edilmiş Hücrelerde EphA7, F4/80 (Makrofaj) ve DAPI ile Birleştirilmiş Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.

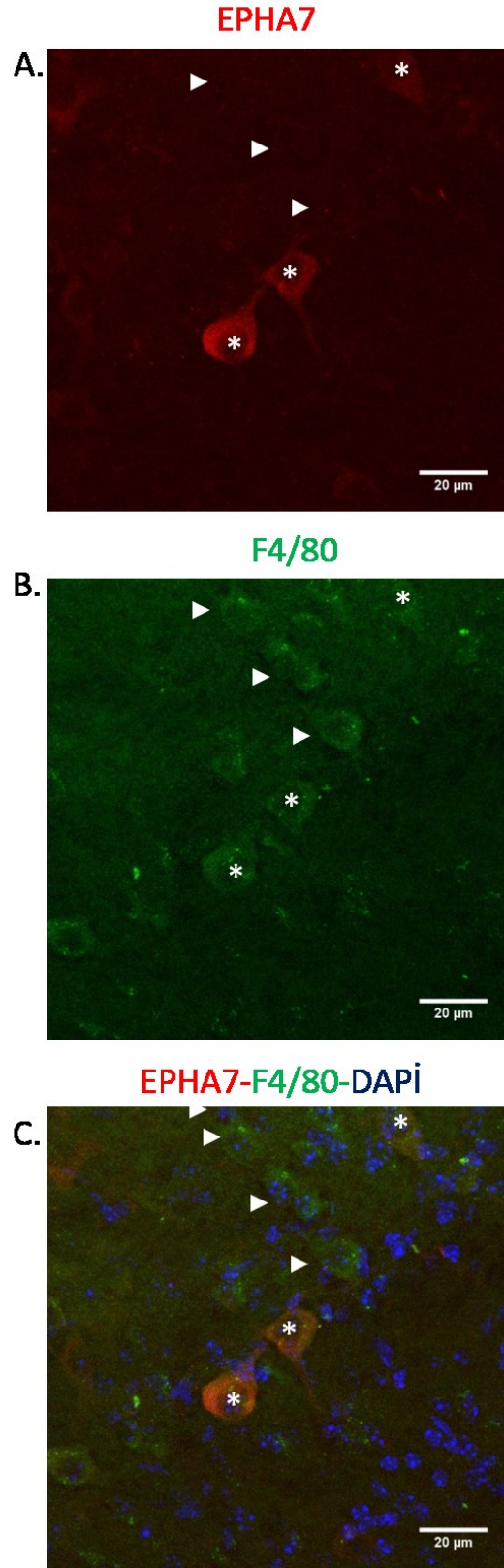


**Şekil 6.3.1.1.:** EphA7 Reseptörünün Makrofaj Hücre Kültüründeki İfade Seviyesinin Kantitasyonu.

Daha sonra EphA7 ifadesine in vivo olarak baktık. Fare beyin kesitlerindeki immünohistokimya boyamalarında da Cd11b veya F4/80 ile işaretli makrofaj/mikroglia hücrelerinde EphA7 reseptör ifadesini gözlemledik (Resim 6.3.1.2. ve 6.3.1.3.).



**Resim 6.3.1.2.:** Fare Beyin (Hipotalamus) Kesitlerinde EphA7 (A), Cd11b (Makrofaj-Mikroglia) (B) ve DAPİ ile Birleştirilmiş (C) Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldızlar EphA7 ve Cd11b Pozitif Hücreleri, Oklar Sadece Cd11b Pozitif Hücreleri Göstermektedir. Bar: 20  $\mu$ m.



**Resim 6.3.1.3.:** Fare Beyin (Hipotalamus) Kesitlerinde EphA7 (A), F4/80 (Makrofaj-Mikroglia) (B) ve Üçünün Birleştirilmiş (C) Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldızlar EphA7 ve F4/80 Pozitif Hücreleri, Oklar Sadece F4/80 Pozitif Hücreleri Göstermektedir. Bar: 20 µm.

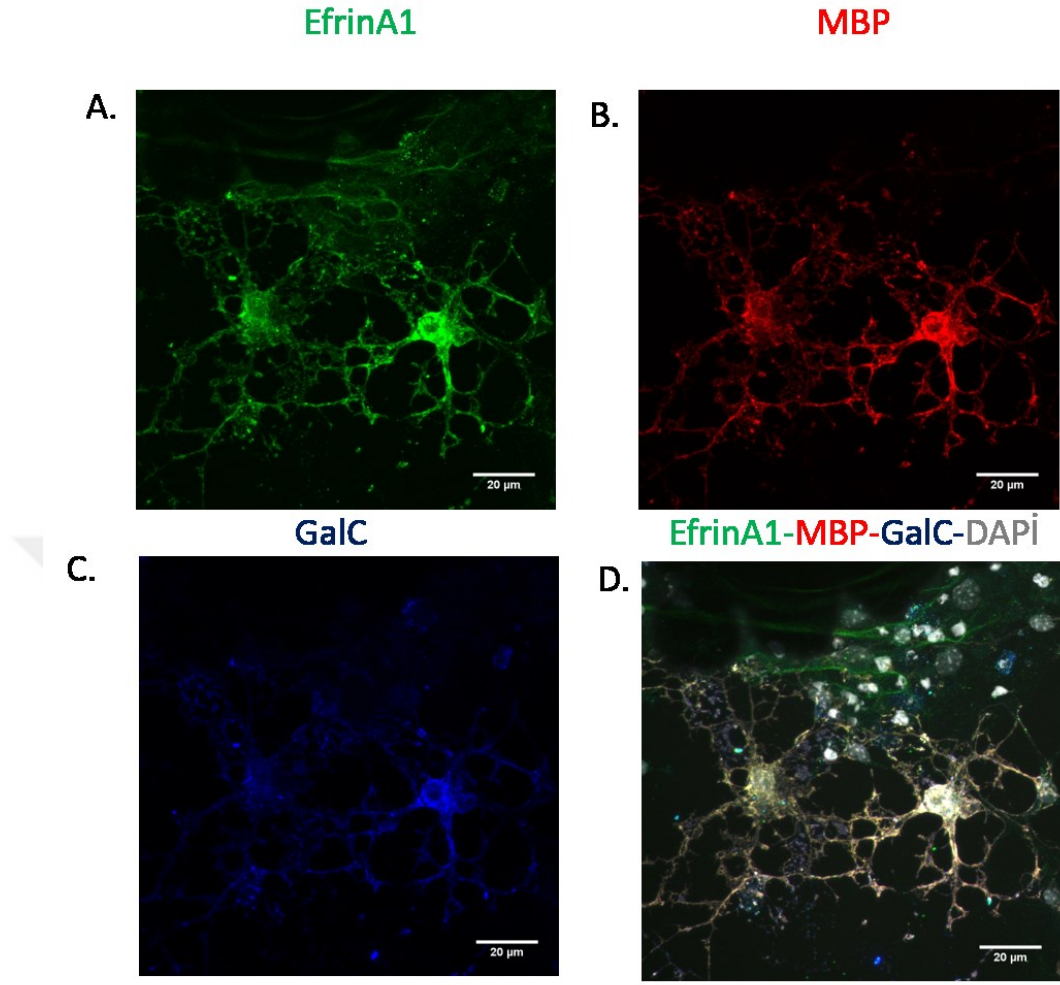
Sonuç olarak, EphA7'nin sağlıklı farelerin periferdeki makrofajlarında ve beyinlerinde makrofaj/mikroglia hücrelerinde bulunduğunu gözlemledik. Ayrıca aktive edilmiş makrofajlarda EphA7 ifadesinin artma eğiliminde olduğunu bulduk.

#### **6.4. EfrinA1, A3, A4 ve A5 Proteinleri Oligodendrosit Hücrelerinde Gözlendi**

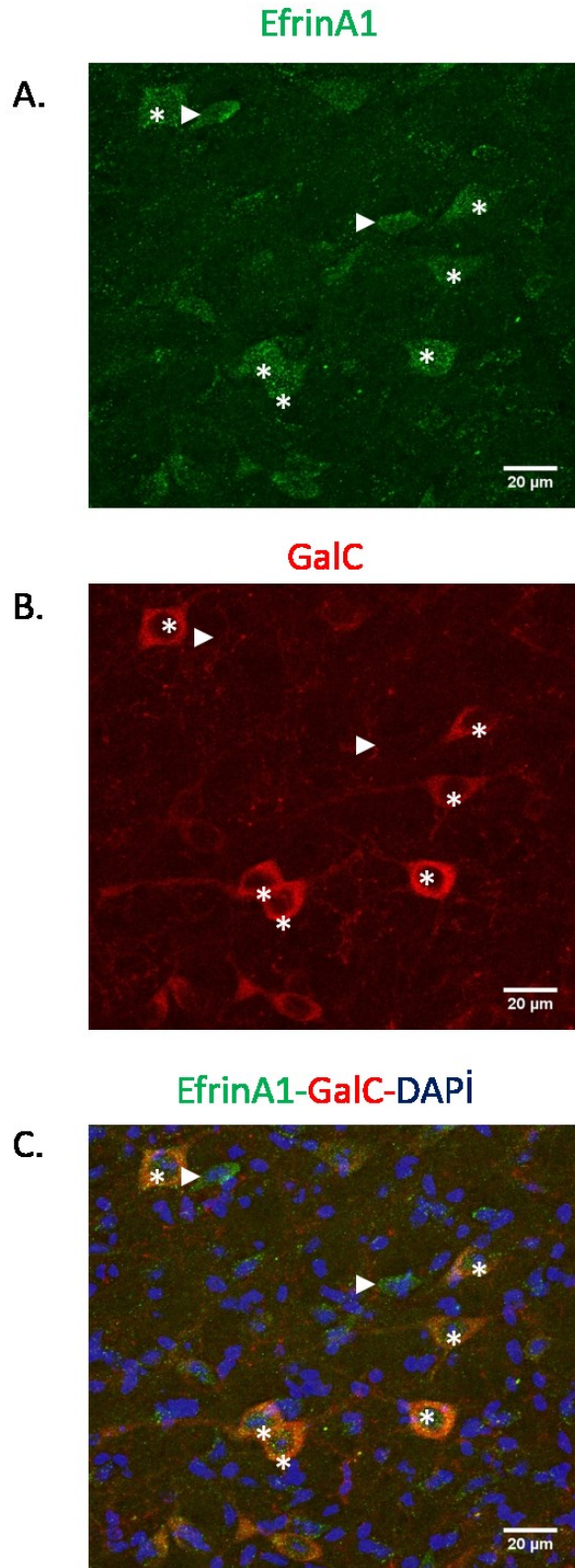
EphA7'nin muhtemel ligandları arasında efrinA1, A2, A3, A4 ve A5 bulunmaktadır (92). İlk olarak bu ligandların EphA7 ile etkileşime giren proteinler arasında bulunup bulunmadığına baktık. Efrin proteinlerinin hiçbiri kullandığımız oligodendrosit/miyelin ve makrofaj proteom veri tabanlarında olmadığından interaktom analizi sonucu çıkan proteinler arasında yoklardı. Dolayısıyla efrin ligandlarının oligodendrositlerde bulunup bulunmadığına immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler ile bakmak istedik. EfrinA1, A3, A4 ve A5 boyaması için gerekli antikora ulaşabildik ve deneylerimize bu dört protein ile devam ettik. Oligodendrosit boyamaları için GalC ve MBP boyamalarını kullandık. GalC hem in vivo hem de in vitro hücre gövdesi ve saçaklarını boyar. MBP in vitro hücre gövdesi ve saçaklarını boyarken in vivo genel olarak saçaklarda görünür.

Hücre kültüründe efrinA1, A3, A4 ve A5 proteinlerinin oligodendrositlerde bulunup bulunmadığı ve lokalizasyonlarını inceledik. Sonraki adımda hücre kültüründe elde edilen sonuçları normal beyin dokusunda gözlemlemek için immünohistokimyasal yöntemler kullandık. Her iki boyama sonucunda oligodendrositlerde efrinA1 (Resim 6.4.1.1 ve 6.4.1.2), efrinA3 (Resim 6.4.2.1 ve 6.4.2.2), efrinA4 (Resim 6.4.3.1 ve 6.4.3.2) ve efrinA5 (Resim 6.4.4.1 ve 6.4.4.2) ligandlarının ifade edildiğini gözlemledik.

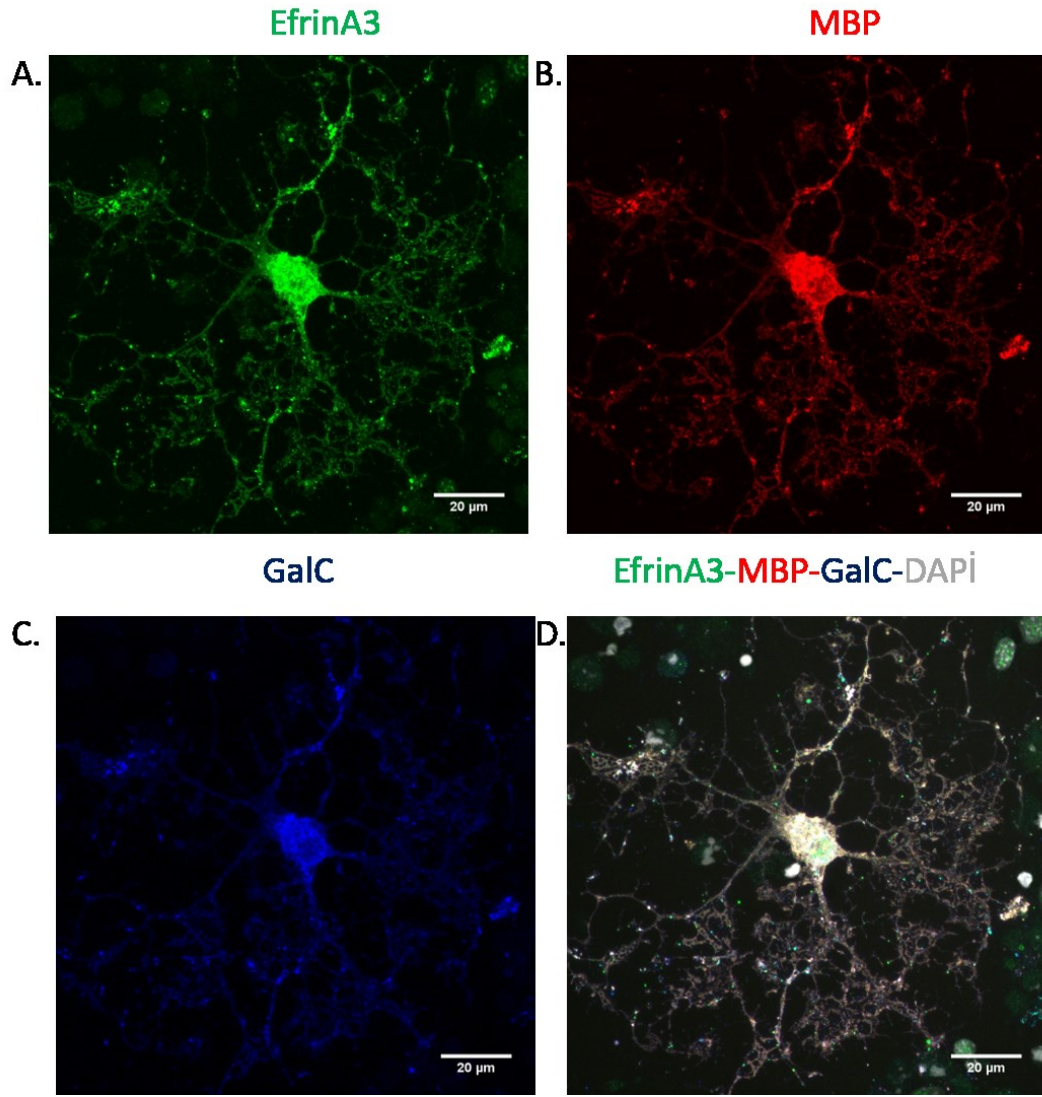




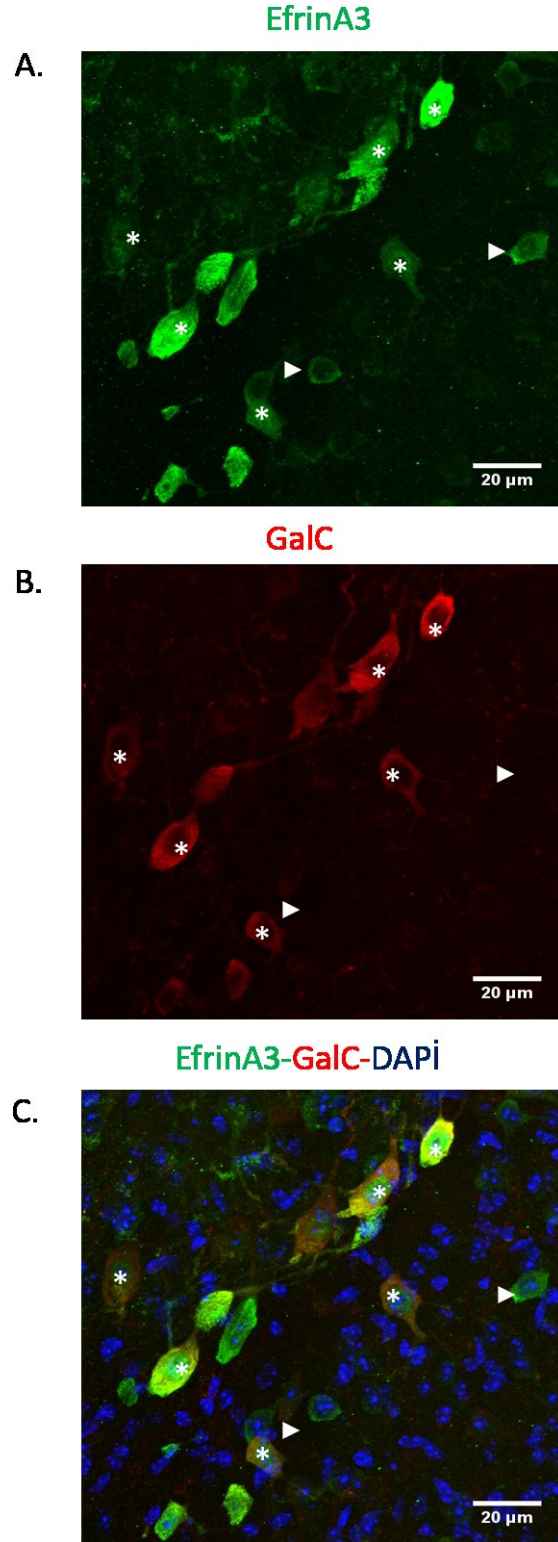
**Resim 6.4.1.1.:** Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA1 (A), MBP (Saçaklar-Oligodendrosit) (B), GalC (Hücre Gövdesi-Oligodendrosit) (C) ve DAPİ ile Birleştirilmiş (D) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.



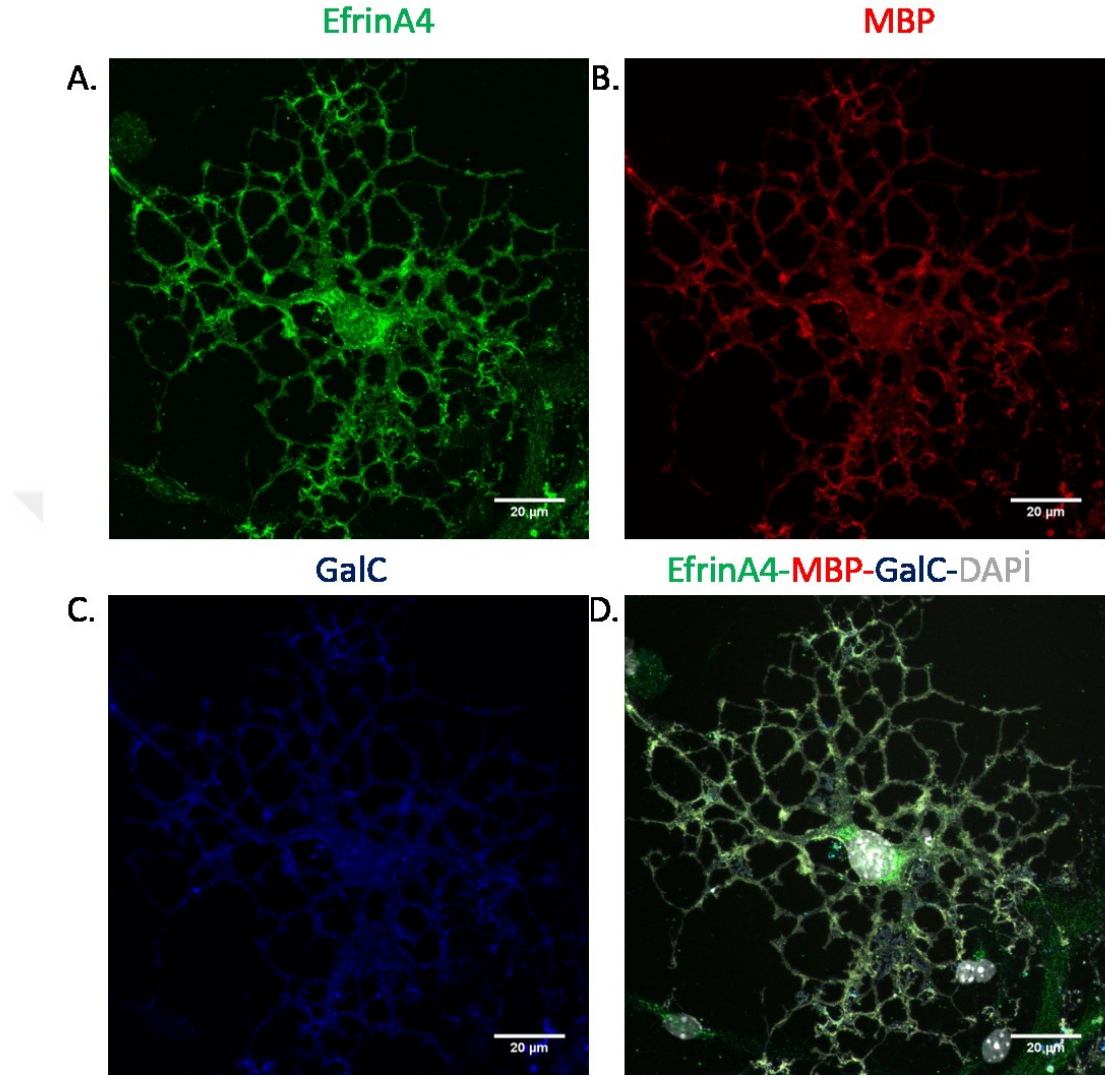
**Resim 6.4.1.2.:** Fare Beyin (Hipotalamus) Kesitlerinde EfrinA1 (A), GalC (Oligodendrosit) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldızlar EfrinA1 ve GalC Pozitif Hücreleri, Oklar Sadece EfrinA1 Pozitif Hücreleri Göstermektedir. Bar: 20  $\mu$ m.



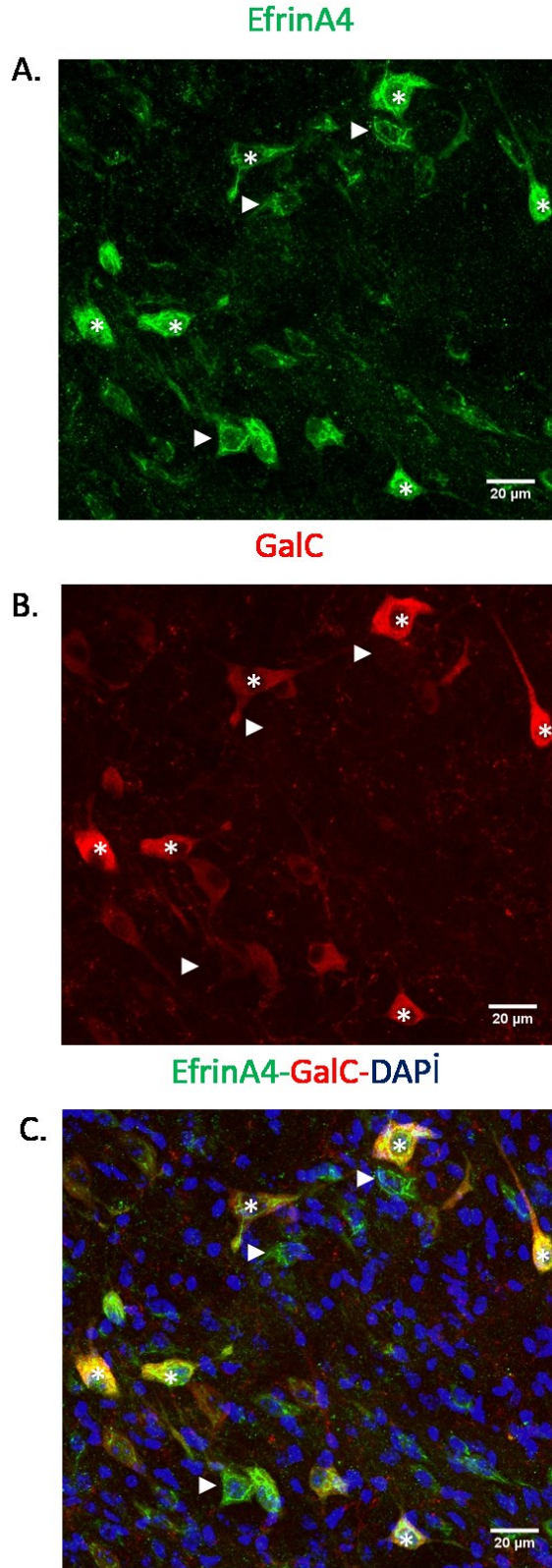
**Resim 6.4.2.1.:** Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA3 (A), MBP (Saçaklar-Oligodendrosit) (B), GalC (Hücre Gövdesi-Oligodendrosit) (C) ve DAPI ile Birleştirilmiş (D) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.



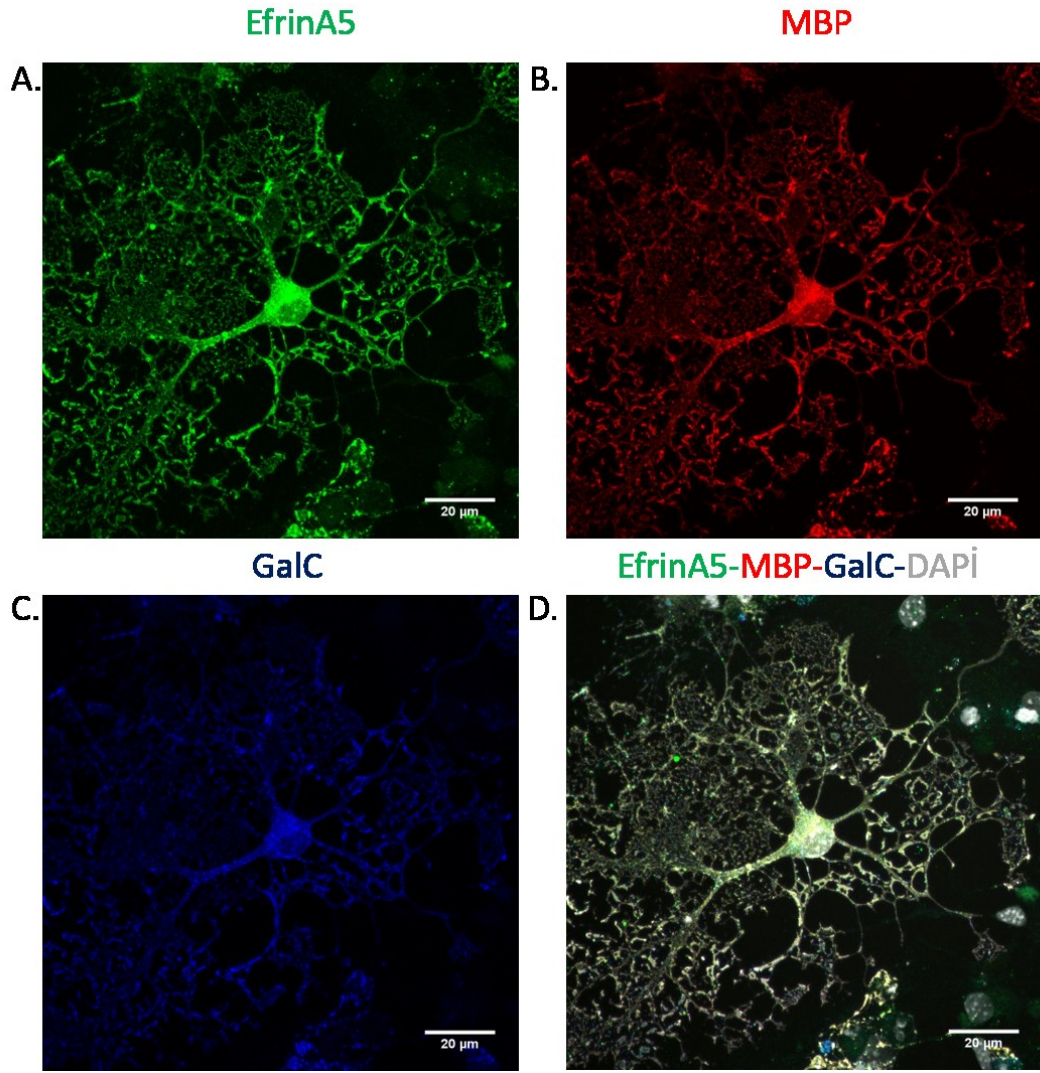
**Resim 6.4.2.2.:** Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EfrinA3 (A), GalC (Oligodendrosit) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldızlar EfrinA3 ve GalC Pozitif Hücreleri, Oklar Sadece EfrinA3 Pozitif Hücreleri Göstermektedir. Bar: 20  $\mu\text{m}$ .



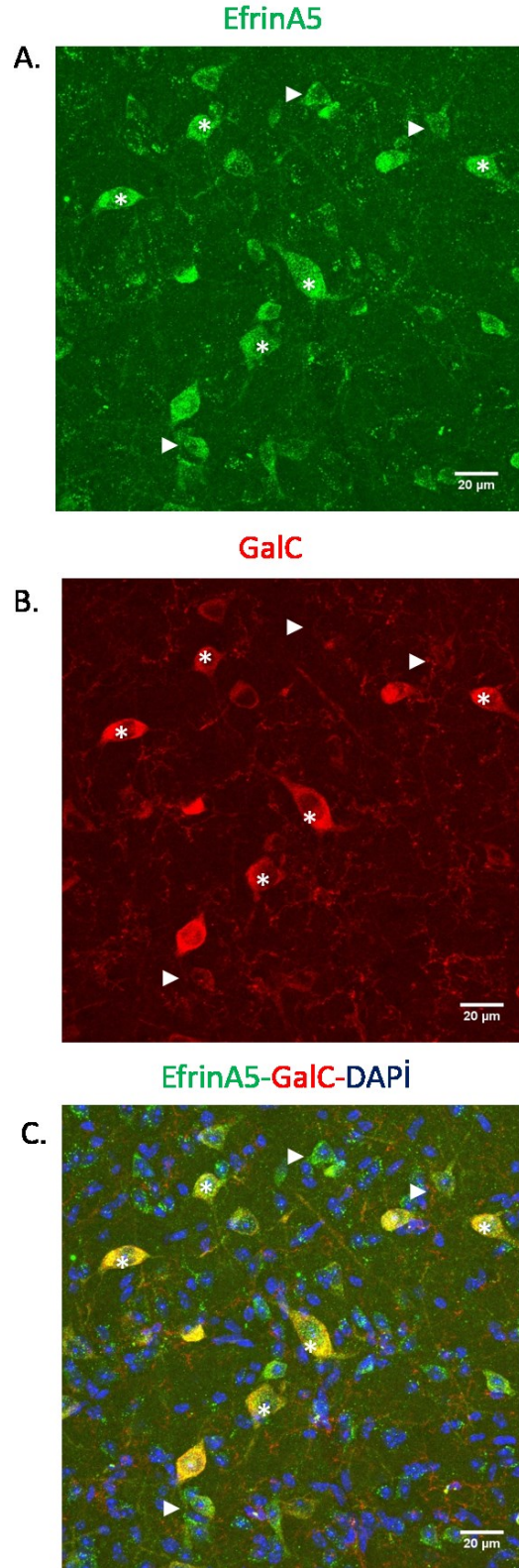
**Resim 6.4.3.1.:** Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA4 (A), MBP (Saçaklar-Oligodendrosit) (B), GalC (Hücre Gövdesi-Oligodendrosit) (C) ve DAPI ile Birleştirilmiş (D) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.



**Resim 6.4.3.2.:** Fare Beyin (Korpus kallosum) Kesitlerinde EfrinA4 (A), GalC (Oligodendrosit) (B) ve DAPİ ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldızlar EfrinA4 ve GalC Pozitif Hücreleri, Oklar Sadece EfrinA4 Pozitif Hücreleri Göstermektedir. Bar: 20  $\mu\text{m}$ .



**Resim 6.4.4.1.:** Oligodendrosit Hücre Kültüründe EfrinA5 (A), MBP (Saçaklar-Oligodendrosit) (B), GalC (Hücre Gövdesi-Oligodendrosit) (C) ve DAPI ile Birleştirilmiş (D) İmmünotokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.



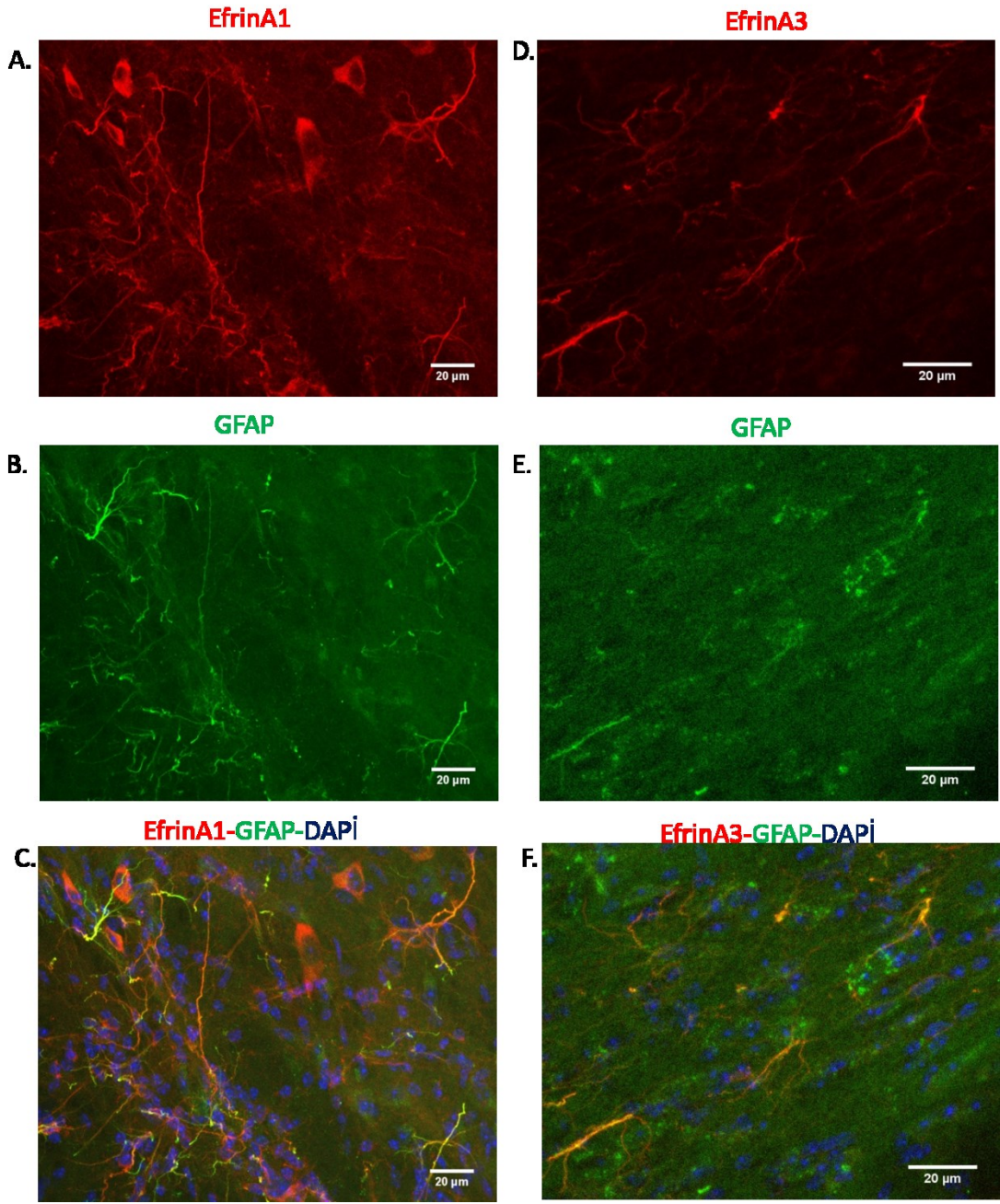
**Resim 6.4.4.2.:** Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EfrinA5 (A), GalC (Oligodendrosit) (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldızlar EfrinA5 ve GalC Pozitif Hücreleri, Oklar Sadece EfrinA5 Pozitif Hücreleri Göstermektedir. Bar: 20 µm.



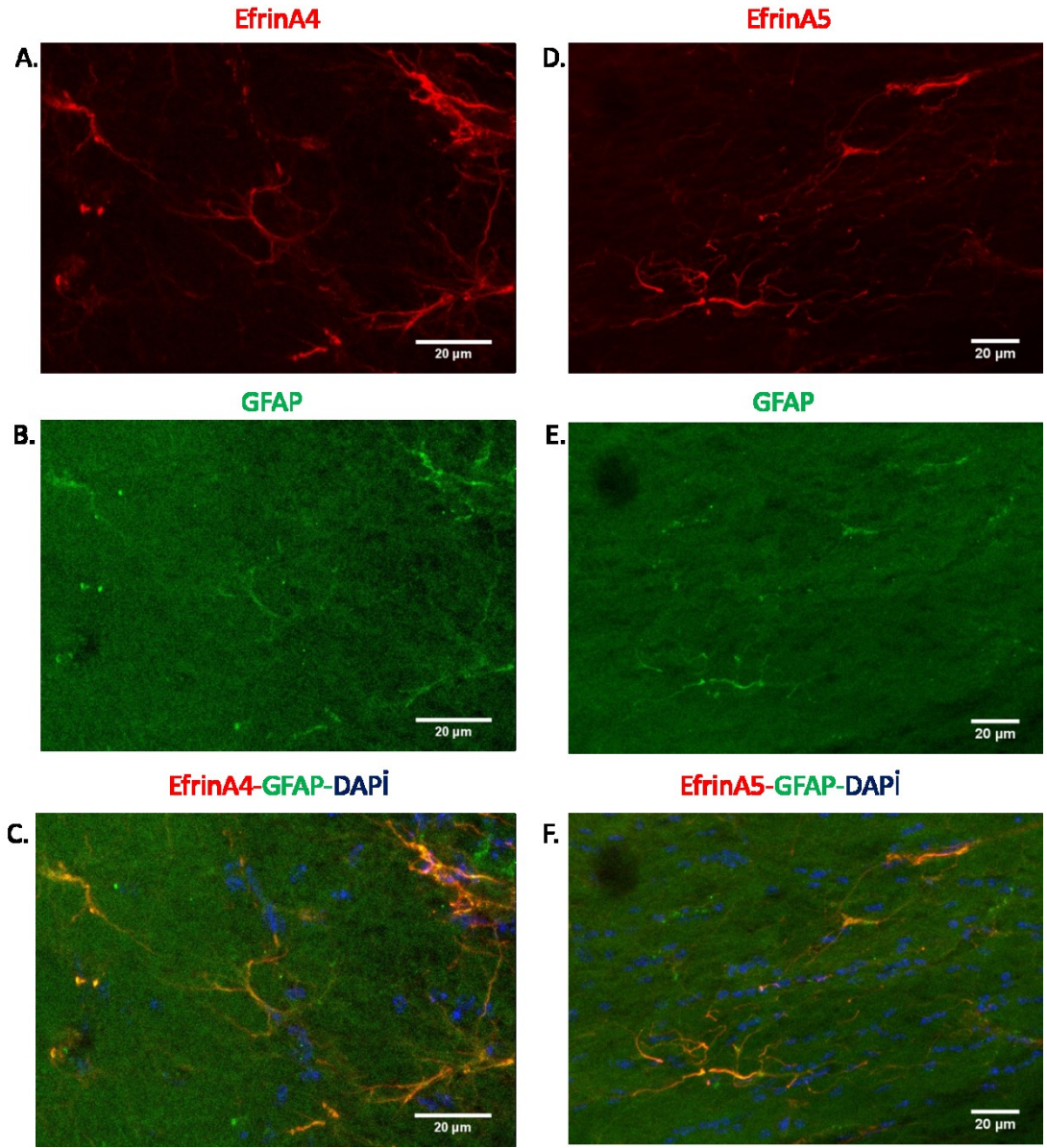
Sonuç olarak, makrofajlarda gözlemlenen EphA7'nin bağlanabileceği ligandlar olan efrinA1, A3, A4 ve A5 proteinlerinin hem in vitro kültürdeki oligodendrositlerde hem de sağlıklı farelerin beyindeki oligodendrositlerde ifade edildiğini gözlemledik. Bunun yanında hem in vitro hem de in vivo boyamalarımızda efrin ligandlarını ifade eden oligodendrosit proteinlerini ifade etmeyen hücreler de gözlemledik.

### **6.5. EfrinA1, A3, A4 ve A5 Proteinleri Astrosit Hücrelerinde Gözlendi**

Fare kesitlerinde yapılan boyamalarda efrin proteinlerinin oligodendrosit hücrelerinin dışındaki, şeklen astrositlere benzeyen hücreleri de boyadığı gözlemlendiği için bu proteinlerin astrositlerde ifade olup olmadığına baktık. Boyamalar sonucunda astrosit hücrelerinin membranlarında efrinA1 (Resim 6.5.1 A-C), efrinA3 (Resim 6.5.1 D-F), efrinA4 (Resim 6.5.2 A-C) ve efrinA5 (Resim 6.5.2 D-F) ligandlarının ifade edildiğini gözlemledik.



**Resim 6.5.1.:** Fare Beyin (Korpus Kallosum-Hipotalamus) Kesitlerinde EfrinA1 ve A3 (A), GFAP (Astrosit) (B) DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.



**Resim 6.5.2.:** Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EfrinA4 ve A5 (A), GFAP (Astrosit) (B) ve DAPİ ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.

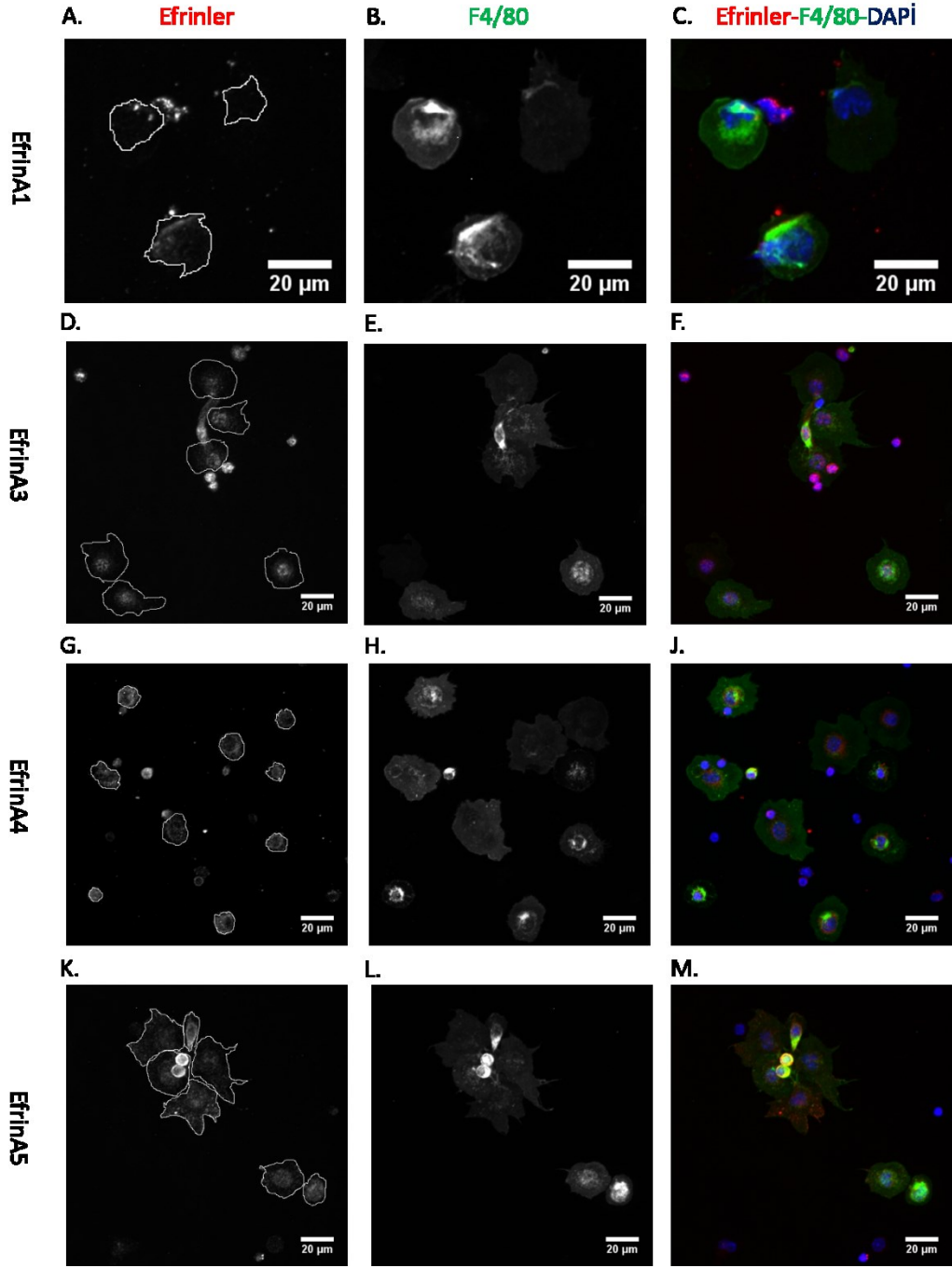
Sonuç olarak, efrinA1, A3, A4 ve A5 proteinlerinin inflamasyonda etkili bir hücre grubu olan astrositlerde ifade edildiğini gözlemledik.

## 6.6. EfrinA1, A3, A4 ve A5 Proteinleri İzole Edilmiş Primer Makrofajlarda Gözlendi

Fare kesitlerinde yapılan boyamalarda efrin proteinlerinin oligodendrosit ve astrosit hücrelerinin dışındaki, şeklen makrofaj/mikrogliaya benzeyen hücreleri de boyadığı gözleendiği için bu proteinlerin makrofaj/mikroglia da ifade olup olmadığına baktık. Efrin ligandlarının periferden toplanmış makrofaj hücrelerinde ifade olup olmadığını gözlemlemek için immünohistokimya boyamaları yaptık.

Boyama sonuçlarında makrofajlarda efrinA1, efrinA3, A4 ve A5'in ifadesini gözlemledik. (Resim 6.6.1.1 A-M).

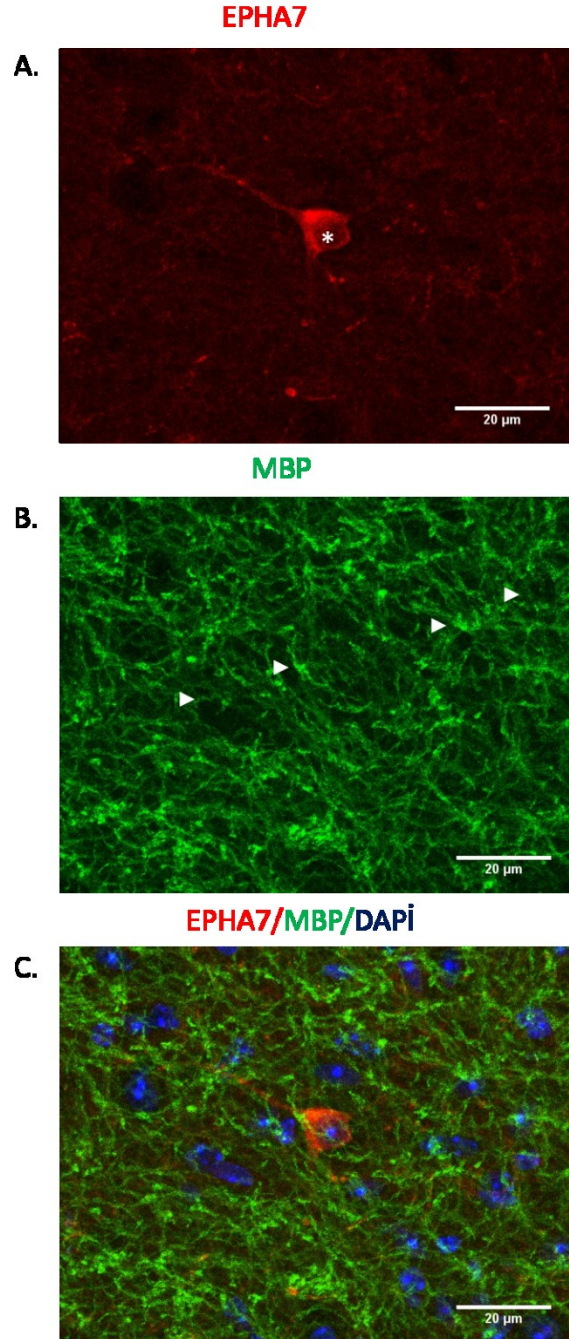




**Resim 6.6.1.:** Makrofaj Hücre Kültüründe EfrinA1, A3, A4 ve A5, F480 (Makrofaj) ve DAPİ ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Bar: 20 µm.

## 6.7. EphA7 Fare Beyin Kesitlerindeki Oligodendrositlerde Gözlenmedi

Makrofaj hücre kültüründe EphA7 reseptörünün ifadesini gözlemlendikten sonra fare beyin kesitlerinde oligodendrositlerde de EphA7 ifadesine baktık. Boyama sonucunda oligodendrositlerde EphA7 ifadesinin olmadığını gözlemledik.



**Şekil 6.7.1.:** Fare Beyin (Korpus Kallosum) Kesitlerinde EphA7 (A), MBP (B) ve DAPI ile Birleştirilmiş (C) İmmünohistokimya Örnek Boyama Görüntüleri. Yıldız EphA7 Pozitif Hücreyi Göstermekte, Oklar MBP Pozitif Oligodendrosit Hücrelerini Göstermektedir. Bar: 20 µm.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Önceki çalışmalarda MS'nin de içinde olduğu merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları sırasında rol alan oligodendrosit, bağışıklık hücreleri ve nöron gibi bazı hücrelerin proteom ve/veya gen ifade verileri elde edilerek hastalığın dinamiği ve mekanizmasını aydınlatmaya katkıda bulunulmuştur (13-17, 79, 93-95). Bu çalışmaların ortak yanı bir hücrenin proteomunu veya gen ifadesini diğer hücrelerden bağımsız bir şekilde ele alarak ifade ve lokalizasyon farklarından yola çıkmış olmalarıdır. Oysa MS birden çok hücrenin birbiriyle etkileşimde olduğu bir hastalıktır (26). Dolayısıyla MS'nin mekanizmasını anlamak için ve ona karşı tedavi geliştirmek için hücreler arası sinyalleri de göz önünde bulundurmak ve sinyal yollarını hücrelerin karşılıklı etkileşim çerçevesinde değerlendirmek gerekmektedir. Amacımız, oligodendrosit ve bağışıklık hücrelerinin proteomlarını karşılaştırarak bu hücreler arasındaki protein-protein etkileşimi tanımlayıp merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyonun hücresel mekanizmasında etkili olan sinyal yollarını belirlemektir. Bu sayede MS'ye karşı etkili ilaç üretilmesi için hedef proteinlerin belirlenmesini sağlamış olacağız. Bu hedef doğrultusunda önceki yöntemlerin aksine bizim geliştirdiğimiz yöntem iki ayrı hücrede bulunan membran proteinleri veya hücre dışı proteinler arasındaki etkileşimlerden yola çıkarak hücrelerin iletişimde etkili sinyal yollarını bulmaya yöneliktir. Bu sayede tedavi amacıyla tek bir hücre tipindeki sorunu gidermek yerine sistemin tümündeki dengeyi sağlamaya yönelik sonuçlar üretmeyi hedefledik. Bu amaçla, önceki çalışmalarda elde edilen proteom verilerinden yararlanıp büyük veri yöntemlerini kullanarak protein-protein etkileşimlerinin (PPI) haritalarını, miyelin interaktomlarını, oluşturduk.

İnteraktomların oluşturulmasında ilk adım olarak, birleştirdiğimiz proteom verilerinde membran, ekstrasellüler matriks (ECM) ve hücre dışına salınan proteinleri belirledik ve duplike olan proteinleri çıkardık. İnteraktomlarda, PPI'lerin merkezinde bulunan proteinlerin, miyeline karşı bağışıklık sistemi saldırısında rol alan sinyal yolları olacağı hipoteziyle bu proteinleri belirledik. Çalışmamızın ön sonuçlarında, oligodendrositlerde 1517 membran proteini, makrofajlarda 164 membran proteini bulunup, tanımlanan 59730 etkileşimden 3875'i hücreye spesifik

proteinler arasındaydı. Bu spesifik etkileşimleri gerçekleştiren 789 proteinden 454'ü (%57,5) yayınlanmış verilerde MS plaklarında gözlemledik (14). Ön sonuçlarımız MS hastalığına ilişkin daha önceki çalışmalarla önemli eşleşmelere sahipti ve sonuçların projenin diğer adımlarına geçirecek kadar umut vaat ettiğini göstermekteydi.

Daha sonra, merkezi proteinlerin ifade seviyelerini MS hastaları ve normal bireylerde karşılaştırıp hastalıkta en çok öne çıkan proteinleri tanımladık. Bu özgün yöntemimizi kullanarak oligodendrosit-makrofaj interaktomunun topolojik değerleri ve ifade seviyeleri farkı sonucunda MS ile ilişkili öne çıkan 5 protein bulduk. Bu 5 protein arasından membranda bulunan ve özellikle reseptör-ligand ilişkisi olup nörogenezde rol alan tirozin kinaz ailesinin büyük bir üyesi olan efrin reseptör A7 (EphA7) proteinini takip eden analizlerimiz için seçtik. Efrin reseptörlerinin ligandları diğer hücrelerin membranlarında bulunan efrinlerdir (96, 97). EphA7 reseptörünün efrin ligandları arasında A gruplarıyla (A1, A2, A3, A4 ve A5) etkileşim oluşturabildiği bilinmektedir (92).

EphA7 proteinin makrofajlarda ifade olup olmadığını analiz etmek için hem makrofaj hücre kültürlerinde hem de sağlıklı fare beyin kesitlerinde boyadık. Hücre kültürü boyamasında makrofajlara iki farklı dozda LPS verilerek aktif hale getirilen makrofajların LPS'siz makrofaj boyamasıyla kıyaslamasını yaptık. Boyama sonucunda EphA7 proteinin hücre kültüründeki hem LPS'li hem LPS'siz makrofajlarda ve fare beyin kesitlerindeki makrofajlarda/mikroglialarda ifade edildiğini gözlemledik. LPS verilen makrofajlarda anlamlı bir şekilde ifadesinin daha fazla olduğunu gözlemledik. Literatürde MSS'de EphA7 ile ilgili az bilgi bulunmaktadır. Bizim makrofaj/mikroglialarda EphA7 ifadesini göstermiş olmamız literatüre yeni bir bilgi kazandırmıştır. Ancak MS lezyonlarında makrofajlarda EphA7 ifadesini gözlemlemişler. Literatürde insan MS lezyonlarında EphA7'nin ifadesini makrofajlarda, reaktif astrositlerde, inflamatuvar hücrelerde, lezyon yakınındaki aksonlarda ve aktif-inaktif akson lezyonlarında görülmüştür ama sağlıklı insan beyinlerinin mikroglia/makrofajlarında EphA7 görülmemiştir (86, 92). Sobel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın aksine bizim EphA7'nin mikroglia/makrofajlarda ifade olduğunu bulmuş olmamız insan ve fare beyin



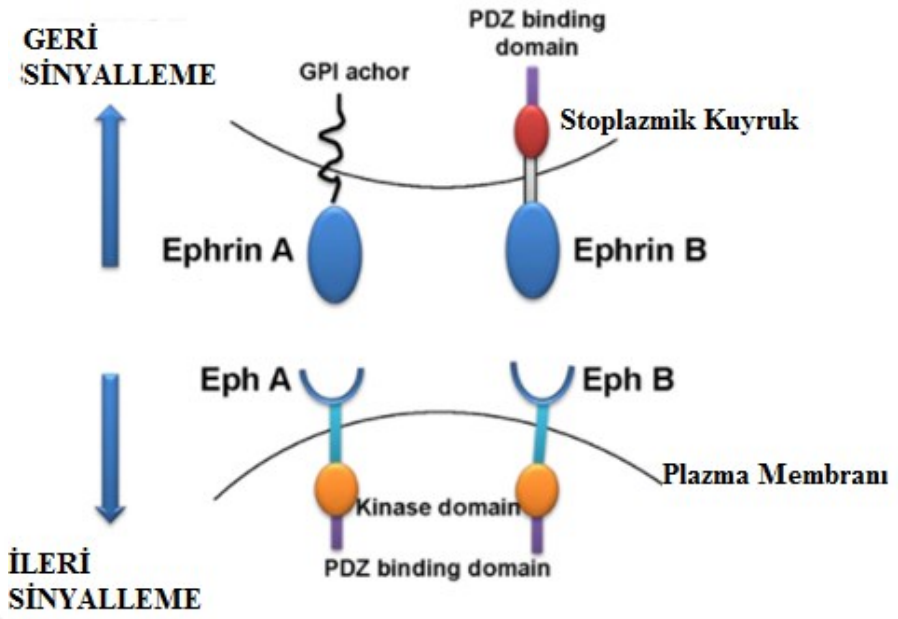
dokuları arasındaki farklılıktan olabilir. Ayrıca biz fiksasyondan hemen sonra alınmış vibratom kesitlerinde flüoresan boyama yapmamıza karşın onlar parafin kesitlerinde immünoperoksidaz boyaması yapmışlardır. Bu gibi protokollerdeki farklılıklar da sonuçlardaki farkı açıklayabilir. Amacımız EphA7 ifade eden mikroglia/makrofajların bulunup bulunmadığını tanımlamak olduğu için EphA7 ifade eden hücrelerin popülasyondaki oranına bakmadık. İstatiksel olmayan gözlemimiz sağlıklı fare beyinde mikroglia/makrofajların küçük ama önemli bir kısmının EphA7 pozitif olduğu yönündedir.

EphA7 reseptörünün etkileşim halinde olduğu bilinen efrinA1, A3, A4 ve A5 ligandlarının hem tek tip hücre kültüründe hem de sağlıklı fare beyin kesitlerinde oligodendrositlerde ifadesinin olduğunu gözlemledik. Literatürde efrinA5'in plp-GFP ile işaretlenmiş oligodendrositlerde ifadesi görülürken diğer efrin ligandlarının oligodendrositlerde ifadesine bakılmamıştır (86, 98). Çalışmamızda efrinA2 ligandının ifadesine bakılmamasının sebebi elimizdeki diğer antikorlarla beraber boyanabilecek uygun bir antikorun bulunamamasıydı.

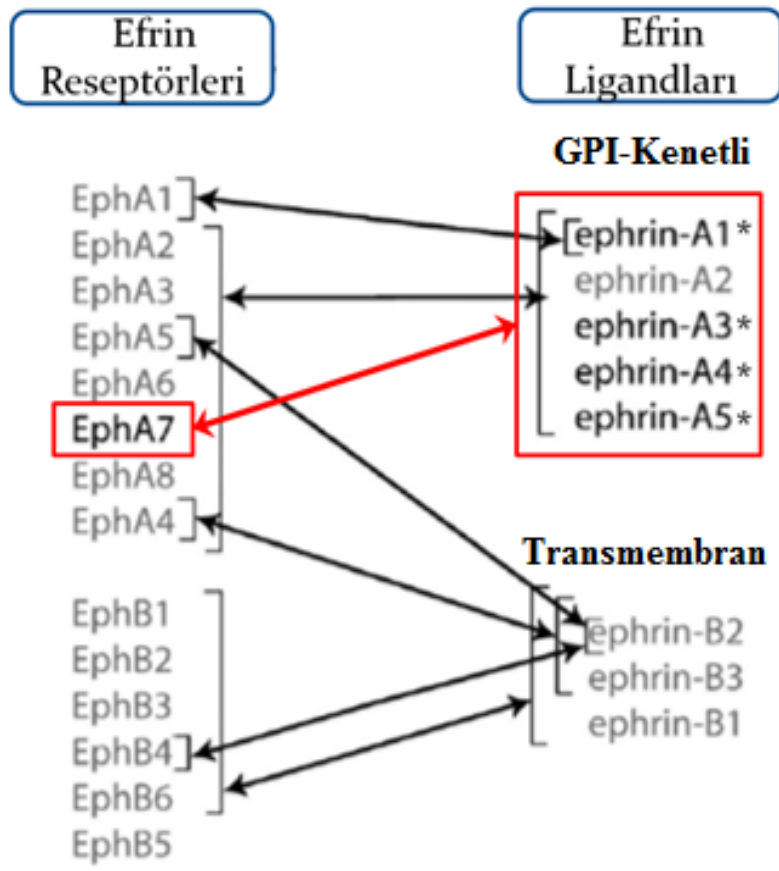
Ayrıca efrin ligandlarının makrofaj hücre kültüründe ifade edilip edilmediğine baktık. Sonuçlarımıza göre efrinA1, A3, A4 ve A5'in bazı makrofaj hücrelerinde ifade olduğunu gözlemledik. Aynı hücre yüzeyi üzerinde bulunan efrin reseptörleri ve ligandları arasındaki etkileşimler, iki yönlü sinyallemeyle susturmak için bir mekanizmayı temsil ettiği düşünülüyor (99). Literatür çalışmalarında ise efrinA1'in kontrol ve normal görünümlü MS dokusunda mikroglialarda ifade olduğunu gözlemlenirken (86), diğer ligandların ifadeleri gözlemlenmemiştir. Ancak MS lezyonlarında efrinA1, A2, A3 ve A4'ün ifadesinin makrofajlarda ifade olduğu fakat A5'in olmadığı gözlemlenmiştir (86). Önceki çalışmalarda, efrin ligandlarından sadece efrinA5 ligandının oligodendrositlerde ifadesi gözlemlenmiştir. Diğer ligandların sağlıklı kontrollerde bakılmaması ancak bizim bunu bulmamız literatüre yeni bir bilgi kazandırmıştır. Aynı zamanda MS gibi kompleks bir hastalıkta de/remiyelinizasyon sırasında oligodendrosit ve makrofaj/mikroglia etkileşimini doğrular niteliktedir.

Oligodendrosit ve makrofajlarda efrin ligandlarının ifadesi incelendikten sonra bir başka glia hücresi olan astrositlerde bu ligandların ifade olup olmadığını inceledik. Sonuçlarımıza göre sağlıklı fare beyin kesitlerinde astrositlerde efrinA1, A3, A4 ve A5 ligandlarının ifadesini gözlemledik. Literatüre bakıldığında ise, MS lezyonlarında efrinA1, A2 ve A3'ün reaktif astrositlerde ifade edildiği gözlemlenirken efrinA4 ve A5'in ifade edilmediği gözlemlenmiştir (86). Sonuçlarımızda sağlıklı fare beyinlerinde efrinA1, A3, A4 ve A5'in astrositlerde ifade edildiğini göstermemiz literatüre yeni bir bilgi kazandırmıştır. EphA7 reseptörünün makrofaj/mikroglialarda ifade olduğunu ve efrin ligandlarının oligodendrosit ve astrositlerde ifade olduğunu boyama sonucuyla gösterdik.

Membrana bağlı tirozin kinaz sinyal protein ailesinin büyük bir üyesi olan efrinler, tamamlayıcı reseptörleri olan ligandlarla etkileşim halindedirler (Şekil 6.2.2.) (96, 97). 10 efrin A reseptörü, 6 efrin B reseptörüne karşılık 6 efrin A ligandı ve 3 efrin B ligandı bulunmaktadır (Şekil 7.2). Efrin A reseptörleri glikozilfosfatidilinositol bağlı efrin A ligandlarına bağlanırken, efrin B reseptörleri transmembran efrin B ligandlarına bağlanır (Şekil 7.1). Efrin reseptör/efrin ligandı bağlanması çift yönlü olarak sinyal yollarını etkileyebilmektedir (Şekil 7.1). Efrin reseptör/ligand bağlanma kompleksleri özellikle embriyolojik dönemde nörogenezde (akson yönlendirilmesinde, sinaps bağlantılarında, nöral plastisitede, nöron-nöron ve nöron/akson-glia iletişimde, akson büyümesinin kontrolünde), vasküler ve bağışıklık sistemlerinde düzenleyici (T-hücrelerinin olgunlaşmasında, göçünde ve trafiğinde, T-hücre reseptörü yanıtlarında ve sinyallerinin düzenlenmesinde) ve hücre organizasyonunun düzenlenmesinde, devamlılığında, korunmasında ve biçimlenmesinde (hücre göçü, çoğalması ve farklılaşmasında) biyolojik görevlere sahiptir (99). Efrin reseptör-ligand etkileşimleri hücre şekillenmesinde, adezyonunda ve hareketinde hem normal süreçte hem de patolojik süreçte önemlidir (90, 91, 100, 101). Efrin reseptör/ligand etkileşimlerinin doku yaralanması sonrasında iyileşmede, optik sinir ve spinal kord yaralanması sonrasında, yetişkin beyin rahatsızlıklarında (şizofreni gibi), inflamasyonda (vasküler endotelyumda), retinovasküler rahatsızlıklarda rolleri olduğu gözlemlenmiştir (92).



Şekil 7.1.: Epha7 Reseptörünün ve Ligandlarının Gösterimi (92)



Şekil 7.2.: Epha7 Reseptörünün Bağlandığı Ligandları (92)

Efrin reseptör/ligand bağlanma kompleksi hem A ve B aileleri arasında hem de kendi içinde çoklu bağlanma kompleksi oluşturmaktadır. EfrinA5 ligandı efrinB2 reseptörüne bağlanır ve reseptör kümelenmesine, otofosforilasyona ve aşağı yönde sinyalin başlatılmasına yol açarak sinyalizasyonu aktive eder ve nörit retraksiyonunu indükler. Efrin reseptörleri ve efrin-B proteinlerinin karşılıklı ifadelerinin önemli bir rolü, hücre sınırlarında itilme ve çekilmelerin kontrolüdür: bu da hücrelerin veya aksonların uygunsuz bölgelere girmesini engeller. Sinir sisteminde, bu mekanizma, arka beyin segmentlerinin organizasyonunda ve göç eden nöral krest hücrelerinin ve nöronal büyüme konilerinin yönlendirilmesinde etkilidir (102, 103).

Efrin reseptörleri ve efrin ligandlarının boşluk kavşakları (gap junctions), hücre proliferasyonu ve hücre ölümü yoluyla diğer hücrel tepkileri düzenlemede rolleri ortaya çıkmaktadır. Efrin reseptör aktivasyonunun aşağı yönde regülasyonunda bulunan birkaç bileşen, itmenin altında yatan aktin hücre iskeletinin lokal depolimerizasyonunu kontrol eden yolaklarda yer almaktadır. Efrin reseptörleri ayrıca ECM'de hücre bağlanmasında bulunan integrinlerin fonksiyonunu aşağı yönde düzenlerken, diğer bağlamlarda integrin aracılı adezyonu yukarı doğru düzenleyebilirler. Ayrıca, efrin-A ligandlarının aktivasyonu integrin fonksiyonunu yukarı yönde düzenlemektedir (102, 103). EfrinA1 ligandının EphA2 reseptörünün aktivasyonu yoluyla fokal adezyon kinaz (FAK) ve p130 (cas) bağımlı bir şekilde fibroblastlardaki hücre adezyonunu ve aktin hücre iskeletindeki değişiklikleri aktive edebileceği gösterilmiştir (100).

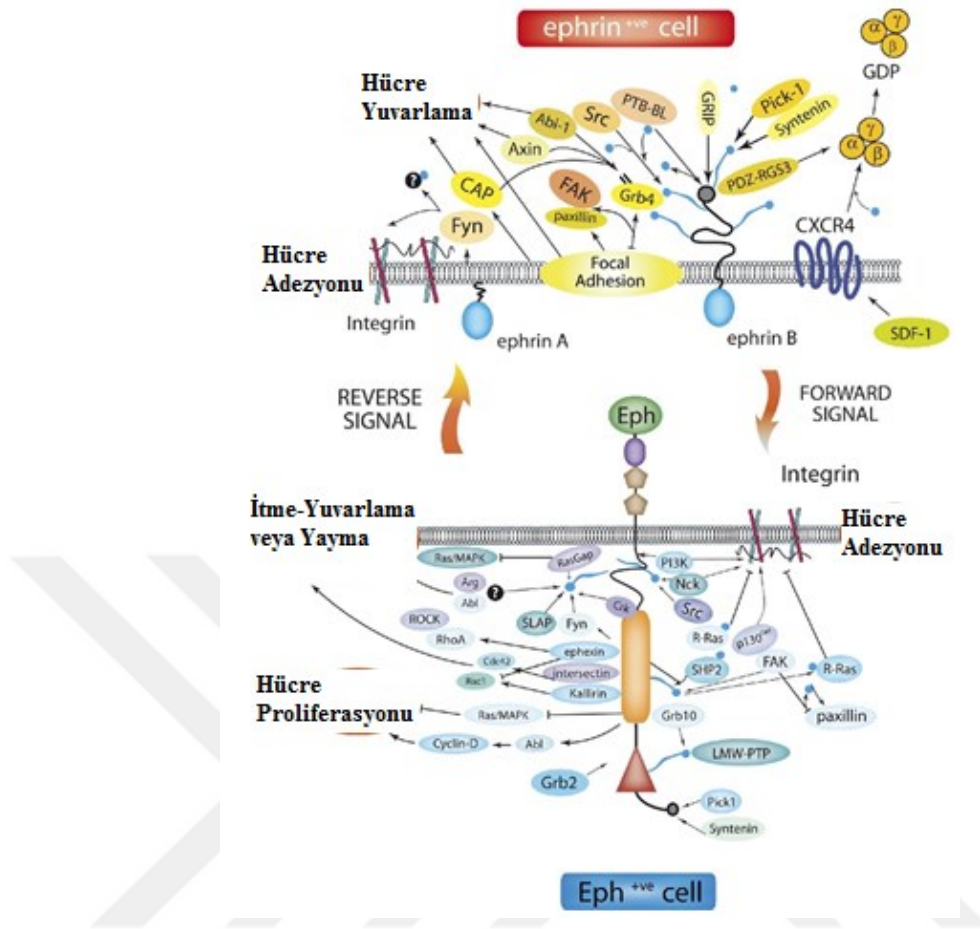
Efrin reseptör ve ligandlarının ifadeleri birçok homeobox genini içeren çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Nüklear  $\beta$ -katenin tarafından aktive edilen transkripsiyon faktör Tcf-4 (Şekil 7.3) efrin reseptörlerinin ifadelerini yukarı yönde düzenlerken aynı anda ligandları aşağı yönde düzenlemektedir. Bu sayede intestinal epitelyumda farklılaşmış hücrelere karşı proliferatif ayrımı yapan efrinB reseptör-ligand ifadelerini düzenlemektedir. Kaderin aracılı hücre-hücre adezyonu ve Notch/Delta sinyal yolağı da efrin reseptörü ifadesini düzenleyebildiği düşünülmektedir. Efrin reseptör ve ligandları nöromüsküler kavşakları ve merkezi sinapsların gelişimini ve fonksiyonunu düzenlemektedir. Sinaptogenez sırasında, efrin reseptörleri, küçük GTP'azların Rho ailesi aracılığıyla (Şekil 7.3.) aktin hücre iskeletine sinyal ileterek postsinaptik özelleşmenin kurulmasına ve modifiye edilmesine yardımcı olmaktadır. EfrinB reseptörleri ayrıca bir Src-ailesi kinaz yoluyla (Şekil 7.3.) N-metil-D- Aspartat (NMDA)-reseptör aracılı kalsiyum akışını modüle etmektedir ve sinaptik iletim üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabileceği öngörülmektedir. EphA/efrin-A

sinyalleri, olgun hipokampüste uyarıcı sinapsların morfolojisini düzenleyen glial hücreler ve nöronlar arasındaki bir karşılıklı konuşma şekline aracılık etmektedir. Böylece hem EphA hem de EphB reseptörleri sinapsların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini düzenleyebilmekte ve muhtemelen öğrenme ve hafıza oluşumu dahil olmak üzere bilişsel süreçlere katılabileceği düşünülmektedir. EfrinB reseptör ve ligandları arteriyel ve venöz endotelyumda kritik rol oynamakta ve nöro-arteriyel etkileşiminde aracılık etmektedir. Vasküler ağın oluşumunda etkili olduğu için kanserde anjiyogenik süreçleri düzenlediği tahmin edilmektedir (91, 92, 101, 104).

**Efrin reseptör sinyal mekanizmaları;** Efeksin, Abl ve bunların aktin iskelet düzenlenmesindeki rolleri görülmektedir. Ayrıca ekstraselüler-sinyal-düzenleyen kinaz/mitojen-aktive eden protein kinaz (ERK/MAPK) yolağının negatif düzenleyici etkisi ve integrin hücre-substrat etkileşimi yoluyla hücre adezyonunun düzenleyici etkisi görülmektedir (Şekil 7.3.) (92, 101, 104).

**Efrin ligandlarının sinyal mekanizmaları;** EfrinB fosforilasyonun pozitif düzenleyicisi olarak Src kinaz ailesi (SFK), efrinB membran kümelerine PDZ-domain-içeren protein-tirozin fosfataz (PTP-BL) alımı, efrinB ligandlarının aşağı yönlü bir efektörü olarak SH2-SH3 domain adaptör protein Grb4 ve efrinB ligandları tarafından sitoplazmik protein PDZ-RGS3 aracılığıyla fosforilasyondan bağımsız sinyalizasyonu sağlayan mekanizmalar söz konusudur (Şekil 7.3.) (92, 101, 104).

EphA4'ün aracılık ettiği kortikospinal trakt oluşumunda kinaz bağımlı fonksiyonlar ve iç kulakta sıvı homeostazının düzenlenmesinde EphB2 ileri sinyalizasyonu reseptör aracılı sinyalizasyona bağlı fonksiyonlardır. Omurgalıların arka beyin parçaları arasındaki sınırların oluşturulması ve embriyonik vaskülatürün yeniden modellenmesi efrinB sitoplazmik domaini gerektiren fonksiyonlardır. EfrinB sitoplazmik domain gerektirmeyen fonksiyonlar ise; nöral-krest-hücre göçüdür ve bunun yerine muhtemelen efrin reseptörlerinin ileri sinyalleşmesinin aracılık ettiği düşünülmektedir (91, 101).



Şekil 7.3.: Efrin Reseptör/Ligand Etkileşimindeki Bazı Sinyal Mekanizmaları (92)

EfrinA1 ligandının sitümülasyonunun ardından kinaz-bağımsız EphA2 reseptörünün, monosit/makrofaj hücrelerinde integrin ligand-kaplı yüzeylere yapışmanın yanında hücre yayılmasını/uzamasını tetiklediği gözlemlenmiştir (105). İnsan T hücrelerinde, efrinA1 ve efrinA3 ligandlarının takibinde EphA4 aktivasyonunun fibronektin ve ICAM1 kaplı yüzeylere  $\beta 1$  ve  $\beta 2$  integrin yapışmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (106). EfrinA1 kaynaklı EphA4 ileri sinyalizasyonu, RhoA'nın aktivasyonu yoluyla endotelial hücrelere monosit yapışmasını aktin hücre iskeleti düzenlemesiyle teşvik etmektedir (107). EfrinA5 ligandı hücre yapışmasını düzenlerken oligodendrosit farklılaşmasında da etkili olan Fyn kinaza ihtiyaç duymaktadır (108, 109). Oligodendrosit/miyelindeki efrinA ligandlarının göç etme, yapışma ve yayılmayı tetikleyerek monosit/makrofaj hücrelerindeki EphA7 reseptörünü pozitif veya negatif bir yönde etkileme durumu söz konusu olabilmektedir. Bu yolla monosit/makrofaj aktive olarak pozitif veya negatif bir

sinyal oluşturup oligodendrositleri etkileyebilmektedir. Bu sinyalizasyonla makrofajlar oligodendrositleri öldürebilir veya koruyabilir. Sonuçlarımızı bu bilgiler ışığında değerlendirince, efrinA ligandlarının oligodendrositlerde ifade edilmesinin ardından EphA reseptörlerini bulunduran makrofaj/mikroglia hücrelerinin sinyalizasyonu olarak ifade olması, oligodendrositleri integrinler üzerinden etkileyerek göç etmeye ve makrofaj-oligodendrosit hücrelerinin temas kurmasına neden olabileceğini söyleyebiliriz. Ayrıca EphA7 ifadesinin MS hastalarında makrofaj/mikroglia hücrelerinde artması ve hem sonuçlarımızda hem de literatür verilerinde bu reseptörün ve efrinA1, A3 ve A4 ligandlarının ekspresyonunu görmemiz hastalık sırasında EphA7 reseptörünün oligodendrositlerdeki efrinA ligandlarıyla etkileşim için gerekli olduğunu düşündürmektedir. EfrinA ligandlarının reseptörlerle beraber makrofaj/mikroglialarda ifade olması ise sinyalizasyonu durdurmak için reseptör-ligand etkileşimine ihtiyaç duyabileceğini düşündürmektedir.

Retinal gangliyon hücrelerin aksonlarında ifade edilen EphA ve EphB reseptörlerinin oligodendrosit progenitör hücrelerin (OPC) yüzeyindeki efrinlerle etkileşim kurduğunu gösterilmiştir. EfrinA5, B2 ve B3 ligandlarının ifadesini optik sinirlerin göç eden OPC'lerinde gözlemlenmiştir (98). EphB2 ve efrinB2 proteinlerinin optik sinir hücrelerinde ifadesinin yüksekliği retinal gangliyon hücrelerde akson kaybı ile karakterizedir. EphA4 proteinlerinin de ifadesi optik sinirlerde gözlemlenmektedir. Makrofajların farklı alt grupları olan hücrelerde ve makrofaj-benzeri hücrelerde EphB2 reseptörü ifade edilmektedir. Ayrıca EfrinB2 ligandını mikroglia ve astrosit hücrelerinin ifade ettiği gözlemlenmiştir. EphA4 reseptörünün ifadesi ise astrositlerde gözlemlenmiştir. EphB2 ve efrinB2 proteinlerinin optik sinirlerde retinal gangliyon hücrelerin aksonlarında bağlandıkları gözlemlenmiştir (110). Göç eden OPC'lerdeki bazı efrinA ve efrinB ligandlarının ifadesinin söz konusu olması ve aksonlardaki EphA ve EphB reseptörlerinin OPC'lerdeki efrin ligandlarıyla etkileşime girmesi MS sırasında remiyelinizasyona giden olgun oligodendrositleri engellemek için olabilir veya MS'te demiyelinizasyon sürecinde aksonu parçalamak için bir hamle olabilir. Ayrıca makrofajların alt gruplarında efrin reseptör/ligandlarının ifade edilmesi makrofajların aksonları veya oligodendrosit/miyelini yok etmek için bir aktive olma durumu olabilir. Astrositlere baktığımızda hem sonuçlarımıza göre hem literatür verilerine göre, efrinA ve B ligandlarını eksprese etmesi ayrıca literatürde MS'de EphA7 ve bazı reseptörleri ifade etmesi de MS'de inflamasyonda sinyalizasyonun başlamasında

makrofaj/mikrogliaadaki reseptör ile astrositlerdeki ligandların etkileşmesi söz konusu olabilir. Sinyalizasyonu kesmek için ise astrositlerde bulunan reseptör ve ligandların etkileşimi söz konusu olabilir.

Sonuçlarımız özgün olan yöntemimizin hipotezimizi destekler nitelikte çalıştığını gösterdi. Bu yöntem genel olduğundan dolayı herhangi bir hücre-hücre etkileşimlerine uygulanabilir. Sonuç olarak bu yöntem, hücre-hücre etkileşimlerine dayanan diğer hastalıklarda moleküler yolları tanımlamak için kullanılabilir ve bu hastalıkların daha etkin bir şekilde teşhis edilmesine ve ayrıca ilaç tedavilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Bu tez çalışmasının devamında MS'nin EAE modelinde hem EphA7 hem de efrin ligandlarının ifade durumuna bakılarak hasta ve sağlıklı farelerdeki ifade farkını görmek ve ilaç düzeyinde denemelere başlamayı öngörmekteyiz. Ayrıca MS hastası kanlarından izole edilen makrofaj öncülü olan monositlerin EphA7 boyamasını kontrol EphA7 boyamalarıyla akış sitometri akımında bakarak farklı bir yol izlemeye başladık. Buradan edinilen bilgiye göre veya bu hücrelerin PCR sonuçlarına göre ifade seviyeleri ile ilgili daha detaylı bilgilere ulaşmış olacağız.



## 8. KAYNAKLAR

1. J.A. B (2003) Molecular structure of the myelin membran; Multiple sclerosis: immunology, pathology, and pathophysiology. *Demos Medical Publishing*:31-50.
2. Zalc B (2016) The acquisition of myelin: An evolutionary perspective. *Brain research* 1641(Pt A):4-10.
3. Mason JL, Langaman C, Morell P, Suzuki K, & Matsushima GK (2001) Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathology and applied neurobiology* 27(1):50-58.
4. Gadoth N (2003) Multiple sclerosis in children. *Brain Dev* 25(4):229-232.
5. Halpert E (2000) On lying and the lie of a toddler. *The Psychoanalytic quarterly* 69(4):659-675.
6. Polat C, Tulek Z, Kurtuncu M, & Eraksoy M (2017) Validity and Reliability of the Turkish Version of the Monitoring My Multiple Sclerosis Scale. *Noro psikiyatri arsivi* 54(2):131-136.
7. Tanriverdi D, Okanlı A, Sezgin S, & Ekinci M (2010) Quality of life in patients with multiple sclerosis in Turkey: relationship to depression and fatigue. *The Journal of neuroscience nursing : journal of the American Association of Neuroscience Nurses* 42(5):267-273.
8. Wynn DR, Rodriguez M, O'Fallon WM, & Kurland LT (1990) A reappraisal of the epidemiology of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota. *Neurology* 40(5):780-786.
9. Weinschenker BG, *et al.* (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 112 ( Pt 6):1419-1428.
10. Lublin FD, Reingold, S.C. (2003) *Clinical Features and Subtypes of Multiple Sclerosis. In: Multiple Sclerosis 2* (Blue Books of Practical Neurology, Butterworth Heinemann. USA).
11. Murray TJ (2006) Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Bmj* 332(7540):525-527.
12. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, & Miller SD (2014) The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handbook of clinical neurology* 122:173-189.
13. Slomianny MC, *et al.* (2006) Profiling of membrane proteins from human macrophages: comparison of two approaches. *Proteomics* 6(8):2365-2375.
14. Han MH, *et al.* (2012) Janus-like opposing roles of CD47 in autoimmune brain inflammation in humans and mice. *J Exp Med* 209(7):1325-1334.
15. de Monasterio-Schrader P, *et al.* (2012) Systematic approaches to central nervous system myelin. *Cell Mol Life Sci* 69(17):2879-2894.
16. Ishii A, *et al.* (2009) Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14605-14610.
17. Iwata K, *et al.* (2013) The human oligodendrocyte proteome. *Proteomics* 13(23-24):3548-3553.
18. Cusick ME, Klitgord N, Vidal M, & Hill DE (2005) Interactome: gateway into systems biology. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R171-181.
19. Aggarwal S, Yurlova L, & Simons M (2011) Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in cell biology* 21(10):585-593.
20. JA. B (2003) *Molecular structure of the myelin membrane; Multiple sclerosis: immunology, pathology, and pathophysiology.* (Demos Medical Publishing, New York).
21. Edgar JM & Garbern J (2004) The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *Journal of neuroscience research* 76(5):593-598.
22. Kerman BE, *et al.* (2015) In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development* 142(12):2213-2225.
23. R S (2003) *Morphology of oligodendrocytes and myelin; Multiple sclerosis: immunology, pathology, and pathophysiology.* (Demos Medical Publishing, New York).
24. Halper J (2000) The Evolution of Nursing Care in Multiple Sclerosis. *International Journal of MS Care* 64:16-22.

25. Polat C (2017) Multipl Skleroz İzlem Ölçeği Türkçe Formu'nun Geçerlik ve Güvenirlik Çalışması. *Arch Neuropsychiatr* 2017.
26. Tanrverdi DO, Ayşei; Sezgin, Serap; Ekinci, Mine (2010) Quality of Life in Patients With Multiple Sclerosis in Turkey: Relationship to Depression and Fatigue. *Journal of Neuroscience Nursing* 42(5):267-273.
27. Clanet M (2008) Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893. *Int MS J* 15(2):59-61.
28. Weinshenker BG, *et al.* (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 ( Pt 1):133-146.
29. Runmarker B & Andersen O (1993) Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 116 ( Pt 1):117-134.
30. Confavreux C, Vukusic S, & Adeleine P (2003) Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 126(Pt 4):770-782.
31. Pittock SJ, *et al.* (2004) Disability profile of MS did not change over 10 years in a population-based prevalence cohort. *Neurology* 62(4):601-606.
32. Confavreux C & Vukusic S (2006) Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 129(Pt 3):606-616.
33. Tremlett H, Paty D, & Devonshire V (2006) Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurology* 66(2):172-177.
34. Tremlett H, Yinshan Z, & Devonshire V (2008) Natural history of secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 14(3):314-324.
35. Häggström M (2009) Main symptoms of Multiple sclerosis.
36. Kantarci OH (2008) Genetics and natural history of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 28(1):7-16.
37. Cordova J, Vargas S, & Sotelo J (2007) Western and Asian features of multiple sclerosis in Mexican Mestizos. *Clin Neurol Neurosurg* 109(2):146-151.
38. Engell T (1989) A clinical patho-anatomical study of clinically silent multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 79(5):428-430.
39. Qiu W WJ, Castley A, James I, Joseph J, Christiansen FT, Carroll WM, Mastaglia FL, Kermod AG (2010) Clinical profile and HLA-DRB1 genotype of late onset multiple sclerosis in Western Australia. *J Clin Neurosci*.
40. Liguori M, *et al.* (2000) Age at onset in multiple sclerosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 21(4 Suppl 2):S825-829.
41. Milo R & Kahana E (2010) Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 9(5):A387-394.
42. Andreoli ET, Carpenter, C.J., Griggs, R.C., Benjamin, J.I. (2008) *Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine*. (Adana: Nobel Tıp Kitabevleri) 7th Ed pp 1137-1139.
43. Didonna A & Oksenberg JR (2017) The Genetics of Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis*, eds Zagon IS & McLaughlin PJ(Brisbane (AU)).
44. Ascherio A & Munger K (2008) Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Semin Neurol* 28(1):17-28.
45. Kantarci O, *et al.* (1998) Survival and predictors of disability in Turkish MS patients. Turkish Multiple Sclerosis Study Group (TUMSSG). *Neurology* 51(3):765-772.
46. Eraksoy M, *et al.* (2003) A genome screen for linkage disequilibrium in Turkish multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 143(1-2):129-132.
47. Baranzini SE, *et al.* (2010) Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature* 464(7293):1351-1356.
48. Marrie RA (2004) Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3(12):709-718.
49. Ascherio A, Munger KL, & Simon KC (2010) Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 9(6):599-612.
50. Magliozzi R, *et al.* (2007) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130(Pt 4):1089-1104.

51. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, & Ascherio A (2010) Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67(6):824-830.
52. Ramagopalan SV, *et al.* (2011) Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 70(6):881-886.
53. Loken-Amsrud KI, *et al.* (2012) Vitamin D and disease activity in multiple sclerosis before and during interferon-beta treatment. *Neurology* 79(3):267-273.
54. Stewart N, *et al.* (2012) Interferon-beta and serum 25-hydroxyvitamin D interact to modulate relapse risk in MS. *Neurology* 79(3):254-260.
55. Ascherio A & Marrie RA (2012) Vitamin D in MS: a vitamin for 4 seasons. *Neurology* 79(3):208-210.
56. Smolders J, *et al.* (2011) Efficacy of vitamin D3 as add-on therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis receiving subcutaneous interferon beta-1a: a Phase II, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Neurol Sci* 311(1-2):44-49.
57. Soilu-Hanninen M, *et al.* (2005) 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 11(3):266-271.
58. Smolders J, *et al.* (2009) The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 8(7):621-626.
59. Gilroy J (2002) *Temel Nöroloji* (Güneş Kitabevi, Ankara).
60. Madsen LS, *et al.* (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nature genetics* 23(3):343-347.
61. Sospedra M & Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 23:683-747.
62. Lucchinetti C, Bruck W, & Noseworthy J (2001) Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Current opinion in neurology* 14(3):259-269.
63. Bruck W, Kuhlmann T, & Stadelmann C (2003) Remyelination in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 206(2):181-185.
64. Charo IF & Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine* 354(6):610-621.
65. Andreoli ET, Carpenter, C.J., Griggs, R.C., Benjamin, J.I. (2008) *Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine* (Nobel Tip Kitabevi, Adana) 7th Ed.
66. Herndon RM (2000) Interferons in the treatment of multiple sclerosis: errors and misrepresentations. *Archives of neurology* 57(3):426-427.
67. Smith KJ (2002) *Neurophysiology of Inflammatory Demyelinating Disease* (Brain Disease).
68. Compston A (2004) The pathogenesis and basis for treatment in multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery* 106(3):246-248.
69. R. R (2004) *Color Atlas of Neurology* (Georg Thieme Verlag, Neurological Clinic, Nordwest-Krankenhaus Sanderbusch Sande, Germany ) 2nd Ed.
70. Gold SM & Irwin MR (2006) Depression and immunity: inflammation and depressive symptoms in multiple sclerosis. *Neurol Clin* 24(3):507-519.
71. Birnbaum GL (2013) *Multiple sclerosis: Clinician's guide to diagnosis and treatment* (New York: Oxford University Press) 2nd Ed.
72. Miller L, Mattison P, Paul L, & Wood L (2007) The effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on spasticity in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 13(4):527-533.
73. Miller AE LF, Coyle, PK. (2001) Multiple Sclerosis in clinical practice ed Cook SDMartin Dunitz, London), pp 103-129.
74. Miller A (2003) Clinical features. *Handbook of multiple sclerosis*, ed Cook SMarcel Dekker inc New York), pp 213-233.
75. Lublin FD & Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46(4):907-911.
76. Grigoriadis N, van Pesch V, & Paradig MSG (2015) A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European journal of neurology* 22 Suppl 2:3-13.
77. Polman CH, *et al.* (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 69(2):292-302.

78. Schumacher GA, *et al.* (1965) Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 122:552-568.
79. Eligini S, *et al.* (2015) Data for proteomic analysis of Human monocyte-derived macrophages. *Data Brief* 4:177-179.
80. Dupont A, *et al.* (2004) Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome. *Proteomics* 4(6):1761-1778.
81. Kino JSaY (2015) Expression profiles of RNA-Seq-based grey matter-specific genes versus white matter-specific genes in grey matter lesions of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 6(3):289–298.
82. Padden M, *et al.* (2007) Differences in expression of junctional adhesion molecule-A and beta-catenin in multiple sclerosis brain tissue: increasing evidence for the role of tight junction pathology. *Acta Neuropathol* 113(2):177-186.
83. Kemppinen AK, Kaprio J, Palotie A, & Saarela J (2011) Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open* 1(1):e000053.
84. Rueden CT, *et al.* (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18(1):529.
85. J.Newman ME (2005) A measure of betweenness centrality based on random walks. *Social Networks* 27(1):39-54.
86. Sobel RA (2005) Ephrin A receptors and ligands in lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 15(1):35-45.
87. Sfagos C, *et al.* (2005) Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 11(3):272-275.
88. Singh MK, *et al.* (2007) Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients undergoing beta-interferon therapy. *J Neurol Sci* 258(1-2):52-59.
89. Mycko MP, Brosnan CF, Raine CS, Fendler W, & Selmaj KW (2012) Transcriptional profiling of microdissected areas of active multiple sclerosis lesions reveals activation of heat shock protein genes. *J Neurosci Res* 90(10):1941-1948.
90. Holland SJ, Peles E, Pawson T, & Schlessinger J (1998) Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Curr Opin Neurobiol* 8(1):117-127.
91. Kullander K & Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7):475-486.
92. Coulthard MG, *et al.* (2012) Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. *Am J Pathol* 181(5):1493-1503.
93. Pagani M, *et al.* (2015) Reference proteome of highly purified human Th1 cells reveals strong effects on metabolism and protein ubiquitination upon differentiation. *Proteomics* 15(21):3644-3647.
94. Graessel A, *et al.* (2015) A Combined Omics Approach to Generate the Surface Atlas of Human Naive CD4+ T Cells during Early T-Cell Receptor Activation. *Mol Cell Proteomics* 14(8):2085-2102.
95. Mitchell CJ, *et al.* (2015) A multi-omic analysis of human naive CD4+ T cells. *BMC Syst Biol* 9:75.
96. Davis S, *et al.* (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266(5186):816-819.
97. Himanen JP & Nikolov DB (2003) Eph receptors and ephrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(2):130-134.
98. Prestoz L, *et al.* (2004) Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph-ephrin interaction. *Neuron Glia Biol* 1(1):73-83.
99. Pasquale EB (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133(1):38-52.
100. Carter N, Nakamoto T, Hirai H, & Hunter T (2002) EphrinA1-induced cytoskeletal re-organization requires FAK and p130(cas). *Nat Cell Biol* 4(8):565-573.
101. Murai KK & Pasquale EB (2003) 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116(Pt 14):2823-2832.

102. Himanen JP, *et al.* (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7(5):501-509.
103. Wilkinson DG (2001) Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2(3):155-164.
104. Lisabeth EM, Falivelli G, & Pasquale EB (2013) Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(9).
105. Saeki N, Nishino S, Shimizu T, & Ogawa K (2015) EphA2 promotes cell adhesion and spreading of monocyte and monocyte/macrophage cell lines on integrin ligand-coated surfaces. *Cell Adh Migr* 9(6):469-482.
106. Sharfe N, *et al.* (2008) EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol* 45(5):1208-1220.
107. Jellinghaus S, *et al.* (2013) Ephrin-A1/EphA4-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1833(10):2201-2211.
108. Osterhout DJ, Wolven A, Wolf RM, Resh MD, & Chao MV (1999) Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 145(6):1209-1218.
109. Davy A, *et al.* (1999) Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev* 13(23):3125-3135.
110. Du J, Tran T, Fu C, & Sretavan DW (2007) Upregulation of EphB2 and ephrin-B2 at the optic nerve head of DBA/2J glaucomatous mice coincides with axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(12):5567-5581.

## 9.ETİK KURULU ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.6806  
Konu : Etik Kurulu Kararı

26/02/2018

Sayın Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Miyelin İnteraktomu: İkili Graf Tabanlı Protein-Protein Etkileşimli Ağlarla Multipl Sklerozda Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Tanımlanması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 26.02.2018 tarihinde e-imzalanmıştır.  
Evrakinizi <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 54BF50DBX1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi  
Kavacak Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/02/2018	07		Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

“Miyelin İnteraktomu: İkili Graf Tabanlı Protein-Protein Etkileşimli Ağlarla Multipl Sklerozda Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Tanımlanması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

## 10. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Eşref	<b>Soyadı</b>	Çelik
<b>Doğum Yeri</b>	Diyarbakır	<b>Uyruğu</b>	TC

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi	2018
<b>Lisans</b>	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2015

### İş Deneyimi

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl)</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	Orta	Orta

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES-2014</b>	86	70	85
<b>YÖKDİL-2018</b>	82.5		



## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Ms Office	Çok iyi
Fiji İmageJ	Orta
IBM SPSS	Orta

## Sertifikalar

Sertifika	Kurum	Yıl
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	İstanbul Medipol Üniversitesi	2015

## Yayınlar

Türü	Yazarlar	Başlık	Yayın Yeri
Derleme	Fatmagül İlayda Aydınli, <b>Eşref Çelik</b> , Burcu Kurt Vatandaşlar, Bilal E. Kerman	Myelin disorders and stem cells: as therapies and models	Turk J Biol (2016) 40: 1068-1080
Yayın	Defne Gümüş, Fatma Kalaycı-Yüksek, Emre Yörük, Gülşen Uz, <b>Eşref Çelik</b> , Cansu Arslan, Elif Merve Aydın, Cem Canlı, Mine Anđ-Küçüker	The possible effects of different antibiotics on expression levels of usp, sfa/foc and cnf1 genes in a Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strain	FEMS 2017 7th Congress Of European Microbiologists (2017) July 9-13

Poster	<p><b>1.</b> İlknur Coban, Fulya Köksalar, <b>Esref Celik</b>, Nilufer Sayar, Deniz Atasoy</p>	<p><b>1.</b> Investigation Of A Hindbrain→Hypothalms Catecholaminergic Circuit For Feeding</p>	<p><b>1.</b>MolBioKong</p>
	<p><b>2.</b> Öykü Dinçkol, M.İkbal Alp, <b>Eşref Çelik</b>, Nilüfer Sayar Atasoy, Deniz Atasoy</p>	<p><b>2.</b> Role of Hypothalamic Agouti-Related Protein (AgRP) Neurons in Spatial Learning</p>	<p><b>2.</b>MolBioKong</p>
	<p><b>3.</b> Pelin Dilsiz, Fulya Köksalar, Merve Öncül, <b>Eşref Çelik</b>, Öykü Dinçkol, Utku Cebecioğlu, İlknur Çoban, Nilüfer Sayar Atasoy, Deniz Atasoy</p>	<p><b>3.</b> Melanin Concentrating Hormone neurons regulate homeostatic feeding and control hedonic drive</p>	<p><b>3.</b> MolBioKong</p>
	<p><b>4.</b> Utku Cebecioğlu, Özlem Mutlu, Fulya Köksalar, Pelin Dilsiz, Can Kiren, <b>Eşref Çelik</b>, Özge Başer, Yavuz Yavuz, Nilüfer Sayar Atasoy, Deniz Atasoy</p>	<p><b>4.</b> Morphological and physiological characterization of cholinergic neurons in arcuate nucleus of the hypothalamus</p>	<p><b>4.</b> MolBioKong</p>
	<p><b>5.</b> Defne Gümüş, Fatma Kalaycı-Yüksek, Emre Yörük, Gülşen Uz, <b>Eşref Çelik</b>, Cansu Arslan, Elif Merve Aydın, Cem Canlı, Mine Anđ-Küçüker</p>	<p><b>5.</b> The possible effects of different antibiotics on expression levels of usp, sfa/foc and cnf1 genes in a Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strain</p>	<p><b>5.</b> FEMS 2017 7th Congress Of European Microbiologists (2017) July 9-13</p>