



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BEYİN EKSTRASELLÜLER MATRİKSİNİN  
NÖRODEJENERASYONDAKİ ROLÜNÜN ALZHEİMER  
FARE MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA GÜREL

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. AHMET TARIK BAYKAL

İSTANBUL-2017

### TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Büşra GÜREL  
Tez Başlığı : Beyin Ekstrasellüler Matriksinin Nörodejenerasyondaki Rolünün Alzheimer's Fare Modelinde Araştırılması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 11.08.2017

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

#### Danışman

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

#### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

#### İmza

#### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Ramazan ŞEKEROĞLU

Sakarya Üniversitesi

Doç.Dr. Özge CAN

Acıbadem Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Mehmet OZANSOY

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..15../08../2017.. tarih ve ..2017../..24... - ..24.. sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesrin 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.

  
BÜŞRA GÜREL

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin (REMER) sağladığı üstün teknolojik araç gereç ve kimyasal malzemelerle yapılmıştır. Merkez'in Müdürü ve aynı zamanda Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı ve Danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e ve İkinci Danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a katkıları için, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıkları için,

BaykalLab'ın tüm üyelerine bana hem maddi hem manevi destek oldukları ve ekip ruhunu gerçek anlamıyla öğrenmeme vesile oldukları için,

Hem iyi hem kötü zamanlarımda yanımda olarak bana güç verdiği için dostum Esra Yalçın'a,

REMER bünyesinde çalışan arkadaşlarıma,

Her zaman koşulsuz sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim anneme, babama, ablalarıma,

Gecesi ve gündüzüyle, en az benim kadar yaptığı fedakarlıklar ile eğitim hayatımı destekleyen ve tamamlamamda çok büyük emeği olan, eşim Rıdvan Gürel'e varlığı için,

Teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>TEZ ONAYI</b> .....	i
<b>BEYAN</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ</b> .....	vii
<b>RESİM, ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ</b> .....	ix
<b>1.ÖZET</b> .....	1
<b>2.ABSTRACT</b> .....	2
<b>3.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4.GENEL BİLGİLER</b> .....	5
4.1. Alzheimer Hastalığı (AD) .....	5
4.1.1.Tarihçe ve Epidemiyoloji .....	5
4.1.2.Hastalığın Patolojisi .....	5
4.1.2.1. Amyloid Hipotezi .....	6
4.1.2.2. Tau İlişkili Hipotez .....	7
4.1.2.3. Diğer Hipotezler .....	9
4.2. Hipokampal CA1 bölgesi .....	9
4.3. Ekstaselüler Matriks (ECM) ve AD .....	10
4.4. Proteomik ve AD .....	11
<b>5. MATERYAL VE METOT</b> .....	12
5.1. Materyal .....	12
5.1.1. Ekipmanlar .....	12
5.1.2. Kimyasallar .....	14
5.2. Metot .....	17
5.2.1. Deney Hayvanları Üretimi ve Genotiplenmesi .....	17
5.2.1.1. DNA izolasyonu.....	17
5.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	17
5.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	18
5.2.1.4. Moleküler Yöntem ile Cinsiyet Tayini .....	19
5.2.2. Morris Su Labirenti Davranışsal Testi .....	20

5.2.3. İmmünohistokimya Analizi .....	21
5.2.4. Beyin Perfüze Örneğinin Toplanması .....	22
5.2.5. Ekstrasellüler Sıvının LC-MS/MS Analizi .....	22
5.2.6. ICP-MS ile Demir Miktarının Belirlenmesi .....	23
5.2.7. 2D-SDS-PAGE .....	23
5.2.8. Jel spotundan peptit örneği hazırlama .....	25
5.2.9. OxiBlot Analizi .....	25
5.2.10. Beyin Omurilik Sıvısı ve Post-mortem doku örneklerinin LC-MS/MS analizi .....	25
<b>6.BULGULAR</b> .....	27
6.1. Genotipleme ile transgenik hayvanların belirlenmesi .....	27
6.2. 3,6 ve 12 aylık farelerin MWM hafıza testi .....	28
6.3. 3,6 ve 12 aylık farelerin beyin kesitlerinin immünohistokimya boyaması .....	30
6.4. 3,6 ve 12 aylık farelerin ECM protein ekspresyon analizi .....	30
6.4.1. LC-MS/MS ile tanımlanan anlamlı proteinler .....	30
6.4.2. ECM proteomlarının PCA analizleri .....	36
6.4.3. ECM proteomlarına ait IPA analizleri .....	37
6.4.4. Ortak ve evreye özgü protein ve yolların belirlenmesi .....	39
6.5. 3 aylık hipokampal IL6 proteinin IHC analizi .....	39
6.6. 3 aylık hipokampal demir miktarının ICP-MS analizi .....	42
6.7. Fosfoproteom analizi .....	42
6.7.1. 2D-SDS-PAGE ile fosfoprotein farklılıklarının tespiti .....	42
6.7.2. Fosfoprotein spot tanımlamaları .....	43
6.8. Oxiblot ile okside olmuş protein farklılıklarının tespiti .....	46
6.9. İnsan beyin omurilik sıvısı (BOS) proteome analizi .....	46
6.9.1. BOS örneklerinde tanımlanan anlamlı proteinler .....	46
6.9.2. BOS proteomunun PCA analizi .....	53
6.9.3. BOS proteomunun IPA analizi .....	53
6.10. İnsan post-mortem doku örneklerinin proteome analizi .....	54
6.10.1. Post-mortem doku örneklerinde tanımlanan anlamlı proteinler ....	54

6.10.2. Post-mortem doku örneklerinin PCA analizi .....	63
6.10.3. Post-mortem doku örneklerinin IPA analizi .....	63
<b>7.TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	64
<b>8.KAYNAKLAR</b> .....	69
<b>9.EKLER</b> .....	78
<b>10.ETİK KURUL ONAYI</b> .....	93
<b>11.ÖZGEÇMİŞ</b> .....	95



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>Kısaltma</b>	<b>Açılımı</b>
5XFAD	5 mutasyonlu ailevi Alzheimer hastalığı fare modeli
A $\beta$	Amiloid beta
ABC	Amonyum bikarbonat
ACN	Asetonitril
AD	Alzheimer Hastalığı
ADAM	$\alpha$ -sekretazlar
APOE	ApolipoproteinE
APP	Amiloid prekürsör protein
BACE1	$\beta$ -sekretazlar
BEM	Beyin ekstraselüler matriksi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CA	Cornu ammonis
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CSPG	Kondrotin sülfat proteoglikan
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DTT	Dithiothreitol
DG	Dentat girus
EC	Entorinal korteks
ECL	Enhanced chemiluminensans
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Elektrospray iyonizasyon
FASP	Filtre destekli örnek hazırlama kiti
GSK-3 $\beta$	Glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$
HCl	Hidroklorür
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
IAA	İyodoasetamid
IDE	İnsülin degrade eden enzim



IEF	İzoelektrik Odaklama
IL	İnterlökin
IPA	Ingenuity Yolak Analizi
KCl	Potasyom klorür
LC	Sıvı kromatografisi
LM	Transgenik olmayan Littermate
LTD	Uzun dönemli depresyon
LTP	Uzun dönemli potansiyasyon
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MMP	Matriks metaloproteinaz
MS	Kütle spektrometrisi
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfat tampon salin
PCA	Principle component analysis
PFA	Paraformaldehit
PNN	Perinöronal ağ
PS1	Presenilin1
PSAPP	Presenilin-APP mutasyonlu Alzheimer fare modeli
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TOF	Time of flight
UPX	Universal protein extraction
VLDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein

---

## RESİM, ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ

### Resimler Listesi

<b>Resim 6.1.1:</b> Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin analizi .....	27
<b>Resim 6.1.2:</b> Transgeniklik ve cinsiyet analizi sonuçları .....	27
<b>Resim 6.3.1:</b> 3,6 ve 12 aylık hayvanlara ait Abeta proteinin IHC boyaması .....	30
<b>Resim 6.5.1:</b> Kontrol ve 5XFAD fareleri hipokampus ve korteksinde IL6 boyaması.....	41
<b>Resim 6.7.2.1:</b> 3,6 ve 12 aylık lizatlarının 2D-SDS-PAGE ile fosfoprotein tespiti .....	43
<b>Resim 6.7.2.2:</b> 3,6 ve 12 aylık lizatlarının 2D-SDS-PAGE ile fosfoprotein tespiti .....	44
<b>Resim 6.8.1:</b> 3,6 ve 12 aylık hipokampuste okside olmuş proteinler .....	46

### Şekiller Listesi

<b>Şekil 6.2.1:</b> Morris Su Tankı deneyi görüntüleri .....	28
<b>Şekil 6.2.2:</b> 3,6 ve 12 aylık hayvanların MWM test sonuçları .....	29
<b>Şekil 6.4.2.1:</b> 3 aylık ECM proteomlarına ait PCA analizi .....	36
<b>Şekil 6.4.2.2:</b> 6 aylık ECM proteomlarına ait PCA analizi .....	36
<b>Şekil 6.4.2.3:</b> 12 aylık ECM proteomlarına ait PCA analizi .....	36
<b>Şekil 6.4.3.1:</b> 3 aylık ECM proteomlarının IPA analizi .....	37
<b>Şekil 6.4.3.2:</b> 6 aylık ECM proteomlarının IPA analizi .....	38
<b>Şekil 6.4.3.3:</b> 12 aylık ECM proteomlarının IPA analizi .....	38
<b>Şekil 6.4.4.1:</b> 3, 6 ve 12 aylık evrelere özgü ve ortak yolakları gösteren Venn diagramı .....	40
<b>Şekil 6.5.1:</b> Tanımlanan 3 aylık ECM proteinlerinin olası regülatör yolağı .....	41
<b>Şekil 6.6.1:</b> 3 aylık hipokampal dokuda demir miktarı analizi .....	42
<b>Şekil 6.9.2.1:</b> BOS proteomuna ait PCA analizi .....	53
<b>Şekil 6.9.3.1:</b> BOS proteomunun IPA analizi .....	53
<b>Şekil 6.10.2.1:</b> Post-mortem doku örneklerinin PCA analizi .....	63
<b>Şekil 6.10.3.1:</b> Post-mortem doku örneklerinin IPA analizi .....	63

## Tablolar Listesi

<b>Tablo 5.1.1.1:</b> Ekipman Listesi .....	12
<b>Tablo 5.1.2.1:</b> Genotiplemede Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	14
<b>Tablo 5. 1.2.2:</b> Protein Ekspresyon Analizinde Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	14
<b>Tablo 5.1.2.3:</b> 2D-SDS-PAGE İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	15
<b>Tablo 5.1.2.4:</b> İmmunohistokimya İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	16
<b>Tablo 5.2.1.3.1:</b> Genotiplemede kullanılan primer dizileri .....	18
<b>Tablo 5.2.1.3.2:</b> PZR reaksiyonu bileşenleri .....	19
<b>Tablo 5.2.1.3.3:</b> PZR reaksiyon aşamaları .....	19
<b>Tablo 5.2.1.4.1:</b> Sry geni amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri .....	20
<b>Tablo 5.2.7.1:</b> İzoelektrik odaklama aşamaları .....	24
<b>Tablo 6.4.1.1:</b> 3 aylık farelerin ECM örneklerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi .....	31
<b>Tablo 6.4.1.2:</b> 6 aylık farelerin ECM örneklerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi .....	33
<b>Tablo 6.4.1.3:</b> 12 aylık farelerin ECM örneklerinde anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi .....	34
<b>Tablo 6.4.4.1:</b> 3,6 ve 12 aylık farelerin ECM örneklerinde ekspresyonu değişen ortak proteinlerin listesi .....	39
<b>Tablo 6.7.2.1:</b> Fosfoprotein spotlardan tanımlanan proteinler .....	45
<b>Tablo 6.9.1.1:</b> BOS örneklerinde anlamlı değişim gösteren proteinler .....	47
<b>Tablo 6.10.1.1:</b> Post-mortem doku örneklerinde anlamlı değişen proteinler .....	54
<b>Tablo 9.1:</b> 3, 6 ve 12. aylarda tanımlanan proteinlerin tam listesi .....	77

## 1. ÖZET

### BEYİN EKSTRASELLÜLER MATRİKSİNİN NÖRODEJENERASYONDAKİ ROLÜNÜN ALZHEİMER FARE MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

Alzheimer hastalığında (AD), sinaptik yanıt mekanizmalarının ve sinaptik bağlantı stabilitesinin hasar gördüğü bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, nöron ve glialar tarafından üretilen bazı ekstrasellüler matriks bileşenlerinin, bu iki mekanizma üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmanın amacı, Alzheimer's hastalığının başlangıç ve gelişim evrelerinde, hastalık modeli olan 5XFAD farelerden elde edilen hipokampal ekstrasellüler matriks örneklerinde proteom profilini analiz ederek, nörodejenereasyon oluşumu ile ilgili bu evrelere ait protein seviyesindeki değişimleri ve posttranslasyonel modifikasyon değişimlerini tanımlamaktır. Bunlara ek olarak, sağlıklı ve Alzheimer's hastası bireylerden alınan beyin-omurilik sıvıları ve post mortem beyin dokusu örneklerinin proteom analizi yapılarak, hastalığın gelişiminde rol alan temel yolları belirlemektir. Fareler 3 (3m), 6 (6m) ve 12 (12m) aylık iken, Morris Su Tankı deneyleri ile hafıza testlerini takiben, intraserebral mikrodializ "push-pull" yöntemi ile hipokampal ekstrasellüler matriks örnekleri toplandı. Örneklerin protein ekspresyon profilleri nanoLC-MS/MS yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kütle spektrometrisi ile elde edilen ham data, Progenesis QI yazılımı ile işlenerek protein tanımlamaları gerçekleştirildi. 3,6 ve 12 aylık ECM örneklerinde sırasıyla 251, 213 ve 238 protein tanımlandı. Bunlardan sırasıyla 68, 41 ve 33 protein istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) en az 1.4 kat ekspresyon değişikliği gösterdi. Beyin-omurilik sıvılarının analizinde 204'ü anlamlı değişen 1041 protein, postmortem doku analizlerinde 311'i anlamlı değişen 1737 protein tanımlandı. Anlamlı değişiklik gösteren proteinler, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) yazılımı ile analiz edilerek ilgili yollar tespit edildi.

**Anahtar** Kelimeler: Alzheimer's, ekstrasellüler matriks, kütle spektrometrisi, proteomik, 5XFAD

**İşbu tez çalışması, TUBITAK(Türkiye)-ARRS(Slovenya) İkili İşbirliği Programı kapsamında 112S414 no'lu proje desteğiyle gerçekleştirilmiştir.**

## 2. ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE ROLE OF BRAIN EXTRACELLULAR MATRIX IN NEURODEGENERATION BY USING ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL

In Alzheimer's disease (AD), the disruption of synaptic response and stability is known. In recent years, the studies showed that extracellular matrix produced by neurons and glial cells has several effects on those disruptions. The aim of this study is identifying the alterations in expression of extracellular matrix proteins and their posttranslational modifications in the early and progression stage of the disease by obtaining extracellular matrix from 5XFAD Alzheimer's disease mouse model via intracerebral push-pull perfusion. In addition, it has been aimed to identify the pathways related with the disease by studying on cerebro-spinal fluids (CSF) and postmortem brain tissues of healthy and AD subjects. Following the Morris Water Maze memory tests, the hippocampal ECM samples from each mice were collected by in-vivo intracerebral push-pull method at month 3 (3m), 6 (6m) and 12 (12m). The protein expression analysis were performed by nanoLC-MS/MS and ProgenesisQI were used for protein identification. In the extracellular matrix samples belong to 3, 6 and 12-month-old mouse, 251, 213 and 238 proteins were identified, respectively and 68, 41 and 33 proteins were statistically meaningful ( $p < 0.05$ ) and minimum 1.4-fold change. Additionally, 1041 proteins were identified in CSF samples and 204 of them were meaningful. 1737 proteins were identified in post mortem brain tissue samples and 311 of them were meaningful. These proteins were analyzed by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software and several pathways were determined.

**Keywords:** Alzheimer's, extracellular matrix, mass spectrometry, proteomics, 5XFAD,

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Merkezi sinir sistemindeki ekstraselüler matris bileşeleri olan chondroitin sülfat proteoglykan (CSPGs), hyaluronik asit, bağlantı proteinleri, relin, agrin, laminin, tenascin ve bunları şekillendiren metalloproteinazlar gibi enzimler nöral ve nöral olmayan hücreler tarafından ekstraselüler ortama salınırlar. Bu bileşenlerin oluşturdukları iskeleler değişik nöronal fonksiyonların yerine getirilmesini sağlarlar. Gelişim sürecinde beyin ekstraselüler matriksi (BEM), nöral hücre proliferasyonu, göçü ve farklılaşmasında önemli görevler üstlenir. Yetişkin bir beyinde ekstraselüler matris, plastisite olarak adlandırılan nöronlar arasındaki etkileşimin, yani sinapsin gücününün değişmesinde kritik görevler üstlenmektedir. Bu görevler arasında uzun dönemli potansiyasyon (LTP), uzun dönemli depresyon (LTD), homeostatik plastisite ve metaplastisite yer almaktadır. Ekstraselüler proteazlar ve ekstraselüler matris moleküllerinin ekspresyon ve aktivitelerinde oluşabilecek mutasyonlar ve regülasyonun bozulması ekstraselüler matrisin şekil değiştirmesine neden olur ve glioma genişlemesine bağlı olarak epilepsi, inme, şizofren ve bilinç bozulması hastalarının beyinlerinde görülen patolojik plastisite ortaya çıkmaktadır.

Sinaptik plastisite ve sinaptik yanıtta meydana gelen hasarlar, Alzheimer's hastalığı için büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ekstraselüler matriksin içeriğinde veya hacminde meydana gelen değişimlerin bu iki mekanizma ve diğer sinyal iletim mekanizmalarında etkisi olduğunu göstermiştir. Beyin ekstraselüler matrisinin nörodejenerasyondaki rolünün araştırılması için 5XFAD transgenik Alzheimer's hastalığı fare modeli kullanıldı. Bu fare modeli yaşa bağlı motor fenotipi ve hafızada kayıplar gösterdiği için Alzheimer hastalığı çalışmalarında iyi bir in-vivo model olma özelliğine sahiptir. Ayrıca intranöral Abeta birikimi ve yaşa bağlı aksonal dejenerasyon da görülmektedir. 5XFAD fare modelinde, amiloid prekürsör proteininin (APP) İsveç, Florida ve Londra mutasyonunu taşıyan 695 amino asitlik bir izoformu fare Thy-1-promotörü altında overeksprese edilmektedir. Bununla birlikte Thy-1 promotörü altında, M146L ve L286V mutasyonu içeren insan presenilin-1'de (PS1) eksprese edilmektedir. İlerleyen nörodejenerasyon ve ekstraselüler matriks arasındaki bağın araştırılması için 3, 6 ve 12 aylarda fare modelinden, intraserebral 'push-pull' perfüzyon ile

toplanan ECM örnekleri, kütle spektrometrisi ile analiz edildi. Ek olarak, fosforile ve okside olmuş proteinlerin varlığı gösterildi. Tanımlanan proteinlerin yolak analizleri sonucunda hastalığın gelişim evresinde özellikle metabolik yollara etki ettiği gösterildi. Ayrıca Abeta plaklarının henüz oluşmaya başlamadığı ve kognitif yıkımın olmadığı erken evrede (3 aylık), meydana gelen IL6 seviyesinde ve demir miktarında artış gözlemlendi. ECM ve IL6 arasındaki olası ilişki IPA analizi aracılığı ile öngörülmüştür. Daha önceki yayınlarda inflamasyon ve demir seviyelerinin hastalığın geç döneminde değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak, henüz hastalığın en belirgin patolojilerinden biri olan Abeta plakları oluşmadan evvel bu değişimlerin gösterilmesi yeni bir bulgudur.

ECM proteom analizlerine ek olarak, insan BOS ve postmortem beyin dokularından yapılan proteomik analizlerinde tanımlanan proteinlerin yolak analizleri sonucunda, ECM örneklerinde tespit edilen bazı yollar ile insanlardan alınan BOS ve doku örneklerinden elde edilen yollardan bazılarının (lipid/lipoprotein metabolizması, LXR/RXR sinyal yolları ve Nrf-2 sinyal yolağı vb.) ortak olduğu gözlemlendi. Elde edilen bilgilerin varlığı ve verilerin çokluğu, ECM'in Alzheimer's ile ilişkili olduğunu göstermiştir ve çok daha detaylı şekilde incelenmelidir.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. Alzheimer Hastalığı (AD)**

Alzheimer hastalığı (AD), çoğunlukla yaşlı bireylerde görülen, geri döndürülemeyen ve ilerleyici tipte bir nörodejeneratif bozukluktur. Hastalar, başlangıçta kısa süreli hafıza kayıpları yaşar ve ilerleyen dönemlerinde hasta, hem zihinsel hem konuşma, yürüme, yemek yeme gibi günlük fiziksel aktivitelerini gerçekleştiremez duruma gelir. Mevcut tedaviler hastalığın klinik belirtilerini hafifletse de, AD'ye neden olan genetik ve patolojik değişimleri geri döndürememektedir.

#### **4.1.1. Tarihçe ve Epidemiyoloji**

Tarihte ilk kez psikiyatrist Alois Alzheimer, 50 yaşındaki hastası Auguste D.'nin 1906 yılında ölümü ardından yapılan otopside tespit ettiği senil plaklar ve nörofibriler yumaklar ile yeni bir hastalığa işaret etmiştir (1). Yapılan makroskopik ve mikroskopik çalışmalar sonucu, AD patolojisinin diğer demans türleri gibi doğal yaşlanma sürecinden kaynaklanmadığı, erken yaşlarda da meydana gelebildiği ortaya konulup, presenil demans adı verilmiştir (1, 2). Bu şekilde adlandırılan hastalık daha sonraları Alzheimer hastalığı, günümüzde ise Alzheimer tipi demans olarak adlandırılmaktadır. Araştırmaların artması ve teknolojinin gelişmesi ile klinikte bu demans türlerinin birbirinden ayrılması için belli kriterler oluşturulmaya başlanmıştır (3). Demans vakaları içerisinde AD tipi demans %65 oranındadır. Kadınlarda hastalığı taşıma riski daha fazla olmasının yanında yaş önemli bir faktördür (4). Türkiye'de 70 yaş üzeri bireylerde AD prevalansı %11 iken, dünyada 90 yaşından sonra bu oran %63,2 çıkmaktadır (5, 6).

#### **4.1.2. Hastalığın patolojisi**

Alzheimer hastalığı, çoğunlukla medial temporal lob ve ilişkili neokortikal yapıları etkileyen kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın patolojik belirtilerinden en iyi tanımlanmış olanlar, beyin dokusunda biriken Amyloid-beta peptitlerinin (A $\beta$ ) birikmesiyle ve nöronlarda hücre iskeleti değişimlerine neden olan hiperfosforile Tau proteinlerinin artışıyla ilişkili plak ve nörofibriler yumakların oluşmasıdır.



Intraserebral amyloid birikimi, yaşla doğru orantılıdır ancak yapılan son araştırmalara göre orta yaş grubu kişilerde de görülmektedir. Klinik açıdan incelendiğinde hastalık 3 faza ayrılabilir: (i) *pre-sembiotik*; amyloid-beta seviyesindeki artış ve beyin dokularındaki birikiminin amyloid kaskadını başlatmasına kadar geçen evre; (ii) *pre-demans*; patolojilere ek olarak gözlenen hafif kognitif bozukluk; (iii) *demans*; kognitif ve fonksiyonel bozukluğun tam anlamıyla görüldüğü evre. Bu evrede beyin dokularında A $\beta$  plakları ve nörofibriller yumakların aşırı birikimi ile global bozukluktaki artış gözlemlenmektedir (7, 8). Hastalığın patofizyolojisiyle ilgili bir kaç hipotez bulunmaktadır.

#### 4.1.2.1. Amyloid hipotezi

Bu hipoteze göre A $\beta$  proteinin fazla miktarda üretimi, amyloid öncül proteini olan APP (Amyloid Precursor Protein)'nin proteolitik kesimini düzenleyen mekanizmalardaki homeostatik bozukluklardır. Hipotezin çıkış noktası, yapılan genetik analizler sonucu elde edilen ve ailesel Alzheimer hastalarında görülen APP geninde görülen mutasyonların bilgisidir. APP, merkezi sinir sisteminde fazlaca bulunan transmembran proteinlerden bir tanesidir. Dokularda sentezlenen bu protein plazma membranına ek olarak endoplazmik retikulum, Golgi ve mitokondri gibi zarlı organellerde de bulunmaktadır (9). APP'nin proteolitik kesimi ile üretilen A $\beta$  türleri, içerdikleri amino asit sayılarına göre isimlendirilir ve bunlardan A $\beta$ <sub>40</sub> ve A $\beta$ <sub>42</sub> beyin dokularında en çok bulunanlarıdır (10).

APP, iki ayrı yolak ile metabolize edilir: salgılayıcı yolak (amyloidogenic olmayan) ve amyloidogenic yolak. Salgılayıcı yolda APP, önce  $\alpha$ -sekretazlar (ADAM) ile kesilerek çözülebilir N-terminal fragmentlerin(sAPP $\alpha$ ) oluşması sağlanır. Kesim sonrası, C-terminal fragment kısmı ise  $\gamma$ -sekretazlar ile kesilir.  $\alpha$ -sekretazlar ile yapılan kesim, amyloid-beta peptid amino asit dizisini böldüğü için, peptid oluşumunu engellemektedir (11). Amyloidogenic yolda ise APP,  $\beta$ -sekretazlar (BACE1) ile kesilerek daha kısa N-terminal fragmentler(sAPP $\beta$ ) ve amyloidogenic amino asit diziyi de içeren daha uzun C-terminal fragmentler oluşur.  $\gamma$ -sekretazlar ile yapılan ikinci kesim ile de amyloid- $\beta$  peptidleri üretilir. A $\beta$  türleri monomer olarak salınır ve kademeli olarak dimer, trimer, oligomer, protofibril, fibril formlarında birikir ve son olarak çözülemeyen A $\beta$  plaklarının oluşmasını sağlarlar.

Benzer olmalarına rağmen, A $\beta$ <sub>42</sub> agregasyon ve fibrilizasyona daha yatkındır ve Alzheimer patolojisinde önemli yere sahiptir (10).

A $\beta$  oligomerleri, amyloid türevleri içerisindeki en toksik form olarak bilinmektedir (12). Nöron ve gliyalarla etkileşime girerek inflamasyon kaskadlarının aktivasyonuna, mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stresin artmasına (13), hücre içi sinyal mekanizmaları ve sinaptik plastisitenin bozulmasına, Tau fosforilasyonunda ve GSK-3 $\beta$  aktivitesinde artışa, kalsiyum metabolizmasında deregülasyona, nöronal apoptoz ve hücre ölümüne neden olur. Bu mekanizma, amyloid kaskadı olarak adlandırılan sürecin başlamasını tetikler. Fazla miktardaki A $\beta$  türevlerinin neden olduğu nörotoksisite ve hücre zararları APP metabolizmasında bozukluklara öncelik eder, sonuç olarak daha fazla A $\beta$  üretilmesine neden olur (9).

Normal fizyolojik koşullar altında, APP genellikle salgılayıcı yolağı tercih eder. Bunun yanında A $\beta$  üretimi ve beyin dokularından temizlenmesi arasında bir denge vardır (12). A $\beta$  peptidlerinin beyin dokularından temizlenmesinde görev alan iki önemli protein apolipoprotein E (APOE) ve insülin-degrade eden enzim (IDE) dir. Anormal IDE veya APOE'deki dezavantaj sağlayan genetik polimorfizmlerin, temizlenme sürecini etkilediği düşünülmektedir ancak mekanizmaya ait net bir bilgi mevcut değildir (14).

#### **4.1.2.2. Tau ilişkili hipotez**

Mikrotübül-ilişkili protein Tau, pek çok dokuda sentez edildiği gibi merkezi ve periferik sinir sisteminde de bulunmaktadır ve hücre iskeletinin önemli bir elemanıdır. Tau,  $\alpha$ - ve  $\beta$ - tubulin ile ilişki içerisinde ve fosforilasyonu, tubulin polimerlerinin stabilizasyonu için büyük öneme sahiptir. Bu açıdan, nöronal yapının devamlılığı, aksonal transport ve nöronal plastisitede de esansiyel role sahiptir. Tau proteininin fosforile ve defosforile formları, proteinin serin ve treonin rezidüleri üzerinde yer alan fosfoepitoplar üzerinden geri dönüştürülebilir şekilde oluşturulur. Anormal fosforilasyonların yanında, normal seviyeden fazla miktarda fosforile olan Tau proteinleri (hiperfosforile) aksonal transport ve sinaptik metabolizmayı bozarak, mikrotübül hücre iskeletini yıkımına, nörofibriller yumakların oluşmasına ve nihai

olarak nöronal ölüme yol açmaktadır (15). Alzheimer hastalarında, Tau proteini üzerinde en az 25 anormal fosforilasyon bölgesi tanımlanmıştır (16).

Tau ve tubulin arasındaki bağlantılar dinamiktir. Tau, kendi polimerizasyonunu sağlarken tubulinin depolimerizasyonunu inhibe eder. Bu süreçlerde, Tau'nun fosfoepitopları üzerindeki fosforilasyon-defosforilasyon arasındaki denge ile düzenlenmektedir. Tau fosforilasyon-defosforilasyonunda birden fazla protein kinaz ve proteaz görev alır ancak, glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) nöronlarda eksprese edilen en önemli Tau kinazdır (17). Önceki çalışmalarda Alzheimer hastalarının serebral dokularında azalan fosfataz ekspresyonu (15) ve nörofibriller yumaklarda artan kinaz ekspresyonu gösterilmiştir (18). Embriyonik gelişim evresinde, nöroplastik değişimlerin fazla ve gerekli olması sebebiyle Tau genellikle hiperfosforile durumdadır (19). Gelişimin sonraki dönemlerinde defosforilasyona yatkın hale gelerek hücre iskeletinin devamlılığını ve nöronal homeostasiyi sağlar (18). Alzheimer gibi bazı patolojik durumlarda, Tau hiperfosforile hale geçer ve tubuline bağlanması engellenir. Bu da, mikrotübüler yapının bozulmasıyla başlayan aksonal transport ve sinaptik plastisitede bozukluklarla ilerleyen hücre ölümüne neden olurlar (20).

Amyloid hipotezinin tersine Tau ilişkili hipotezde, Tau homeostasisinin bozulması Alzheimer hastalığı oluşumunda birinci basamakta olduğu desteklenmektedir. Bunun yanında, Tau abnormaliteleri frontotemporal demans, çoklu sistem atrofileri, kortiko-basal dejenerasyon ve bazı motor nöron hastalıkları gibi nörodejeneratif bozukluklarda da görülmektedir. Bu nedenle, Tau patolojisi taşıyan bu hastalıklar "taupatiler" olarak sınıflandırılmaktadır. Alzheimer hastalarında nörofibriller yumakların varlığı gösterilse de; bazı hafif kognitif bozukluğa sahip hastalarda hiperfosforile Tau gözlemlenirken, amyloid- $\beta$  plaklarına rastlanmaması, Alzheimer hastalığını tetikleyen ilk bozukluğun Tau hiperfosforilasyonu olduğu görüşünü desteklemektedir (Rhein ve Eckert, 2007). Buna rağmen, bulguların çoğu amyloid hipotezini desteklemektedir ve ne erken-başlangıçlı ne de geç-başlangıçlı Alzheimer hastalarında, Tau geninde genetik mutasyona rastlanmamaktadır (21).

#### 4.1.2.3. Diğer hipotezler

A $\beta$  ve tau proteinlerinin agregasyonu ve oksidatif stresin de etkisiyle nöroinflamasyonun tetiklenmesine dair teoriye ek olarak, metal metabolizmalarındaki bozukluklarda AD ile ilişkilendirilmiştir. A $\beta$  plakları ile birlikte demirin lokalize olduğu (22, 23) ve Alzheimer'da demir, bakır, çinko ve alüminyum homeostazisinin bozulduğu gösterilmiştir (24, 25). Yapılan çalışmalardan biri, 24 haftalık PSAPP farelerinin korteks dokularındaki demir miktarının artışı ile Abeta plaklarının oluşumunun eş zamanlı olduğunun ama artan demir miktarının Abeta plaklarından kaynaklanmadığını göstermiştir (26). Bir diğer çalışmada ise, 8 aylık A $\beta$ PP/PS1 transgenik farelerin beyin hemisferlerindeki total demir miktarının değişmediği ancak Abeta plakları ile lokalize olduğu gözlemlenmiştir (27). Demir seviyesi, sistemik regülasyonun yanı sıra innate immün sistem hücreleri tarafından salgılanan bazı proteinler tarafından da kontrol edilir (28). AD patolojisinde mikroglia ve astrosit aktivasyonu ve bunların demir metabolizmasına olan etkisi halen araştırılmaktadır (29, 30). AD hastalarında arttığı bilinen IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  ve IL6 sitokinleri aktif mikroglia ve astrositlerin ürünüdür (31, 32) ve IL6, enfeksiyon ve inflamasyon durumlarında, hepcidin demir regüle edici hormon aracılığıyla demir seviyesini regüle etmektedir (33).

#### 4.2. Hipokampal CA1 bölgesi

Hipokampus, ekstrasellüler plak ve yumaklardan ilk etkilenen beyin bölgelerinden biridir ve hafıza oluşumu ve geri çağırımındaki esansiyel rolü bilinmektedir (34–37). Önceki çalışmada Alzheimer's hastalarının hipokampus aktivitesindeki bozukluklar da gösterilmiştir (38). Hipokampal formasyon birkaç altkısımdan oluşmaktadır ve hafıza performansı bu kısımlardaki lezyonlardan etkilenmektedir (39–42).

Hipokampal formasyonun altkısımları: hipokampal 'proper'- cornu ammonis (CA1-CA3), dentat girus (DG), subikular kompleks ve entorhinal korteks (EC) (43). EC'nin hipokampüse afferent input kaynağı olması ve DG'nin bilginin transfer edildiği ana yol olması nedeniyle sahip oldukları öneme ek olarak, EC'den CA1 ve CA3'e olan projeksiyonlar da düşünüldüğünden daha önemlidir (44). Hipokampusün output yapıları CA1 ve subikulumdur (45). Aynı zamanda CA1 ve CA3,

hipokampüsün primidal hücrelerinin bulunduğu temel bölgedir (46). EC, CA1 ve subiculum ile bilateral bağlantılara sahiptir ve kortektteki assosiasyon alanlarından gelen ve bu alanlara giden bilgilerin trafiğinde bir arayüz görevindedir (47, 48).

Alzheimer's hastalığında, CA1, CA2-3 ve subkulumdaki plastisitede instabilite (49), CA1 ve CA3'ün her ikisindeki metabolic aktivitede azalma (50), CA1'deki nöronal hücre gövdesi, nükleus ve nükleoli'de belirgin bir hipertrofi gösterilmiştir (51). Ek olarak, AD bireylerin CA1 bölgesindeki sinaps sayısının, hafif kognitif bozukluk taşıyan yada sağlıklı bireylere göre daha az olduğu (55%) gösterilmiştir (52). Tüm bu bilgiler ışığında hipokampal CA1'in AD'deki değişimlerinin ileri analiz yöntemleri ile araştırılması hem patolojinin anlaşılması hem de diğer demans türlerinden ayırt edici özelliklerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır.

### **4.3. Ekstraselüler matriks (ECM) ve AD**

Nöron ve glialar tarafından üretilen beyin ekstraselüler matriksi (ECM), sinir sistemi gelişiminde nörogenez, hücre göçü, aksonal büyüme ve yön bulma gibi pek çok hücrenel süreçte görev almaktadır (53, 54). Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşlanmaya bağlı meydana gelen ECM içeriği ve hacmindeki değişimlerin nörodejeneratif süreçlerle ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (55, 56). Özellikle, ECM tarafından meydana getirilen spesifik ve stabil yapılar olan perinöronal ağların (PNN), Alzheimer's ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkması ve gelişmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (57). Sinapsları çevreleyerek stabil hale getiren PNN oluşumu, beyni oksidatif stresten kaynaklanan nörodejenerasyon, yaşlanma ve hasarlardan korumaktadır (57). Düşük yoğunlukta PNN içeren beyin bölgelerinin, yüksek yoğunlukta PNN kaplı nöron içeren bölgelere göre nörofibrillar dejenerasyona yatkın olduğu da gösterilmiştir. Bu ilişki, AD patolojisi ve nöronal ECM arasındaki bağlantıyı desteklemektedir (58).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ise  $\beta$ -amyloid senil plaklar etrafında kümelenen aktif glial hücrelerden salınan diğer bir önemli nöral ECM bileşenidir. A-beta plaklarını degrade etmek amacıyla bu bölgede salınan proteinazlar, aynı zamanda PNN yapısını da negatif olarak etkilemektedir (59). Diğer yandan, PNN-sarı nöronların, PNN içerisinde MMP inhibitörü miktarının artırılarak MMP'lerden etkilenmediği de bilinmektedir (60, 61).

Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG), senil plaklarla ilişkili olduğu bilinen diğer bir ECM bileşenidir (62). HSPG ailesinde yer alan Glipikan, Sindekan 1-3 ve Agrin'in, senil plaklar ve serabral amyloid anjiyopatilerde birlikte lokalize oldukları gösterilmiştir (63, 64). Heparin sülfat boyamalarından elde edilen verilere göre, birikmeye başlamaları, plak gelişiminin erken evreleri ile çakışmaktadır; ek olarak, miktar ve yapıları nörodejenerasyonun erken evreleri ile ilişkilendirilmiştir (63, 65).

ECM glikoproteinleri sınıfında en iyi bilinen proteinlerden biri de NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) reseptörlerini regüle eden Reelindir (66). Daha önceki çalışmalarda, AD fare modellerinin entorhinal korteksinde ve AD bireylerin beyin dokularında reelin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (67). Reelin seviyesindeki bu azalma, apolipoprotein E reseptör 2 ve VLDL reseptörü aracılığıyla, A $\beta$  ve tau patolojisini negatif etkileyen reelin sinyalini de azaltmaktadır (68).

#### **4.4. Proteomik ve AD**

Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, kompleks moleküler mekanizmalar sonucunda meydana gelmektedir. Bu kompleksliği açıklayabilmek amacıyla son on yılda, hücre, doku, serum ve BOS gibi biyolojik materyallerdeki proteom değişimleri, kütle spektrometrisine dayalı proteomik metotlarla sıklıkla çalışılmıştır (69–71).

Kütle spektrometrisi, biyolojik materyal içerisindeki tüm proteinlerin tanımlanması ve ekspresyon değişimlerinin kalitatif olarak hesaplanabilmesini sağlaması açısından, patolojiyi anlamada daha bütüncül veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Bu çalışmaların kalite ve güvenilirliği gelişen teknolojinin yardımı ile yükselişe geçmiştir. Ek olarak, ekstraselüler matriks, interstisyel sıvılar, hücre membranı veya organeller gibi farklı biyolojik materyallerin çalışılması ile de patoloji altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunulmuştur (72–74).

## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Materyal

#### 5.1.1. Ekipmanlar

**Tablo 5.1.1.1:** Ekipman Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	1708280
Concentrator Plus	Eppendorf	5490 030.001
Cordless Pellet Pestle	Kimble	749540-0000
Cryostat	Lecia	CM1950
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube (1.5 mL)	Sigma-Aldrich	Z666505
Etüv (37 °C - Proteomiks)	Memmert	8419 8998
Etüv Forma Steri-Cycle (37 °C %5 CO <sub>2</sub> – Hücre Kültürü)	Thermo Scientific	144099-8653
Hassas Terazi	Explorer	EX124
Heatblock Isıtıcı	Benchmark	H5000-HC
Hoffman Modülasyonlu Ters Optik Mikroskop	Zeiss	
Konfokal Mikroskop (LSM 780 NLO)	Zeiss	
Kuru-buz Cihazı		
Lam	Thermo Scientific	10143352
Lamel	Thermo Scientific	
Laminar Flow Kabin Airstream Gen 3	ESCO	
LC-Vial	Supelco	29413-U
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark	H400HSB
Maxisafe 2020 Class II Biyolojik Güvenlik Kabini	Thermo Scientific	51026653
Mikropipet Seti	Eppendorf	
Mini-PROTEON Tetra Cell	BioRAD	1658000EDU
nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	Waters	
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	Waters	
Pappen	Sigma	
PCR tüp (0,2 µL)		
PCR tüp (0,5 µL)		
Petri (Cam tabanlı – 35 mm)	Fluoro Dish	PD35-100
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070

Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Scientific	Q32866
Santrifuj (Hücre kültürü) SL 16R	Thermo Scientific	75004030
Santrifuj (Proteomiks) Biocen 22R	Orto Alresa	CE 148
Shaker	Benchmark	
Soğutucu (+4 °C)	Ugur	
Soğutucu (-20 °C)	Thermo Scientific	
Soğutucu (-80°C)	Arctiko	
Stereo Mikroskop Observer.A1	Zeiss	
Sub-Cell ® GT Horizontal Electrophoresis Systems, Tray	BioRAD	1704401
SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometry	Waters	
T100™ Thermal Cycler	BioRAD	1861096
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRAD	1704155
Protean i12 IEF Cell System	BioRAD	
MALDI-TOF/TOF	ABSciex	



### 5.1.2. Kimyasallar

**Tablo 5.1.2.1:** Genotiplemede Kullanılan Kimyasallar Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
NaOH	Sigma-Aldrich	221465
EDTA	Sigma-Aldrich	E9884
Tris/HCl	Sigma-Aldrich	T5941
Taq PCR	NEB	E5000S
PCR Primerleri	Sentromer	
Agaroz	Sigma-Aldrich	A9539
Trizma® Base	Sigma-Aldrich	T1503
Glasiyal Asetik Asit	Sigma-Aldrich	537020
SafeView™ DNA boyası	ABM	G108
DNA Standart	NEB	E5000S
Yükleme Boyası	Thermo Scientific	R0611

**Tablo 5.1.2.2:** Protein Ekspresyon Analizinde Kullanılan Kimyasallar Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
Proteaz İnhibitör Kokteyl	Sigma-Aldrich	P8340
FASP™ Protein Digestion Kit	Expedeon	44250
AmBic	Sigma-Aldrich	
UPX™ Universal Protein Extraction Kit	Ecpedion	44101
Pure-A-Lyzer™ Mini 6000 Dialysis Kit	Sigma-Aldrich	PURN60100
Tripsin	Thermo Scientific	90055
Formik Asit	Fluka	94318
Qubit Assay Kit	Thermo Scientific	Q32853
Asetonitril (LC-MS saflığında LiChrosolv® )	Merck	100029.2500
Su (LC-MS saflığında LiChrosolv®)	Merck Millipore	15333
Glu1-Fibrinopeptide B Standart	Waters	700004729
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
Leu-Enkephalin	Waters	
IAA	Sigma-Aldrich	
DTT	Sigma-Aldrich	
CHCA	ProteoChem	

**Tablo 5.1.2.3: 2D-SDS-PAGE İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi**

<b>Gereç</b>	<b>Markası</b>	<b>Ürün Kodu</b>
Üre	BioRAD	1610730
Tioüre	Merck	1079790250
CHAPS	BioRAD	1610460
Proteaz&Fosfotaz inhibitörü	ThermoPierce	88669
Bradford Solüsyonu	BioRAD	50000006
Amfolit	BioRAD	1631113
Bromofenol mavisi	BioRAD	1610404
IPG Stripleri (NL 3-10)	BioRAD	1632016
Mineral Oil	BioRAD	1632129
Tris/HCl	Sigma-Aldrich	T5941
Low melt agaroz	BioRAD	1632111
Gliserol	Merck	1040922500
SDS	Sigma-Aldrich	L3771
Criterion TGX jel (4-20%)	BioRAD	5671091
Metanol	Merck Millipore	106009
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Merck	S7150
Laemmlı Örnek Tampon Çözeltilisi	BioRAD	1610737
Metanol	Merck Millipore	106009
ProQ Diamond	ThermoFischer	M33305
Sodyum Asetat	Sigma-Aldrich	S2889
SyproRuby	ThermoFischer	M33305
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit	BioRAD	1704272
BSA	Sigma-Aldrich	
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379
Clarity Western ECL Blotting Substrate	BioRAD	1705060
WesternC prestained protein ladder	BioRAD	1610385
Transblot midi PVDF membrane kit	BioRAD	1704273
PeppermintStick MW marker	ThermoFischer	P27167

**Tablo 5.1.2.4: İmmunohistokimya İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi**

<b>Gereç</b>	<b>Markası</b>	<b>Ürün Kodu</b>
Mounting Medium		
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
KCl	Sigma-Aldrich	P9333
Sodyum Fosfat, Dibazik	Merck Millipore	567547
Potasyum Fosfat, Monobazik	Merck Millipore	529568
IL-6 antikor	Santa Cruz	sc-7920
A-beta antikor	Covance	SIG-39200
VECTASTAIN Universal Quick HRP Kit (Peroxidase)	Vector Laboratories	PK-7800
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories	SK-4100

## 5.2. Metot

### 5.2.1. Deney hayvanları üretimi ve genotiplenmesi

Alzheimer's hastalığının temel özelliklerini taşıyan transgenik 5XFAD fareler (The Jackson Laboratory, B6SJL-Tg(APP<sup>Sw</sup>FIL<sup>on</sup>, PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>)6799<sup>Vas</sup>/J)), yeni transgenik farelerin üretilmesi amacıyla, hibrid B6SJL fareleri (The Jackson Laboratory, B6SJLF1/J) ile çiftleştirildi. Her bir 5XFAD erkek fare, 3-4 adet dişi B6SJL fare ile; dişi 5XFAD fareler de, erkek B6SJL fareler ile üreme kafesine bırakıldı. Çiftleşme ve hamilelik dönemlerinin ardından, tüm hayvanlardan verimli şekilde yavrular elde edildi. Tek batında hem heterozigot transgenik (5XFAD) hem de transgenik olmayan (LM- Littermate) yavruların olması nedeniyle, yavrulardan doku örneği alınarak genotiplenmesi yapıldı. Paslanmaz metal kulak küpesi (Harvard Apparatus, USA) ile sağ kulağı işaretlenen 20-25 günlük hayvanların, sol kulak kepeçesinden 2.0 mm çapında örnek alındı (Harris Micro-Punch, Sigma-Aldrich).

#### 5.2.1.1.DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için, genel olarak genotiplenme de kullanılan "kirli" DNA izolasyonu yöntemi kullanıldı. Bunun için, tüplere alınıp işaretlenen doku örnekleri üzerine 75ul, 25mM NaOH / 0,2mM EDTA eklendi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) cihazı içerisinde 1 saat boyunca 98 °C'de inkübe edildikten sonra 15 °C'ye soğutuldu. İnkübasyon sonrası, nötralizasyon amacıyla tüplere 75 ul 40 mM Tris/HCl (pH=5.5) eklendi. 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilen örneklerin supernatantından 4 ul alınarak, PZR analizinde template DNA olarak kullanıldı.

#### 5.2.1.2.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

İzole edilen total DNA'larda hedef genlerin amplifikasyonu için standart PZR yöntemi kullanıldı. Kontrol gruplarından farklı olarak 5XFAD fareler, ailevi Alzheimer's hastalığına neden olduğu bilinen APP (Amyloid Precursor Protein) geni üzerinde 3 adet ve PS1 (Presenilin) geni üzerinde 2 adet mutasyon taşımaktadır. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere, kontrol ve mutant hayvanlarda amplifiye olması beklenen internal pozitif kontrol ve mutasyonları taşıyan genlerin amplifikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan primerler Tablo 5.2.1.3.1'deki gibi sentezlettirilmiştir (Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti., İstanbul). Liyofilize halde gelen primerler,

önerilen miktarda ddH<sub>2</sub>O ile çözülerek 100 mM stok solüsyonlar elde edildi. PZR reaksiyonu öncesinde 20 mM solüsyonlar elde edecek şekilde dilue edildi. PZR reaksiyon karışımı, her bir doku örneği için kit yardımıyla (NEB, E5000S) Tablo 5.2.1.3.2’de belirtilen şekilde hazırlandı. Tablo 5.2.1.3.2’de belirtilen oranlarda birleştirilerek hazırlanan örneklerin PZR reaksiyonu aşamaları Tablo 5.2.1.3.3’de gösterilmiştir.

### 5.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin değerlendirilmesi, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla kullanılacak olan her bir jel için 3 gr agaroz, 100 ml TAE tampon çözeltisi içerisinde (%3’lük jel), mikrodalga fırında 5 dk kaynatıldı. Jel polimerize olmadan önce içerisine, nükleik asitleri UV ışık altında görünür hale getiren boyadan (Safeview, ABM) 5 ul eklendi. Boya jel içerisine homojen olarak dağıtıldıktan sonra jel yürütme kasetine dökülerek, polimerize olması beklenildi. Diğer yandan, PZR ürünleri, yükleme boyası ile (6X Gel Loading Dye, NEB B7021-S) ile 1:5 oranında karıştırılarak jele yüklenmeye hazır hale getirildi. Polimerize olan jele sırasıyla, DNA ladder (Quickload 2-log, NEB N0496), kontrol ve test edilecek örnekler’den 10 ul yüklendi. 80V ‘da 45 dk yürütülerek, ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (BioRad) kullanılarak görüntülemesi yapıldı.

**Tablo 5.2.1.3.1:** Genotiplemede kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Baz Dizisi (5’-> 3’)	Baz Sayısı	Tm (°C)	Beklenen Baz Sayısı
<i>Kontrol_Forward</i>	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	24	59,3	324
<i>Kontrol_Reverse</i>	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	25	61,3	324
<i>APP_Forward</i>	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	20	61,4	377
<i>APP_Reverse</i>	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	19	58,8	377
<i>PSI_Forward</i>	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	20	57,3	608
<i>PSI_Reverse</i>	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	20	57,3	608

**Tablo 5.2.1.3.2:** PZR reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon Bileşeni	Negatif Kontrol	Test Grubu (1 örnek için)
<i>ddH2O</i>	9,6	9,5
<i>10x Reaction Buffer</i>	2,4	2,4
<i>dNTP</i>	0,5	0,5
<i>Kontrol_Forward</i>	1,2	1,2
<i>Kontrol_Reverse</i>	1,2	1,2
<i>APP_Forward</i>	1,6	1,6
<i>APP_Reverse</i>	1,6	1,6
<i>PSI_Forward</i>	1,6	1,6
<i>PSI_Reverse</i>	1,6	1,6
<i>Template</i>	4	4
<i>Taq DNA polimeraz</i>	-	0,125
<i>Toplam</i>	25	25

**Tablo 5.2.1.3.3:** PZR reaksiyon aşamaları.

Derece (°C)	Süre	Döngü
94	3 dk	1
94	00:30 dk	35
57,3	1 dk	
72	1 dk	
72	2 fk	1
10	∞	-

#### 5.2.1.4. Moleküler yöntem ile cinsiyet tayini

Kontrolsüz üretimi engellemek amacıyla, hayvanların cinsiyetinin tam olarak tanımlanıp kafeslere ayrılması gerekmektedir. Genotipleme için örnek alımı ise, hayvanlar 20-25 günlükken yapılmıştır. Bu dönemde hayvanların cinsiyetleri anatomik olarak tam ayırt edilemediği için önlem olarak, alınan doku örneklerinden genotipleme protokolü takip edilerek cinsiyet tayini yapılmıştır. Cinsiyet tayini için Y-kromozomuna özgü Sry geni, izole edilmiş total DNA'dan PZR reaksiyonu ile amplifiye edildi (75, 76). Kullanılan primer dizileri Tablo 5.2.1.4.1'deki gibidir.

**Tablo 5.2.1.4.1:** Sry geni amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri.

Primer Adı	Baz Dizisi (5' -> 3')	Baz Sayısı	Tm (°C)	Beklenen Baz Sayısı
<i>Sry_Forward</i>	TGG GAC TGG TGA CAA TTG TC	20	57,3	402
<i>Sry_Reverse</i>	GAG TAC AGG TGT GCA GCT CT	20	59,4	402

PZR reaksiyon aşamaları Tablo 5.2.1.3.3'de belirtildiği gibi kullanılırken, PCR bileşenlerinde Tablo 5.2.1.3.2'den farklı olarak, agaroz jelde görülmesi beklenen bantlarının yakın olması nedeniyle, APP gen primer çifti çıkartılıp, yerine aynı miktarda Sry geni primer çifti konulmuştur (APP, 377 bp; Sry, 402bp). PCR reaksiyonu ürünleri, %4'lük agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülemesi yapılmıştı.

## 5.2.2. Morris su labirenti davranışsal testi

Deneyle için 93 cm çapı ve 42 cm yüksekliği olan Morris Su Labirenti kullanıldı. Fareler testin başlangıç günü (0. Gün) yüzme alıştırmaları için platformsuz tank içinde 120 saniye yüzdürüldü. Takiben ilk 4 gün (1-4. Günler) Öğrenme Fazı deneyleri ve 5. gün Hafıza Fazı deneyleri yapıldı. Morris Su Labirenti dört kadrana (kuzey, güney, doğu, batı) bölündü. Öğrenme fazında (1-4. Günler), kadranslardan birine suyun 1 cm altında kalacak şekilde yüksekliği 30 cm ve yüzey alanı 10 cm<sup>2</sup> olan bir platform kondu. Suyun yüzeyi 2,5 mm büyüklüğünde polimerlerle kaplanarak farelerin platformu görmesi engellendi. Bu fazda, fareler her bir kadrandan 20 dakika ara ile bırakılarak her defasında 120 saniye boyunca yüzdürüldüler. Farelerin 120 saniye içinde odanın dört duvarında sabit olarak bulunan bazı resimlerden hiza almak suretiyle yüzerek gizli platformu bulması beklendi. Platformu bulan fareler 30 saniye platform üzerinde bekletildi. 120 saniye içinde platformu bulamayan fare araştırmacı tarafından sudan alınıp platform üzerine bırakıldı ve 30 saniye boyunca etrafı gözlemesi beklendi. Fareler her bir kadranda yüzdürüldükten sonra diğer kadranda test edilmek için bekletildikleri 20 dakikalık dönemlerde sıcak hava ile kurutuldular. Bu fazda farelerin platformu bulma süresi ölçüldü ve dört ayrı kadrandan elde edilen verilerin ortalamaları hesaplandı.

Hafıza fazında (5. gün) ise farelerin boşluksal bellek fonksiyonları incelendi. Bu fazda platform yerinden kaldırıldı ve fareler daha önce platformun bulunduğu kadranın karşısındaki kadrandan suya bırakılarak 60 saniye yüzdürüldü. Hafıza fazında platform alanında geçirilen süre, hedef kadrana girme sıklığı ve toplam yüzülen mesafe ölçüldü. Farelerin su tankındaki davranışları bir kamera yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı ve veriler bir bilgisayar yazılımı (EthoVision) ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki istatistiki karşılaştırmalar Student t testi ile yapıldı. Grup içi değişim ise Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılarak analiz edildi. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiki anlamlılık olarak değerlendirildi (\*p<0,05).

### **5.2.3. İmmünohistokimya analizi**

5XFAD ve transgenik olmayan kontrol grubu (LM) fareler, isoflurane kullanılarak anestezi altına alındı. Hızlıca beyinleri çıkartılarak, kuru buz üzerinde donana kadar (~3-5 dk.) beklenildi. -20 °C'de 3-4 gün bekletildikten sonra dondurulmuş beyinlerden kriyostat (Leica,) yardımıyla, poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine 18 mikrometrelik koronal kesitler alındı. Kesit alınacak bölgeler, Paxinos ve Franklin'in beyin atlası ("The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates") referans alınarak seçildi. Kesit alma işlemi, kesitlerin Poli-L-lizin kaplı lam üzerine fiske olması amacıyla, 30 dk boyunca 40 °C'de ısıtıcı üzerinde inkübe edilmesiyle sonlandırıldı. Alınan kesitler, immünohistokimya deneyleri yapılanaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. İmmünohistokimya ile boyanacak kesitler, boyama öncesinde kuruması için 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, 4% paraformaldehit çözeltisi içerisinde 15 dk çalkalanarak inkübe edildi. PFA inkübasyonu sonrasında, PFA'nın tamamen uzaklaştırılması için lamaların dizili olduğu şale yatağı değiştirilerek 5 dk su ile, ardından 3 kere de 5'er dk 100 rpm'de PBS içerisinde çalkalandı. Kesitlerin alınması ve fiksasyon steplerini takiben, hücre içi peroksidaz enzimlerinin bloke edilmesi amacıyla hidrojen peroksit bloklaması yapıldı ve ardından serum (at) ile bloklandı. Doku etrafındaki fazla PBS süzülerek hidrofobik kalem ile doku çevresi çizildi ve nemlendirilmiş bir kutu içerisinde, oda sıcaklığında shaker üzerinde bir saat blok solüsyonu ile inkübe edildi. Primer antikorlar uygun dilüsyonda +4C de gece boyu inkübe edildi (IL6, 1:500 ; A-beta, 1:500). Streptavidin-Biotin



Peroksidaz sistemine dayalı immünohistokimyasal boyamalar Vectastain (VectorLabs, PK-7800) kiti yardımıyla yapıldı. Bir kez PBS ile 5dk yıkanan dokular, 10 dk boyunca biotin bağlı sekonder antikorlar ile inkübe edilmiştir. Bir kez PBS ile 5 dk yıkanan dokular, streptavidin/peroksidaz kompleksi ile 5 dk inkübe edilmiştir. Bağlanmayan materyaller PBS yıkaması ile uzaklaştırılır ve peroksidaz substratı olan DAB (VectorLabs, SK-4100) ile istenilen koyuluğa gelene kadar inkübe edildi. Mounting Medium ile muamele edilip lamel ile kapatılan örnekler, AxioZoomV16 (Zeiss) stereo mikroskobu kullanılarak 100X magnifikasyon ile görüntülendi.

#### **5.2.4. Beyin perfüzyatı örneklerinin toplanması**

Fareler, serum fizyolojik (%0,9 NaCl) içinde çözülen Ketamin (100mg/kg) ve Xylazin (20mg/kg) intraperitonel yolla enjekte edilmesiyle anestezi altına alındılar. Anestezinin derinliği kuyruk refleksinin olmaması ile doğrulandı. Anestezi yapıldıktan sonra analjezik olarak Lornoksikam (Xefo; 0.2mg/100g, i.p.) uygulandı. Kafa derisinde 1-1.5 cm uzunluğunda açılan bir insizyonu takiben mikrodril yardımıyla kafatasında delik açılarak elde üretilen push-pull probu hipokampus'un CA1 bölgesine (koordinatlar: bregma sıfır (0) noktası kabul edildiğinde ön-arka -2mm, lateral -2mm ve duranın altında vertikal olarak -1.5mm) yerleştirildi. İntrakraniyal implantasyonlar fareleri stereotaksik çerçeve (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) içine yerleştirmek suretiyle yapıldı. Beyin perfüzyatı fare anestezi altındayken toplandı. Push-Pull perfüzyon işlemi fizyolojik Krebs çözeltisinin bir perfüzyon pompası (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) yardımıyla 5ul/dk hızında verilmesi ile yapıldı. Her fareden 3 örnek (3x40ul) toplandı. Perfüzyon işlemi bittikten sonra prob çıkarılıp, post-translasyonel modifikasyon analizleri için hipokampusleri disekte edilerek donduruldu.

#### **5.2.5. Ekstrasellüler sıvının LC-MS/MS analizi**

Push-pull yöntemi ile elde edilen numunelerden proteinler, SDS ve DTT karışımı ile ekstrakte edilip, iyodoasetamid ile alkilendikten sonra tripsin ile peptitlerine parçalandı. Oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlandı. Asetonitril yüzdesi 3-40 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlanmış ve ESI iyonlaşması sonucu kütle

spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, m/z 50-1900 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı. Protein tanımlamaları yapılırken SwissProt protein veri bankasındaki fareye ait protein sekans bilgisi kullanıldı. ProgenesisQI yazılımı kullanarak ekspresyon farklılıklarının istatistiksel analizi yapıldı. LC-MS/MS analizi sonrasında, kontrol ve 5XFAD fareler arasında farklılık olup olmadığını denetlemek ve gruba uymayan hatalı fare olasılığını kontrol etmek için PCA analizi gerçekleştirildi. Ekspresyonu artan ve azalan proteinler “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA) yazılımı ile yolak analizine tabi tutuldu. Ortak ve ilişkili yolakların belirlenmesinde Panther Classification System 10.0(online) ve Reactome V59 (online) veri bankaları kullanıldı.

#### **5.2.6. ICP-MS ile demir miktarının belirlenmesi**

50 ul hipokampus homojenizatı, 1ml suprapur konsantre nitrik asit (65%, Merck, USA) ile birleştirilerek parçalama kaplarına alındı. Parçalama işlemi için, 16 teflon parçalama kaplı rotor içeren Titan MPS (Perkin elmer, USA) mikrodalga parçalama sistemi kullanıldı. 3 aşamalı doku parçalama programı uygulandı. 15 dk soğutulan kaplardan alınan parçalama solüsyonları, temiz bir santrifüj tüpüne alındı ve dH<sub>2</sub>O ile dilüe edildi. ICP-MS analizi öncesi, örnekler 0.45 um çaplı Millipore membranları ile filtrelendi. Kalibrant, internal standartlar ve yıkama solüsyonları için 1% suprapur nitric asit kullanıldı. ICP-MS analizi Perkin-Elmer Nexion 350D cihazı ile yapıldı. Demir analizi için basılıca iki ana izotop (m/z 56 and 57) ölçüldü.

#### **5.2.7. 2D-SDS-PAGE**

Hipokampus dokuları, sıvı azotta dondurularak metal boncuklar yardımıyla homojenize edildi. Homojenizatlar, 200 ul tampon çözelti (7M üre, 2M tioüre, 4% CHAPS, 120 mM DTT, 2% amfolit, proteaz&fosfotaz inhibitörü) ile lize edildi. +4C’de 30 dk inkübe edilen örnekler, 14.000xg’de +4C de 1 saat santrifüj edilerek supernatantı yeni tüpe alındı. Bradford ile protein konsantrasyonları ölçülen örneklerden 100 ug alınarak liyofilize edildi. 230 ul rehidrasyon solüsyonunda (8M

üre, 2%CHAPS, 0,5% amfolit, 0,002% bromofenol mavisi) çözülen örnekler, IPG striplerle (Biorad, 3-10 NL, 11cm) yaklaşık 10 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Rehidrasyonu takiben, stripler izoelektrik odaklama kuyularına alınarak, kurumayı önlemek ve ısının dağılması amacıyla mineral yağ ile kaplanarak Tablo 5.2.7.1'deki koşullarda izoelektrik odaklanması yapıldı ve proteinlerin pH noktalarına göre ayrışmaları sağlandı (Biorad, Protean i12 IEF Cell System). Stripler, SDS-PAGE öncesi dengeleme solusyonlarından (Sol1: 6M üre, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 30% gliserol, 2% SDS, 1% DTT; Sol2: 6M üre, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 30% gliserol, 2% SDS, 4.5% IAA) geçirildi. SDS-PAGE aşaması için Criterion TGX (Biorad, 4-20% gradient) hazır jelleri kullanıldı. Strip, low melt agaroz ile jel üzerine sabitlendi. Jeller, +4C'de 120 V'da 2 saat yürütüldü. Fosfoproteinlerin analizi için jeller, 50% metanol ve 10% asetik asit ile iki kez 30 dk inkübe edilerek fikse edildi. ddH<sub>2</sub>O ile fiksasyon solusyonu yıkanarak fosfoproteinleri boyayan ProQ Diamond ile 90 dk oda sıcaklığında boyamaya bırakıldı. 20% ACN, 50 mM sodium asetat (pH:4) ile fazla boya uzaklaştırıldı ve ChemiDoc (Biorad) ile görüntüleme yapıldı. Fosfoprotein görüntüleme sonrasında, total protein ekspresyon değişimini görmek amacıyla, gece boyu SyproRuby boyasında +4C'de inkübe edilen jeller, 10% metanol ve 7% asetik asit ile yıkandı ve ChemiDoc ile görüntülemesi yapıldı. Ekspresyonu farklı olmayıp fosfo boyaması ile farklı miktarlarda görünen spotlar, UV altında 2 mm çapa sahip spot kesici ile LoBind (Eppendorf) tüplere alındı.

**Tablo 5.2.7.1:** İzoelektrik odaklama aşamaları.

Step	Volt	Mod	Süre
1	100	Rapid	2 sa
2	200	Rapid	1 sa
3	500	Rapid	1 sa
4	1000	Rapid	1 sa
5	1000-3000	Gradient	1 sa
6	3000-8000	Gradient	3 sa
7	8000	Rapid	7 sa

### **5.2.8. Jel spotundan peptit örneği hazırlama**

Jel parçaları bulunan tüplere ACN:100mM Amonyum Bikarbonat (1:1 karışım) ilave edildi ve boya temizlenene kadar solusyon tazelenerek devam edildi. Solusyon, ACN eklenerek ortamdan uzaklaştırıldı ve 50C'ye ısıtılarak kurutuldu. 10mM DTT ilave edilerek 80C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından, 55mM IAA eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 20 dk inkübe edildi. DTT ve IAA pipet ile uzaklaştırıldı ve jel parçaları iki defa 50 ul 50 mM ABC ile yıkandı. ACN ilave edilen jeller 50C'de kurutuldu. 50 mM ABC içerisinde 20 ng/ul tripsin eklendi ve 37C'de gece boyu inkübe edilerek, proteinlerin triptik peptitlere parçalanması sağlandı. Triptik peptitler, 1% formic asit ve 2% ACN içeren çözelti ile jelden ekstrakte edildi. Liyofilize edilen örnekler 2 ul CHCA matriks (0.1% TFA ve 50% ACN içerisinde) ile çözülerek MALDI plakasına spotlandı. Kuruduktan sonra MALDI-TOF/TOF (ABSciex) ile analiz edildi ve protein tanımlamaları yapıldı.

### **5.2.9. OxiBlot analizi**

Okside olmuş proteinlerin analizi için OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore) kullanıldı. 20ug protein, 5 ul 12% SDS ile muamele edildikten sonra, kit içerisinde bulunan derivatizasyon solusyon ile oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Derivatizasyon, nötralizasyon solusyonu ile nötralize edildi ve direk olarak 12%'lik SDS poliakrilamid jele yüklendi. 80 V'da 2 saat yürüyen jel, TransBlot Turbo transfer sistemi (Biorad) ile PVDF membrane transfer edildi. PBS-t içerisinde 1% BSA çözeltisi ile 1 saat bloklanmış membranlar gece boyu primer antikor olan  $\alpha$ -DNP (1:500) ile inkübe edildi. PBSt ile yıkanmış membranlar sekonder antikor (1:500) ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. ECL substrat inkübasyonunun ardından ChemiDoc sistemi ile görüntüleme yapıldı.

### **5.2.10. Beyin omurilik sıvısı ve post-mortem doku örneklerinin LC-MS/MS analizi**

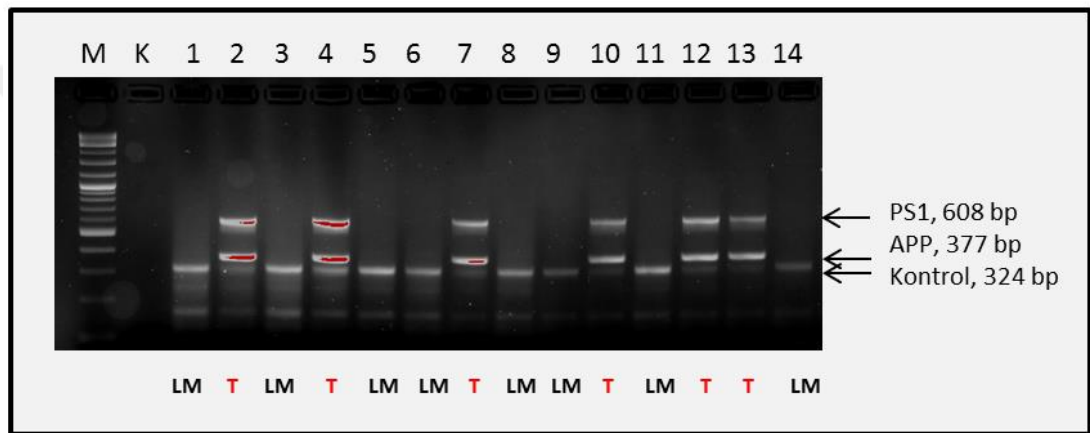
Ljubljana Üniversitesi'ndeki proje ortaklarımız tarafından temin edilen BOS ve Postmortem doku örnekleri liyofilize edilerek Türkiye'ye transfer edildi. Örnekler, UPX çözeltisi (Expedeon, UK) ile 100 °C'de 10 dk kaynatıldı. +4 °C'de bir saat soğumaya bırakılan örnekler, 14.000 rpm'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi.

Supernatant alınarak, tuzları uzaklaştırmak ve tamponlamak amacıyla gece boyunca mikrodialize (Pure-A-Lyzer, Sigma) bırakıldı. Yeni tüplere aktarılan örneklerin, florasan boyama temelli Qubit 2.0 (LifeTechnologies) aracılığıyla protein konsantrasyon tayini yapıldı. 50 ug protein alınarak, triptik peptid elde etmek üzere FASP (Expedeon, UK) protokolü takip edildi. Özetle, proteinler 6M üre ile 30 kDa cut-off tüplerde yıkandı ve 10 mM iodoacetamid (IAA) ile karanlıkta 30 dk inkübe edilerek alkilasyonu tamamlandı. Yaklaşık 16-18 saat boyunca 37 °C'de, 1:100 (tripsin: protein) oranında tripsin ile inkübe edildi. Triptik peptitler kolondan geri kazanıldı ve Qubit 2.0 ile peptid konsantrasyonu ölçüldü. nanoLC/MS-MS analizi yapılacak peptid örnekleri, konsantrasyonları 100 ng/ul olacak şekilde 0,1% Formik asit ile muamele edilerek LC tüplerine konularak analize hazır hale getirildi. Oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanmıştır. Asetonitril yüzdesi 3-40 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlanmış ve ESI iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edilmişlerdir. Analiz esnasında, m/z 50-1900 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplanmıştır. 0,7sn kadar MS analizi gerçekleştirilmiş ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplanmıştır ardından 0,7sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Protein tanımlamaları yapılırken SwissProt protein veri bankasındaki insana ait protein sekans bilgisi kullanılmıştır. ProgenesisQI yazılımı kullanarak ekspresyon farklılıklarının istatistiksel analizi yapılmıştır. Yolak analizleri için IPA analiz programı kullanılmıştır.

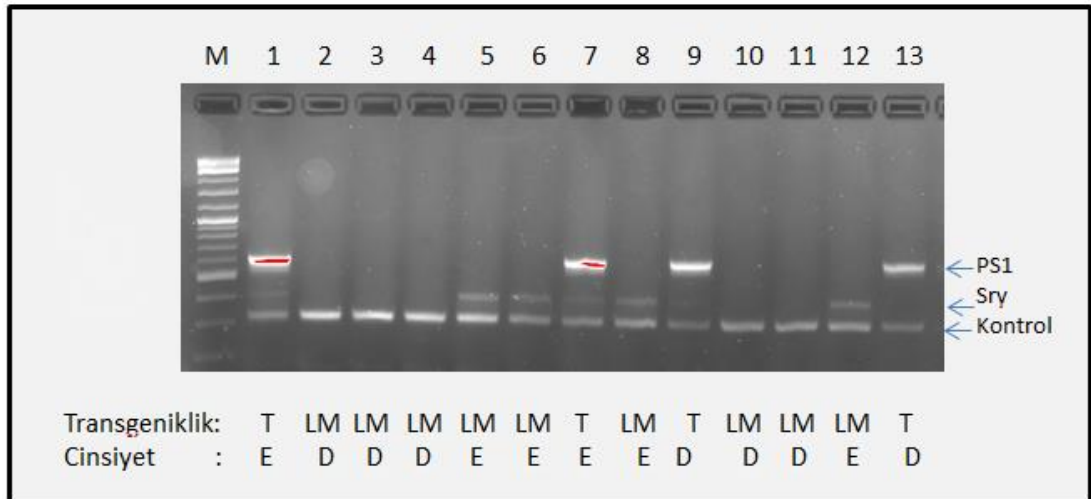
## 6. BULGULAR

### 6.1. Genotipleme ile transgenik hayvanların belirlenmesi

Transgenik ve transgenik olmayan kontrol grubu farelerin ayrılması için yapılan genotipleme sonucunda, Resim 6.1.1’de gösterildiği gibi, tek bantın olduğu kuyularda yürütülen örnekler transgenik olmayan (LM) hayvanlara aitken, 3 bant gözlemlenen örneklerin transgenik hayvanlara (T) ait olduğu belirlendi. Cinsiyetin moleküler olarak analiz edilmesi, anatomik tanıya ek olarak kullanıldı (Resim 6.1.2).



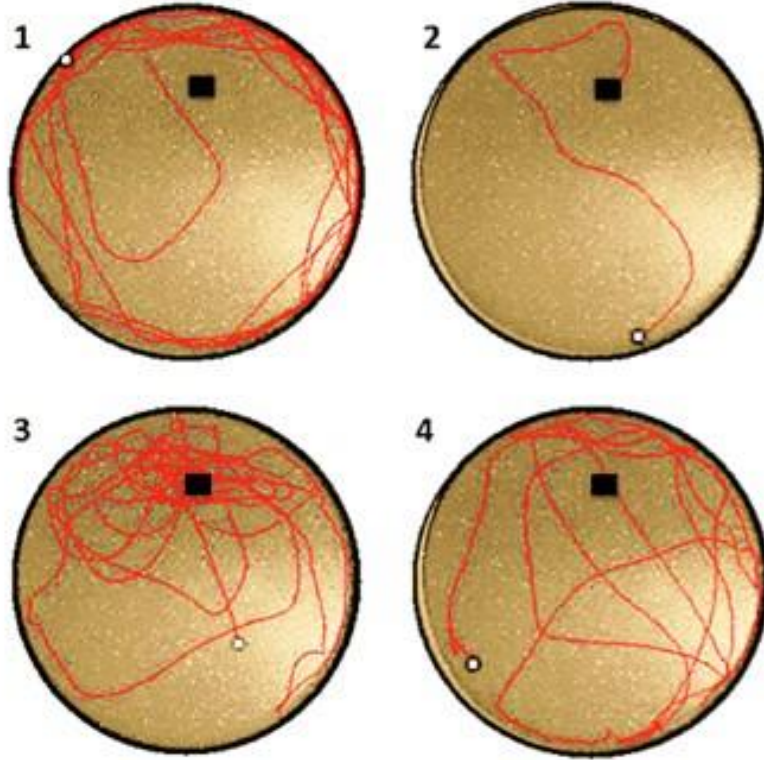
**Resim 6.1.1:** Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin analizi. (*M*, marker; *K*, kontrol örneği; *LM*, transgenik olmayan LitterMate fare; *T*, transgenik fare)



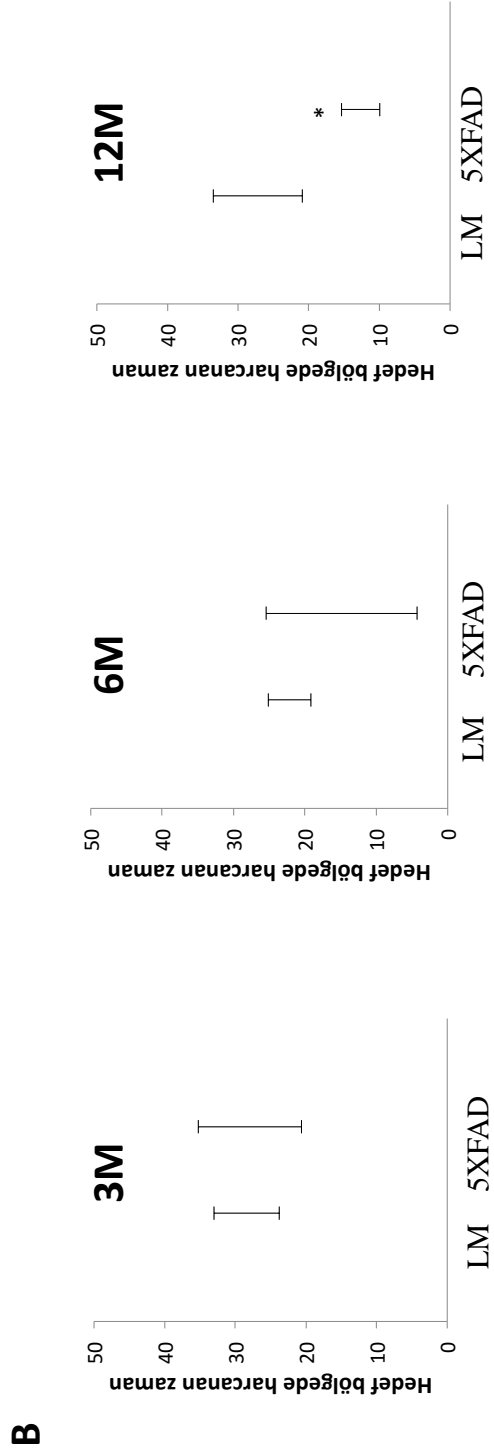
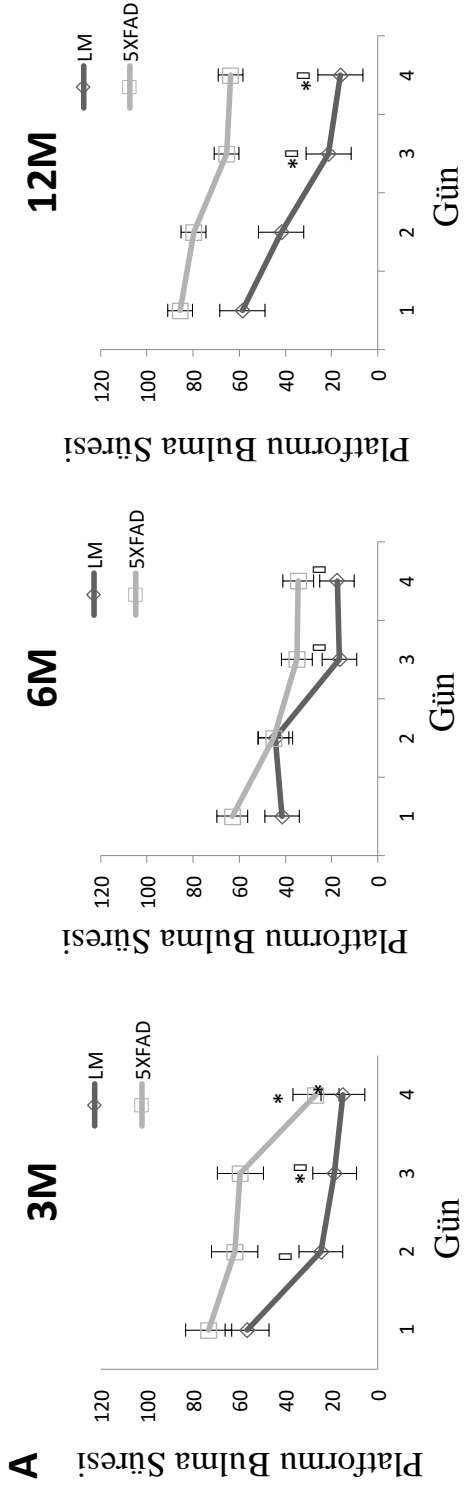
**Resim 6.1.2:** Transgeniklik ve cinsiyet analizi sonuçları. (*M*, marker; *K*, kontrol örneği; *LM*, transgenik olmayan “LitterMate” fare; *T*, transgenik fare; *D*, dişi; *E*, erkek)

## 6.2. 3, 6 ve 12 aylık farelerin MWM hafıza testi

Ekstraselüler matriksin alınmasından önce, farelerin kognitif bozulmalarının test edilmesi amacıyla Morris Su Tankı deneyleri gerçekleştirildi. Şekil 6.2.1’de ki daireler su tankını, siyah kareler gizli platformun yerini (hedef kadran), kırmızı çizgiler ise farenin hareket ettiği yerleri göstermektedir. Şekil 6.2.1/1’e göre, 3 aylık kontrol hayvanı ilk gün platform bulamazken, 4. gün sonunda platform hızlıca bulmaktadır (6.2.1/2). Platformun kaldırıldığı hafıza fazında ise normal hayvan (6.2.1/3) platformun önceden var olduğu bölgede yüzerken, aynı yaştaki 5XFAD (6.2.1/4) platformun yerini hatırlamayıp rastgele yüzmektedir. Bu veriye göre hayvanların hafızalarında bozulmalar, 3 ay da kendini göstermektedir. 3,6 ve 12 aylık hayvanların, ilk 4 gün boyunca platform ulaşma süreleri ve hedef kadranda kalma süreleri hesaplanmıştır (Şekil 6.2.2). 3 ve 6. aylarda hedef kadranda kalma sürelerinde istatistiksel anlamlılık görülmemesine karşın, platforma ulaşma süreleri ve 12. ayda hedef kadranda geçirdiği süre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmiştir.



**Şekil 6.2.1:** Morris Su Tankı deneyi görüntüleri. 1) 1.gün, 2) 4.gün, 3) hafıza fazı-öğrenen hayvan, 4) hafıza fazı-öğrenmeyen hayvan.

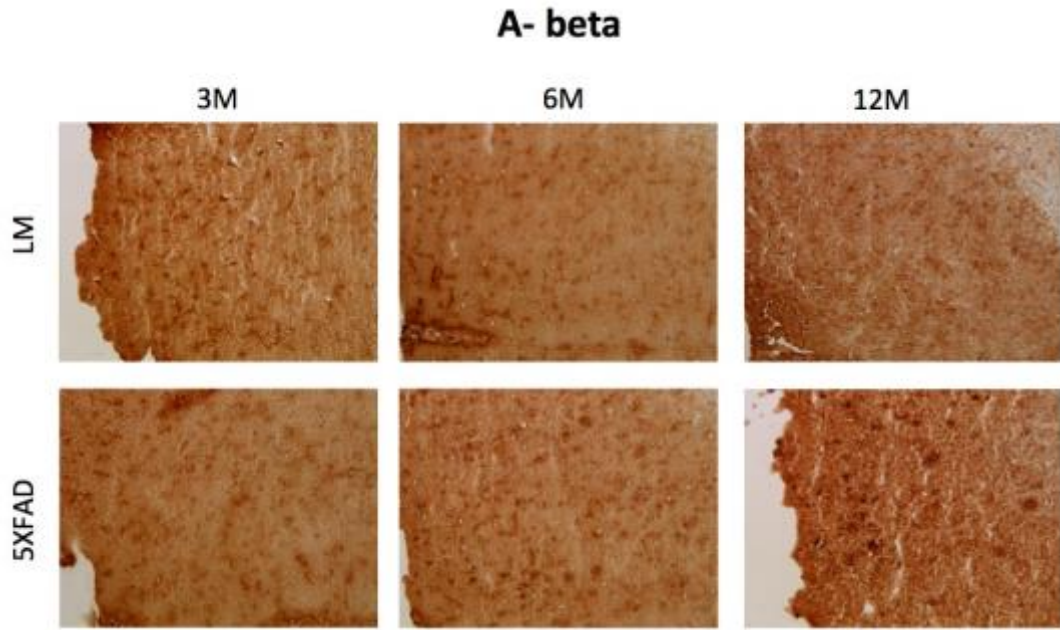


Şekil 6.2.2: 3,6 ve 12 aylık hayvanların MWM test sonuçları.



### 6.3. 3,6 ve 12 aylık farelerin beyin kesitlerinin immünohistokimya boyaması

Abeta miktarının artışı ve plak oluşumunun gözlemlenmesi amacıyla, 3, 6 ve 12 aylık hayvanlardan alınan beyin kesitleri Abeta antikoruna karşı immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Resim 6.3.1'de yer alan doku boyamalarının mikroskopik görüntülerine göre, Abeta miktarı fareler 6 aylıkken artmaya başlanmış ama plak oluşumları 12 aylıkta gözlemlenmiştir.



**Resim 6.3.1:** 3,6 ve 12 aylık hayvanlara ait Abeta proteininin immünohistokimya boyaması.

### 6.4. 3,6 ve 12 aylık farelerin ECM protein ekspresyon analizi

#### 6.4.1. LC-MS/MS ile tanımlanan anlamlı proteinler

5XFAD ve kontrol farelerinden, intraserebral 'push-pull' perfüzyon yöntemi ile toplanan ekstraselüler matrikslerin nanoLC-MS/MS ile analizi sonucunda 3, 6 ve 12 aylık hayvanların örneklerinden sırasıyla 251, 213 ve 238 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin tam listesi Tablo 9.1'de (Ekler) sunulmuştur. Tanımlanan proteinler içinde kontrol ve 5XFAD arasında istatistiksel anlamlılık gösteren protein sayısı ise sırasıyla 68, 41 ve 33'tür. Tablo 6.4.1.1, 6.4.1.2 ve 6.4.1.3'de anlamlı değişen proteinlerden bazılarının listesi, ekspresyon değişimlerinin oranları

(fold change) ve  $p$  değerleri yer almaktadır. Değişim oranları  $>1$  olanlar 5XFAD'de miktarı o oranda artışı, 0-1 arası olanlar 5XFAD'de o oranda azalışı ifade etmektedir.

**Tablo 6.4.1.1:** 3 aylık farelerin ECM örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi ( $p \leq 0.05$ , ekspresyon değişim oranı  $\geq 40\%$ ). 0-1 arasındaki değişim oranı, 5XFAD farelerinde ekspresyon azalışını,  $>1$  değişim oranı 5XFAD farelerinde ekspresyon artışını temsil etmektedir.

Erişim No	Protein İsmi	Anova (-p değeri)	Değişim Oranı
Q6GQT1	Alpha-2-macroglobulin-P	5.94E-03	0.24
Q03734	Serine protease inhibitor A3M	2.33E-02	0.24
P58465	CTD small phosphatase-like protein	5.72E-03	0.35
B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	3.97E-03	0.19
Q8VCC2	Liver carboxylesterase 1	1.20E-02	0.19
Q5SX39	Myosin-4	1.27E-03	0.52
O08983	Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein homolog	4.02E-02	0.41
Q8R1Q0	Syntaxin-19	3.71E-03	0.48
Q0QWG9	Delphinin	4.76E-02	0.55
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	1.18E-03	0.30
Q8VCT4	Carboxylesterase 1D	1.08E-02	0.23
P17182	Alpha-enolase	1.40E-02	0.53
Q9R0P9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	4.57E-02	0.34
P07759	Serine protease inhibitor A3K	4.25E-02	0.41
P17183	Gamma-enolase	4.31E-02	0.51
P01872	Ig mu chain C region	4.38E-02	0.47
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	3.68E-03	0.41
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1.88E-02	0.53
P23953	Carboxylesterase 1C	2.04E-02	0.23
P08032	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	4.72E-02	0.49
P00920	Carbonic anhydrase 2	1.49E-02	0.49
Q61838	Alpha-2-macroglobulin	4.49E-02	0.46
P07724	Serum albumin	3.49E-02	0.57
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	2.73E-03	26.47
Q9ESB3	Histidine-rich glycoprotein	3.66E-03	Infinity
P21460	Cystatin-C	4.41E-03	2.75
Q3TTY5	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	4.68E-02	3.26
P01878	Ig alpha chain C region	6.40E-03	8.49
Q3U285	Ligand-dependent nuclear receptor corepressor-like protein	8.65E-03	10.29
P68369	Tubulin alpha-1A chain	1.97E-03	22.27

P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	2.15E-03	6.10
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	6.05E-03	7.04
P01631	Ig kappa chain V-II region 26-10	9.13E-03	3.90
P70339	Proto-oncogene FRAT1	9.55E-03	33.64
O08709	Peroxiredoxin-6	1.74E-02	5.01
P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18	1.81E-02	4.46
Q9JIY0	Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	2.46E-02	25.29
Q6NXH9	Keratin, type II cytoskeletal 73	2.51E-02	2.18
P19001	Keratin, type I cytoskeletal 19	3.41E-02	3.06
Q8CFY5	Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	3.52E-02	14.30
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	3.59E-02	2.36
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	2.09E-02	3.43
P09813	Apolipoprotein A-II	5.58E-04	17.36
P20918	Plasminogen	1.20E-03	10.49
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	1.01E-02	3.55
Q61646	Haptoglobin	3.51E-02	2.80
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	1.25E-02	9.19
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	2.70E-02	5.86
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5.20E-03	12.62
P19426	Negative elongation factor E	1.28E-02	24.05
P17897	Lysozyme C-1	2.72E-02	2.42
O08677	Kininogen-1	3.18E-02	9.26
P28666	Murinoglobulin-2	4.85E-02	3.24
P52480	Pyruvate kinase PKM	4.91E-02	12.37
Q6IFX2	Keratin, type I cytoskeletal 42	3.56E-03	62.59
P01864	Ig gamma-2A chain C region secreted form	7.20E-03	3.93
Q61171	Peroxiredoxin-2	1.64E-02	6.70
P50446	Keratin, type II cytoskeletal 6A	4.51E-02	10.43
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	9.99E-05	6.19
P01867	Ig gamma-2B chain C region	4.13E-03	4.95
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	8.50E-04	21.14
P02535	Keratin, type I cytoskeletal 10	3.24E-02	6.60
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	1.81E-02	2.83
Q04447	Creatine kinase B-type	1.33E-03	10.03
P04919	Band 3 anion transport protein	9.14E-03	9.75
P01027	Complement C3	1.47E-02	13.17
P01942	Hemoglobin subunit alpha	6.12E-03	8.86
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	2.03E-02	6.97

**Tablo 6.4.1.2:** 6 aylık farelerin ECM örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi ( $p \leq 0.05$ , ekspresyon değişim oranı  $\geq 40\%$ ). 0-1 arasındaki değişim oranı, 5XFAD farelerinde ekspresyon azalışını,  $>1$  değişim oranı 5XFAD farelerinde ekspresyon artışını temsil etmektedir.

Erişim No	Protein İsmi	Anova (-p değeri)	Değişim Oranı
B5X0G2	Major urinary protein 17	2.78E-05	0.41
Q6PDM1	Male-specific lethal 1 homolog	1.17E-04	0.38
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	1.24E-03	0.23
P58465	CTD small phosphatase-like protein	4.20E-03	0.18
P61982	14-3-3 protein gamma	5.34E-03	0.17
Q99N03	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 10	2.96E-02	0.49
Q03717	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	4.61E-04	0.52
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	2.22E-03	0.60
Q3UDP0	Isoform 2 of WD repeat-containing protein 41	5.51E-03	0.15
Q9DBQ7	Protein-associating with the carboxyl-terminal domain of ezrin	7.08E-03	0.30
Q7TSD4	Protein TBATA	3.14E-03	0.23
Q02257	Junction plakoglobin	1.94E-02	0.34
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	2.72E-03	0.40
Q5SVT3	Isoform 2 of Ewing's tumor-associated antigen 1 homolog	1.38E-02	0.27
Q0QWG9	Delphinin	2.71E-04	0.23
Q8R1Q0	Syntaxin-19	1.78E-03	0.28
B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	4.84E-03	0.25
Q6IFZ6	Keratin, type II cytoskeletal 1b	2.74E-02	0.60
P21614	Vitamin D-binding protein	3.38E-04	0.55
P01872	Ig mu chain C region	7.00E-04	0.19
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1.44E-02	0.34
P28665	Murinoglobulin-1	6.03E-03	0.71
P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	8.40E-03	0.27
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	9.04E-03	0.29
P60710	Actin, cytoplasmic 1	2.98E-02	0.29
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	1.83E-03	0.21
Q923D2	Flavin reductase (NADPH)	1.53E-02	0.39
P03995	Glial fibrillary acidic protein	5.32E-03	0.31
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	5.04E-04	0.26
P23953	Carboxylesterase 1C	8.56E-03	0.64
Q91X72	Hemopexin	4.20E-02	0.39

P07724	Serum albumin	4.94E-02	0.48
Q3UR70	Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1	5.23E-03	2.02
P08730	Keratin, type I cytoskeletal 13	7.21E-03	1.67
P01631	Ig kappa chain V-II region 26-10	2.04E-02	5.04
Q8BHW6	Spermatogenesis-associated protein 21	3.01E-03	1.51
P09813	Apolipoprotein A-II	2.28E-02	45.45
P20918	Plasminogen	2.89E-02	6.43
P17183	Gamma-enolase	3.17E-02	1.41
P01867	Ig gamma-2B chain C region	2.94E-02	1.50
Q921I1	Serotransferrin	1.42E-02	1.42

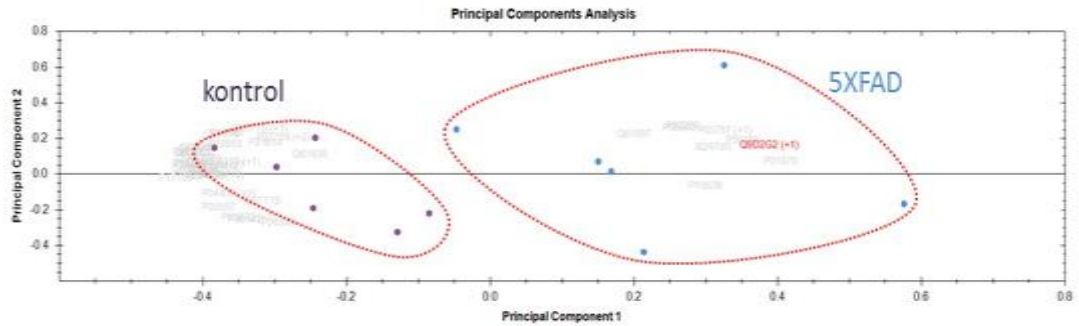
**Tablo 6.4.1.3:** 12 aylık farelerin ECM örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinlerin listesi ( $p < 0.05$ , ekspresyon değişim oranı  $> 40\%$ ). 0-1 arasındaki değişim oranı, 5XFAD farelerinde ekspresyon azalışını,  $> 1$  değişim oranı 5XFAD farelerinde ekspresyon artışını temsil etmektedir.

Erişim No	Protein İsmi	Anova (-p değeri)	Değişim Oranı
Q9ESB3	Histidine-rich glycoprotein	1.50E-02	0.27
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	3.48E-03	0.43
P61982	14-3-3 protein gamma	1.31E-02	0.33
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	1.22E-03	0.30
P01837	Ig kappa chain C region	3.80E-02	0.37
Q7TSD4	Protein TBATA	6.89E-03	0.41
Q02257	Junction plakoglobin	2.73E-02	0.40
Q8R1Q0	Syntaxin-19	3.15E-02	0.57
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	3.39E-02	0.33
Q60590	Alpha-1-acid glycoprotein 1	3.99E-02	0.32
Q0QWG9	Delphinin	1.71E-03	0.49
B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	2.74E-02	0.40
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	4.53E-02	0.43
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	1.21E-02	0.46
P62204	Calmodulin	4.78E-02	0.59
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	3.34E-02	0.41
P01872	Ig mu chain C region	1.74E-03	0.39

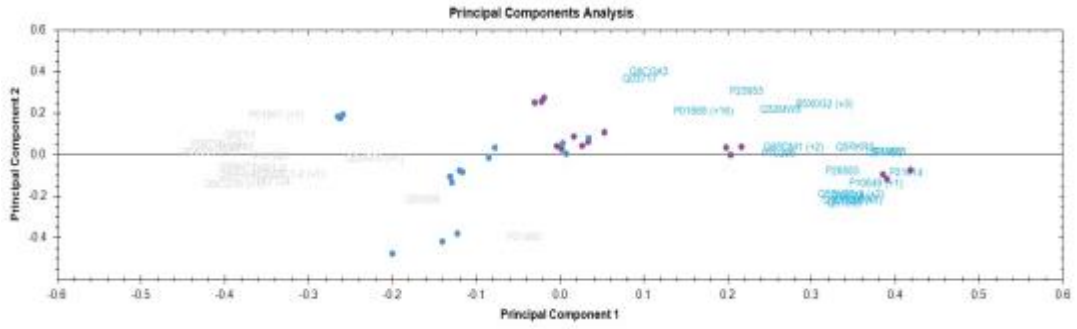
P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	1.63E-02	0.47
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	3.76E-03	0.45
Q03734	Serine protease inhibitor A3M	8.69E-03	0.27
P60710	Actin, cytoplasmic 1	2.78E-02	0.34
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	3.66E-03	0.41
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4.01E-02	0.55
P07759	Serine protease inhibitor A3K	2.62E-02	0.20
P07724	Serum albumin	4.37E-03	0.56
Q9WV06	Ankyrin repeat domain-containing protein 2	3.33E-03	1.87
Q6VGS5	Isoform 2 of Protein Daple	1.30E-02	2.97
P68369	Tubulin alpha-1A chain	2.35E-02	3.51
Q9JIY0	Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	4.35E-02	2.39
Q52KR3	Protein prune homolog 2	1.37E-02	1.59
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	4.10E-02	1.62
Q810U4	Neuronal cell adhesion molecule	3.53E-02	2.41
P19426	Negative elongation factor E	4.21E-02	2.88

#### 6.4.2. ECM proteomlarının PCA analizleri

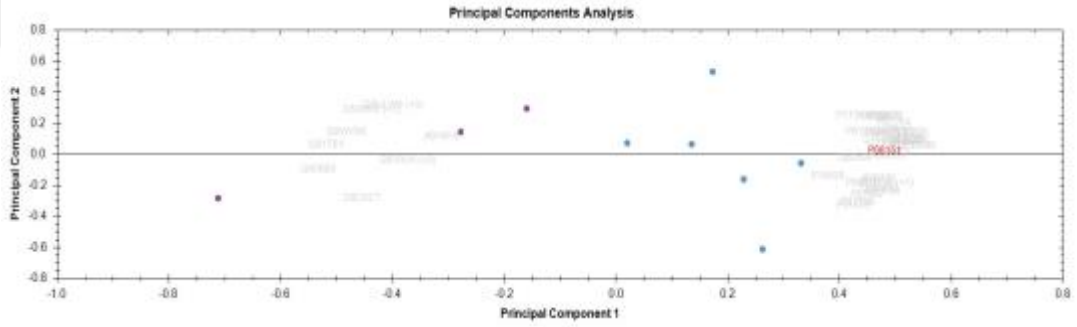
3, 6 ve 12 aylık hayvanların perfüzet örneklerinden tanımlanan ve anlamlı değişen proteinlerin PCA analizi sonuçları Şekil 6.4.2.1, 6.4.2.2 ve 6.4.2.3'deki gibidir. ECM proteomlarındaki değişime göre birbirinden ayrılan grupların anlaşılır olması için 3 aylık ECM PCA analizinde kırmızı kesikli çizgiler ile çevrelenmiştir. Elde edilen PCA datalarına göre ECM proteomundaki değişim 3 aylıkken başlamıştır.



Şekil 6.4.2.1: 3 aylık ECM proteomlarına ait PCA analizi. Mor noktalar kontrol, mavi noktalar 5XFAD proteomunu temsil etmektedir.



**Şekil 6.4.2.2:** 6 aylık ECM proteomlarına ait PCA analizi. Mavi noktalar kontrol, mor noktalar 5XFAD proteomunu temsil etmektedir.

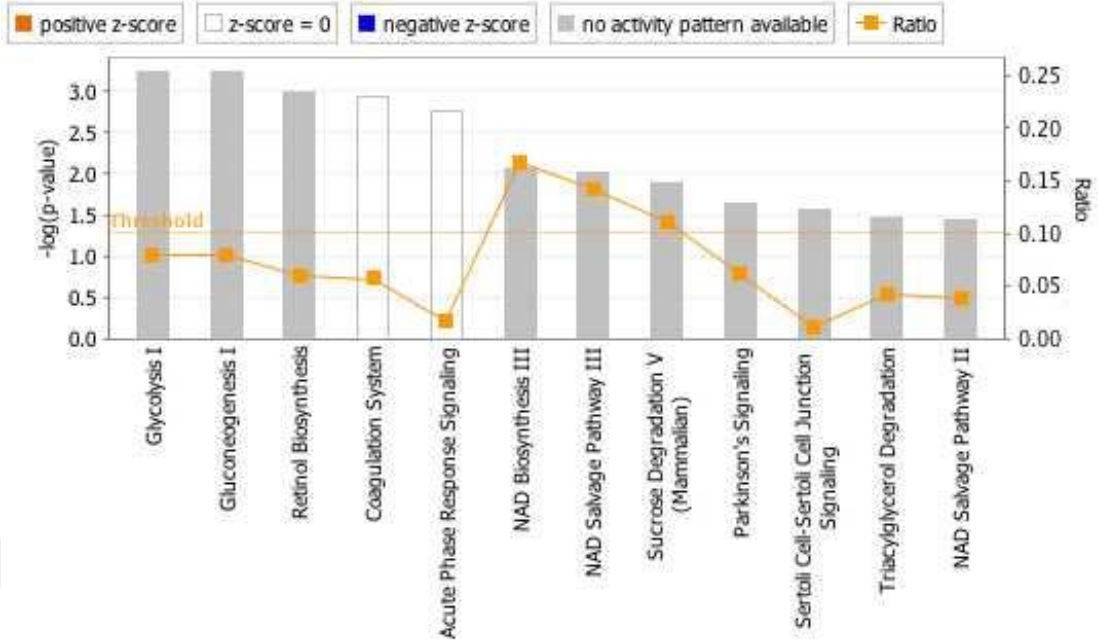


**Şekil 6.4.2.3:** 12 aylık ECM proteomlarına ait PCA analizi. Mor noktalar kontrol, mavi noktalar 5XFAD proteomunu temsil etmektedir.

### 6.4.3. ECM proteomlarına ait IPA analizleri

IPA, literatürde var olan bilgilere dayanarak, anlamlı değişen proteinlerin hangi yollarla ilişkili olabileceğini tahmin eden bir yazılımdır. 3, 6 ve 12 aylık hayvanların perfüzyon örneklerinden tanımlanan ve anlamlı değişen proteinlerin IPA yolak analizi sonuçları Şekil 6.4.3.1, 6.4.3.2 ve 6.4.3.3'deki gibidir. Her 3 grup da, temel olarak metabolizma ile ilgili yollarla ilişkilendirildi. 3 aylık proteomlar, glikoz metabolizması ile ilişkili görünürken, 6 aylık analizde yağ metabolizmasının etkilendiği görülmektedir.

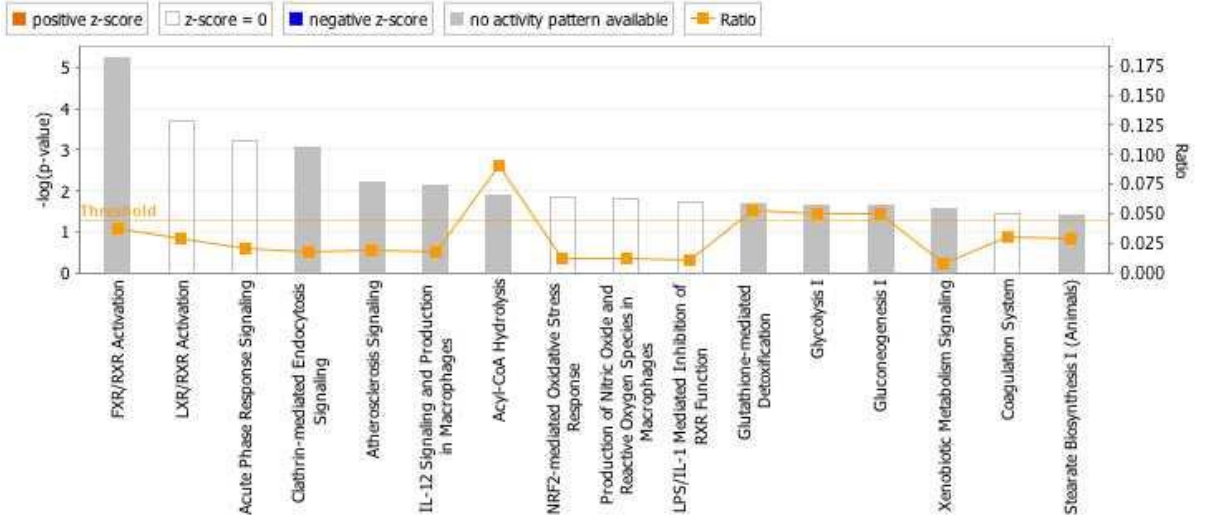
Analysis: ARRS\_ECM\_f\_3m\_rev.csv - 2015-06-02 02:34 PM



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Şekil 6.4.3.1: 3 aylık ECM proteomlarının IPA analizi.

Analysis: bg\_6mf\_ecm\_firsttrial - 2015-08-11 01:50 PM

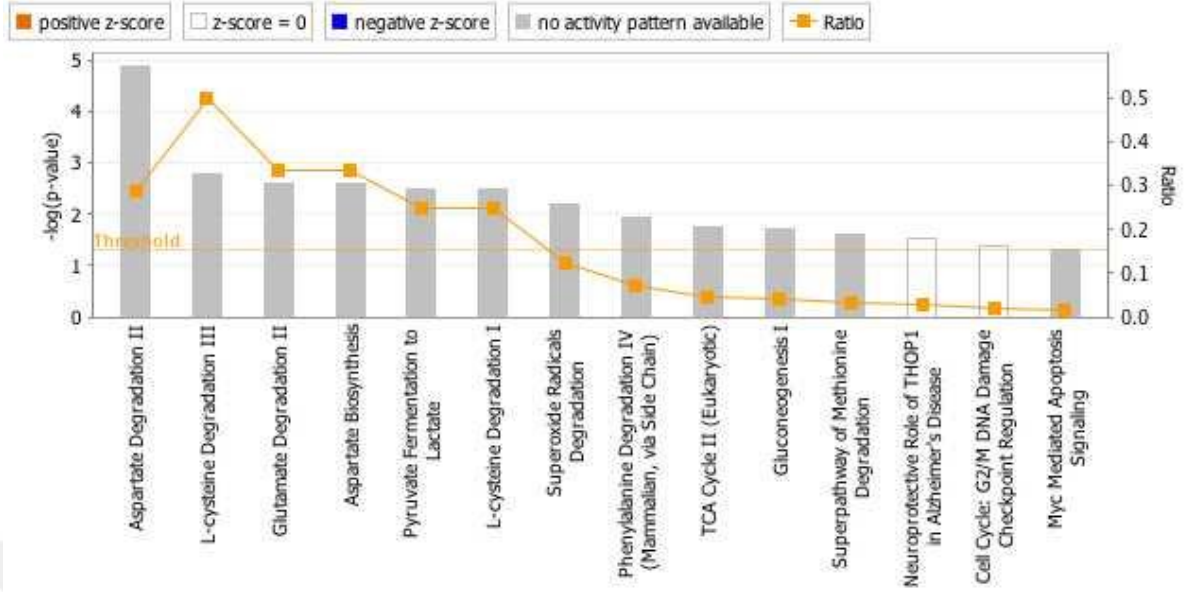


© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Şekil 6.4.3.2: 6 aylık ECM proteomlarının IPA analizi.



Analysis: 12mf\_protein\_IPArev - 2016-01-21 04:13 PM



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Şekil 6.4.3.3: 12 aylık ECM proteomlarının IPA analizi.

#### 6.4.4. Ortak ve evreye özgü protein ve yolların belirlenmesi

3, 6 ve 12 aylık farelerin ECM örneklerinde analiz edilen proteinlerden ortak olarak değişen proteinler tespit edildi (Tablo 6.4.4.1).

**Tablo 6.4.4.1:** 3,6 ve 12 aylık farelerin ECM örneklerinde ekspresyonu değişen ortak proteinlerin listesi.

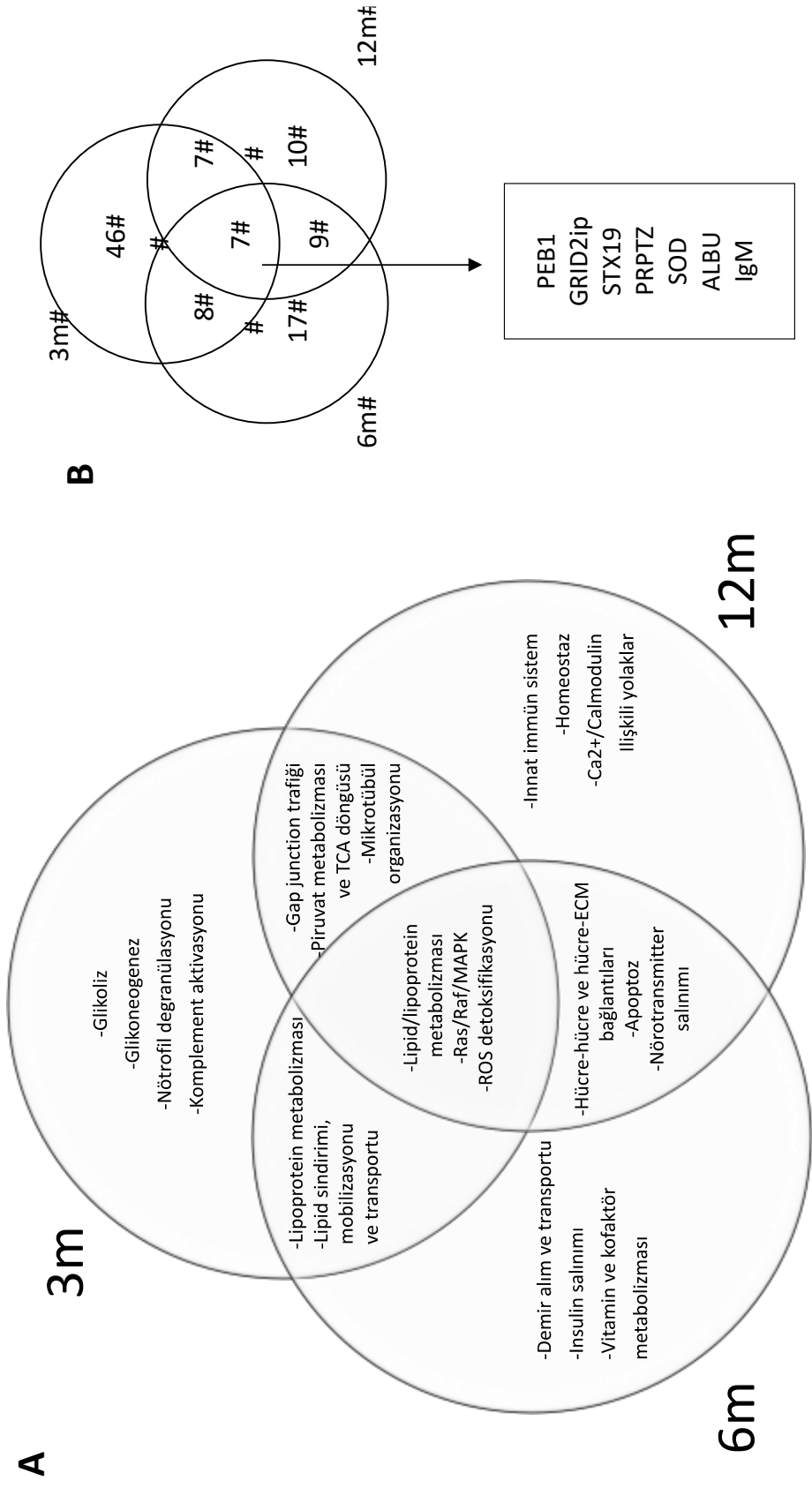
Protein Erişim Numarası		3 ay		6 ay		12 ay	
		Değişim Oranı	p değeri	Değişim Oranı	p değeri	Değişim Oranı	p değeri
PEB1	P70296	3.55	1.01E-02	0.61	2.22E-03	0.33	3.39E-02
GRID2ip	Q0QWG9	0.55	4.76E-02	0.23	2.71E-04	0.49	1.71E-03
STX19	Q8R1Q0	0.48	3.71E-03	0.28	1.78E-03	0.57	3.15E-02
PRPTZ	B9EKR1	0.19	3.97E-03	0.25	4.84E-03	0.40	2.74E-02
SOD	P08228	0.53	1.88E-02	0.26	5.04E-04	0.56	4.01E-02
ALBU	P07724	0.57	3.49E-02	0.48	9.98E-03	0.56	4.37E-03
IgM	P01872	0.47	4.38E-02	0.19	7.00E-04	0.39	1.74E-03

Ortak ve evreye özgü biçimde ekspresyonu değişen proteinlere dayanarak yapılan yolak analizleri sonucunda da, evreye özgü veya tüm evrelerde etkilenen yollar

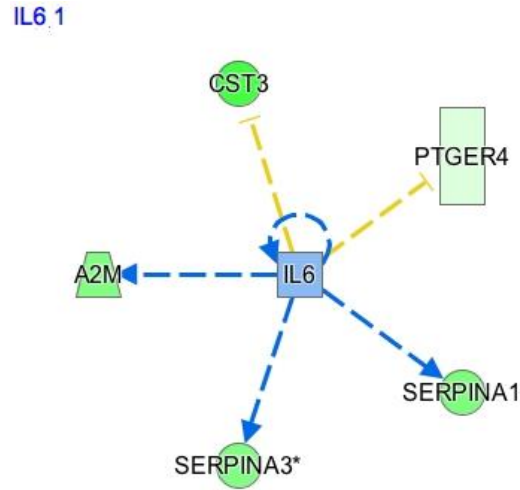
tespit edildi 3. ay da glikoz metabolizması ve immun sistem de değişimler görölürken, 6. aya doğru ilerledikçe lipid metabolizması ve metal, özellikle demir metabolizması yolakları etkilenmektedir. 12. aya doğru apoptosis ve neurotransmitter salınımı ile mekanizmaların etkilenmekte, 12. Ayda ise immun sistem ve Ca salınımı ile ilgili yolaklar etkilenmektedir (Şekil 6.4.4.1). Bu bulguların, yaşlanma süreciyle yakından ilişkili olduğu bilinse de LM ve 5XFAD lar arasında istatikselsel olarak anlamlı farklılıklar göstermesi bize patolojiyle olan ilişkisini işaret etmektedir. Her üç dönemde de etkilenen yolaklar ise lipid/lipoprotein metabolizması (özellikle RXR/LXR yolakları), Ras/Raf/MAPK yolağı ve ROS detoksifikasyonu olarak belirlendi.

### **6.5. 3 aylık hipokampal IL6 proteinin IHC analizi**

Yapılan IPA analizine göre, 3 aylık perfüzlarda tanımlanan ve ekspresyonu anlamlı değişen proteinlerden A2M, SERPINA1, SERPINA3, CST3 ve PTGER4'ün, Interleukin-6 (IL6) tarafından düzenlendiğine dair yolak analizi Şekil 6.5.1'deki gibidir. IL6'nın 3 aylık farelerin hipokampus ve korteks bölgesinde ekspresyonunun değişip değişmediğini test etmek amacıyla, doku kesitlerinde immunohistokimyasal boyama yapıldı ve hem korteks hem hipokampüste IL6 miktarında artış gözlemlendi (Resim 6.5.1).

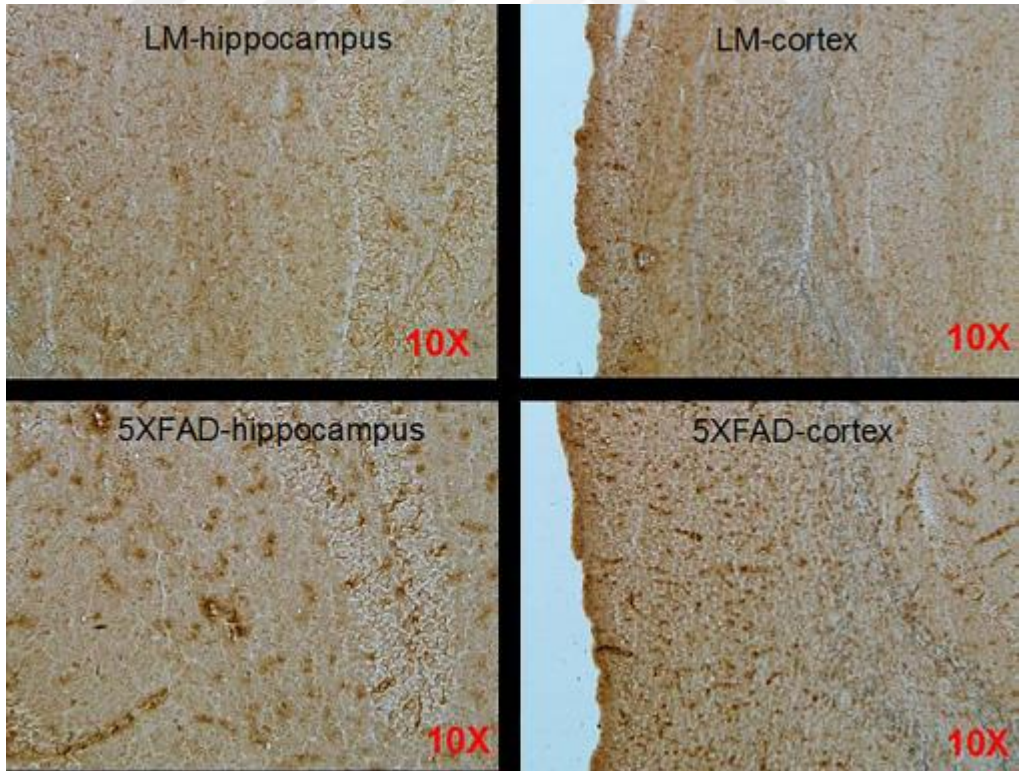


Şekil 6.4.4.1: 3, 6 ve 12 aylık evrelere özgü ve ortak yolları gösteren Venn diagramı.



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

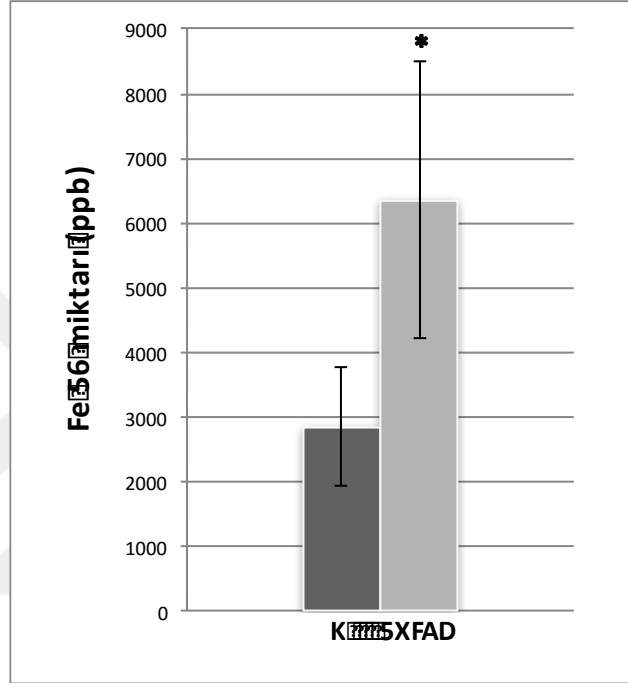
**Şekil 6.5.1:** Tanımlanan 3 aylık ECM proteinlerinin olası regülatör yolağı.



**Resim 6.5.1:** Kontrol ve 5XFAD fareleri hipokampus ve korteksinde IL6 boyaması.

### 6.6. 3 aylık hipokampal demir miktarının ICP-MS analizi

Daha önceki yayınlarda yer alan inflammasyon ve metal dishomeostasisi, özellikle demir metabolizması, arasındaki ilişki nedeniyle, IL6 miktarındaki artışa ek olarak, 3 aylık hipokampal dokularda demir miktarındaki değişim ICP-MS ile test edildi. Şekil 6.6.1’de, 5XFAD hipokampüsünde kontrole göre demir miktarındaki artış görülmektedir.



Şekil 6.6.1: 3 aylık hipokampal dokuda demir miktarı analizi. \*, istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder ( $p \leq 0.05$ ).

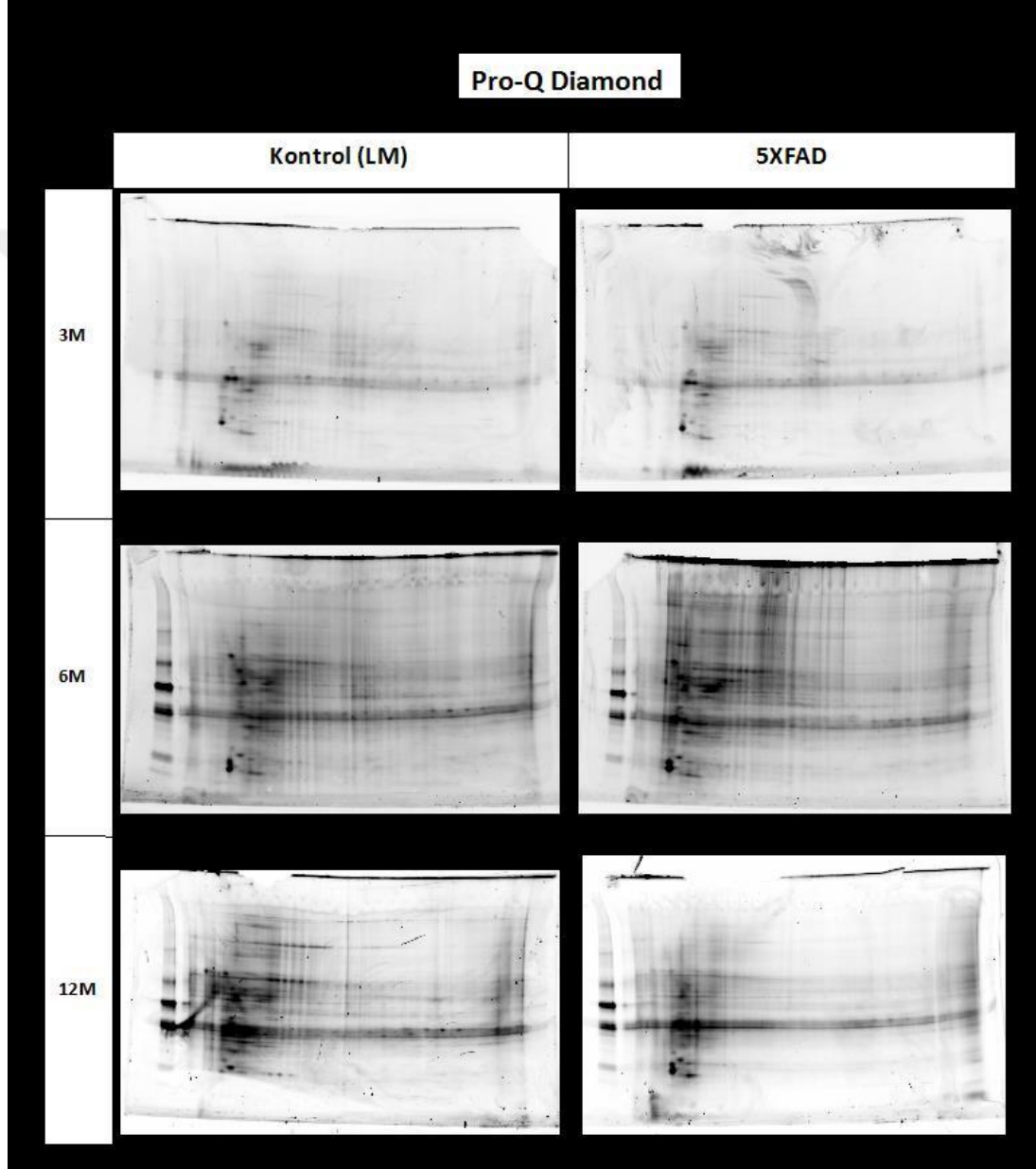
### 6.7. Fosfoproteom analizi

#### 6.7.1. 2D-SDS-PAGE ile fosfoprotein farklılıklarının tespiti

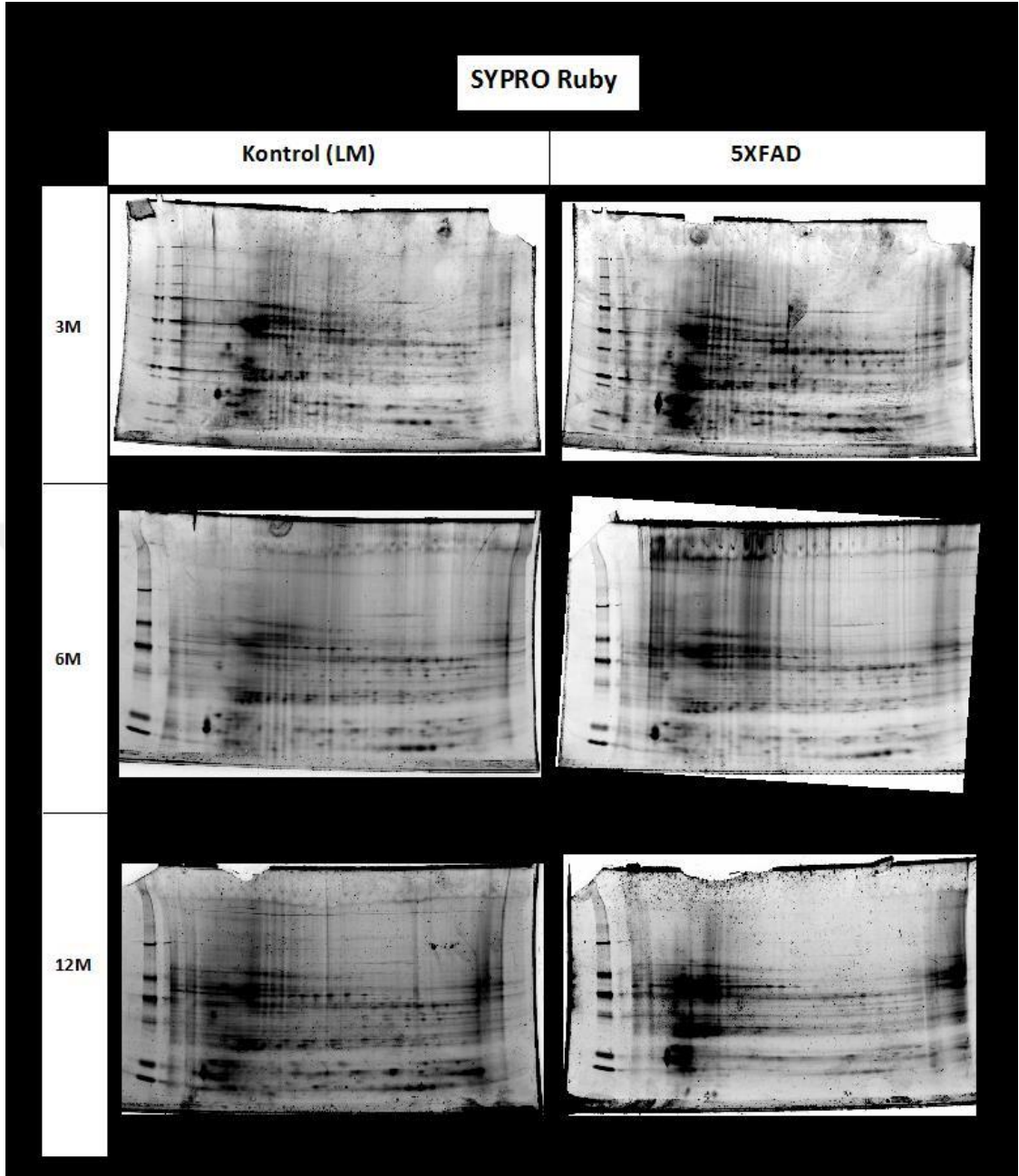
Perfüzatta elde edilen ECM protein miktarı, fosfoprotein tanımlaması için yeterli olmadığından, fosfoprotein analizleri total hipokampal doku lizatından yapıldı. 3, 6 ve 12 aylık kontrol ve 5XFAD hayvanlarının perfüzyon işlemi sonrası disekte edilen hipokampüslerinden 2D-SDS-PAGE yapıldı. ProQ Diamond ile boyanan fosfoproteinler (Resim 6.7.2.1) daha sonra SyproRuby ile boyanarak (Resim 6.7.2.2), ekspresyonu değişmemiş ancak fosforilasyonu farklı olan proteinler tespit edilerek spotlar kesildi.

### 6.7.2. Fosfoprotein spot tanımlamaları

Kontrol ve transgenik hipokampus dokuları arasında farklılık tespit edilen fosfoproteinler jelden kesilerek, jel içerisinde tripsinize edildi. Elde edilen triptik peptitler, MALDI-TOF-TOF ile tanımlandı. Tanımlanan proteinler Tablo 6.7.2.1’de yer almaktadır.



**Resim 6.7.2.1:** 3,6 ve 12 aylık lizatlarının 2D-SDS-PAGE ile fosfoprotein tespiti



**Resim 6.7.2.2:** 3,6 ve 12 aylık lizatlarının 2D-SDS-PAGE ile total protein tespiti.

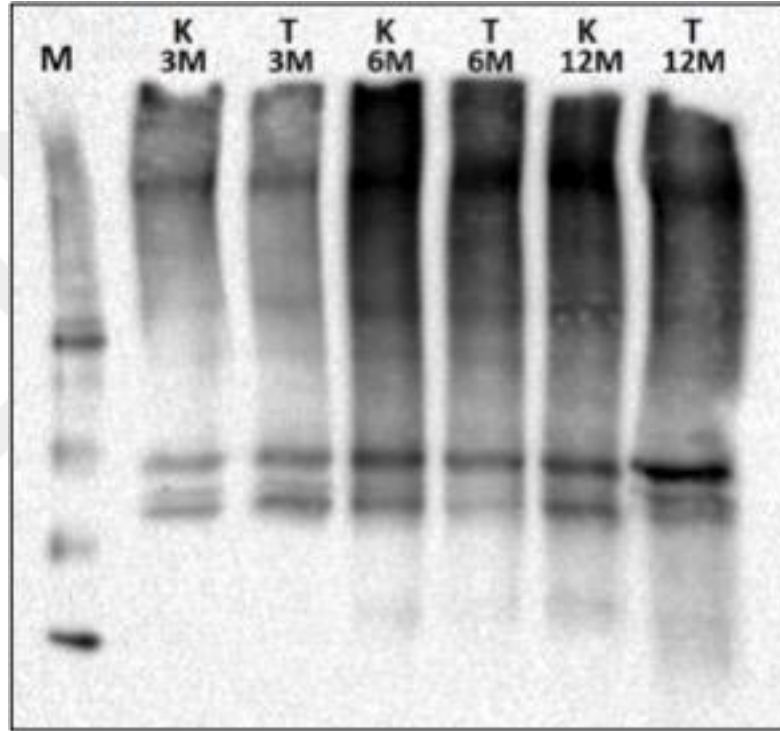
**Tablo 6.7.2.1:** Fosfoprotein spotlardan tanımlanan proteinler.

<b>SPOT ID</b>	<b>Tanımlanan protein</b>
G1	Keratin-associated protein 16-7
G2	Keratin-associated protein 16-7
G3	UPF0595 Protein C22orf40 homolog
G4	Keratin-associated protein 16-7
G5	Krueppel-like factor 6
G6	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6
G7	Spermatid nuclear transition protein 1
G8	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1
G9	UPF0595 protein C22orf40 homolog
G10	28S ribosomal protein S24, mitochondrial
G11	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4
G12	ADP-ribosylation factor 1
G13	Ribonuclease pancreatic
G14	PWWP domain-containing protein 2A
G15	Keratin-associated protein 16-7
G16	Heat shock cognate 71kDa protein
G17	Keratin-associated protein 16-7
G18	F-box only protein 28
G19	Serum albumin
G21	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
G22	Ras-related protein Rab-5A
G23	Fructose-bisphosphate aldolase A
G24	V-type proton ATPase subunit E 2
H1	Zinc finger protein 740
H2	Nucleoside diphosphate kinase A
H3	Spermatogenesis-associated protein 19, mitochondrial
H4	RNA-binding protein with serine-rich domain 1



## 6.8. Oxiblot ile okside olmuş protein farklılıklarının tespiti

3, 6 ve 12 aylık hayvanların hipokampal doku lizatlarından, WesternBlot yapılarak Oxiblot kiti ile okside olmuş proteinlerin varlığı gösterildi. 3 aylık dokulara göre 6 ve 12 aylık hipokampal dokularda daha fazla okside olmuş protein gözlemlendi (Resim 6.8.1). Protein bantlarını tanımlamak amacıyla, blot üzerinde yapılan tripsinizasyon ve ardından yapılan MALDI-TOF-TOF analizinde tanımlama yapılamadı. Blot-üzerinde-tripsinizasyon metodunun optimizasyona ihtiyacı olduğu sonucuna varıldı.



**Resim 6.8.1:** 3,6 ve 12 aylık hipokampuste okside olmuş proteinler. K, kontrol; T, transgenik; M, marker.

## 6.9. İnsan beyin omurilik sıvısı (BOS) proteome analizi

### 6.9.1. BOS örneklerinde tanımlanan anlamlı proteinler

Sağlıklı ve Alzheimer's hasatı olan bireylerden alınan beyin omurilik sıvısı örneklerinin nanoLC-MS/MS ile analizi sonucunda 1041 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler içinde kontrol ve hastalar arasında istatistiksel anlamlılık gösteren protein sayısı ise 204 tür. Tablo 6.9.1.1'de proteinlerin listesi, ekspresyon değişimlerinin oranları (max fold change) ve *p* değerleri yer almaktadır. Değişim

oranları >1 olanlar hastalarda miktarı o oranda artışı, 0-1 arası olanlar hastalarda o oranda azalışı ifade etmektedir.

**Tablo 6.9.1.1:** BOS örneklerinde anlamlı değişim gösteren proteinler.

Erişim No	Protein İsmi	Anova (-p değeri)	Değişim Oranı
Q99584	Protein S100-A13	1.21E-05	0.70
Q9C040	Tripartite motif-containing protein 2	2.97E-04	0.40
Q2TB90	Putative hexokinase HKDC1	8.37E-04	0.56
Q96Q06	Perilipin-4	8.90E-04	0.65
Q99747	Gamma-soluble NSF attachment protein	1.45E-03	0.70
P09382	Galectin-1	2.00E-03	0.52
P20338	Ras-related protein Rab-4A	2.05E-03	0.54
O95139	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	2.18E-03	0.43
Q14CN4	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 72	3.37E-03	0.55
Q15388	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	4.28E-03	0.56
Q9NQ66	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	4.54E-03	0.40
Q9NZL9	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	4.71E-03	0.58
Q9NPJ3	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	4.91E-03	0.60
Q8N111	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	4.97E-03	0.55
Q9HOW9	Isoform 2 of Ester hydrolase C11orf54	5.16E-03	0.45
P49591	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	5.43E-03	0.71
P50440	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	5.67E-03	0.28
Q9UN79	Transcription factor SOX-13	5.93E-03	0.63
P30626	Sorcin	6.04E-03	0.66
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	6.19E-03	0.52
Q9UI15	Transgelin-3	6.32E-03	0.59
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	6.45E-03	0.64
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	6.49E-03	0.56
P55327	Tumor protein D52	6.80E-03	0.31
P05090	Apolipoprotein D	7.01E-03	0.47
P51693	Amyloid-like protein 1	7.32E-03	0.26
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	7.55E-03	0.54
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	7.69E-03	0.60
Q9Y3P9	Rab GTPase-activating protein 1	7.99E-03	0.42
O43920	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	8.12E-03	0.57
P23471	Isoform 3 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	8.37E-03	0.68
P05413	Fatty acid-binding protein, heart	8.89E-03	0.63

	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1,		
P55809	mitochondrial	9.29E-03	0.70
Q9NZR1	Tropomodulin-2	9.29E-03	0.64
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	9.51E-03	0.68
P49961	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	9.71E-03	0.41
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	9.79E-03	0.46
P07099	Epoxide hydrolase 1	1.07E-02	0.55
Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	1.11E-02	0.56
Q8NFW1	Collagen alpha-1(XXII) chain	1.12E-02	0.41
O15327	Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase	1.12E-02	0.50
P23528	Cofilin-1	1.13E-02	0.68
Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	1.14E-02	0.61
P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	1.14E-02	0.47
Q9Y3D6	Mitochondrial fission 1 protein	1.15E-02	0.47
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1.15E-02	0.61
P00915	Carbonic anhydrase 1	1.16E-02	0.54
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	1.18E-02	0.65
Q5SQ13	Proline-rich protein 31	1.21E-02	0.42
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1.22E-02	0.56
A6NC98	Coiled-coil domain-containing protein 88B	1.26E-02	0.67
P18433	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	1.27E-02	0.30
P08133	Annexin A6	1.29E-02	0.53
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	1.31E-02	0.51
O14561	Acyl carrier protein, mitochondrial	1.33E-02	0.62
P98170	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	1.36E-02	0.44
P15104	Glutamine synthetase	1.36E-02	0.54
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	1.36E-02	0.67
P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	1.37E-02	0.70
Q13303	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	1.38E-02	0.65
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	1.44E-02	0.52
Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	1.47E-02	0.66
Q9H4I3	Isoform 2 of TraB domain-containing protein	1.49E-02	0.35
P27482	Calmodulin-like protein 3	1.50E-02	0.61
P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	1.54E-02	0.65
Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	1.55E-02	0.52
Q8TD57	Isoform 3 of Dynein heavy chain 3, axonemal	1.58E-02	0.42
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	1.58E-02	0.67
P49418	Amphiphysin	1.58E-02	0.55

P30048	Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase	1.60E-02	0.54
P03369	Gag-Pol polyprotein	1.65E-02	0.32
O95970	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1	1.67E-02	0.65
Q9Y5K8	V-type proton ATPase subunit D	1.70E-02	0.70
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	1.70E-02	0.60
O75901	Ras association domain-containing protein 9	1.70E-02	0.19
P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3	1.71E-02	0.59
P41222	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1.75E-02	0.62
Q9H492	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	1.75E-02	0.65
Q58FG1	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4	1.77E-02	0.40
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1.77E-02	0.66
P51649	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	1.78E-02	0.60
P06702	Protein S100-A9	1.78E-02	0.43
Q6ZVM7	TOM1-like protein 2	1.79E-02	0.62
Q9P2J3	Kelch-like protein 9	1.81E-02	0.46
Q8NHY3	GAS2-like protein 2	1.87E-02	0.39
P62760	Visinin-like protein 1	1.90E-02	0.56
Q99961	Endophilin-A2	1.93E-02	0.62
O60313	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	1.95E-02	0.71
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	1.96E-02	0.70
Q9ULB1	Neurexin-1	2.01E-02	0.56
Q96L93	Kinesin-like protein KIF16B	2.05E-02	0.51
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form	2.05E-02	0.64
Q86YA3	Protein ZGRF1	2.07E-02	0.47
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	2.08E-02	0.31
Q9Y4C0	Neurexin-3	2.08E-02	0.59
Q9UMS6	Synaptopodin-2	2.08E-02	0.64
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	2.08E-02	0.54
O95182	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	2.10E-02	0.71
P02794	Ferritin heavy chain	2.11E-02	0.52
Q9NX14	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11,	2.12E-02	0.64
Q13491	Isoform 4 of Neuronal membrane glycoprotein M6-b	2.17E-02	0.64
P62424	60S ribosomal protein L7a	2.20E-02	0.61
P49419	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	2.22E-02	0.68
P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial	2.23E-02	0.62
Q99962	Endophilin-A1	2.26E-02	0.68

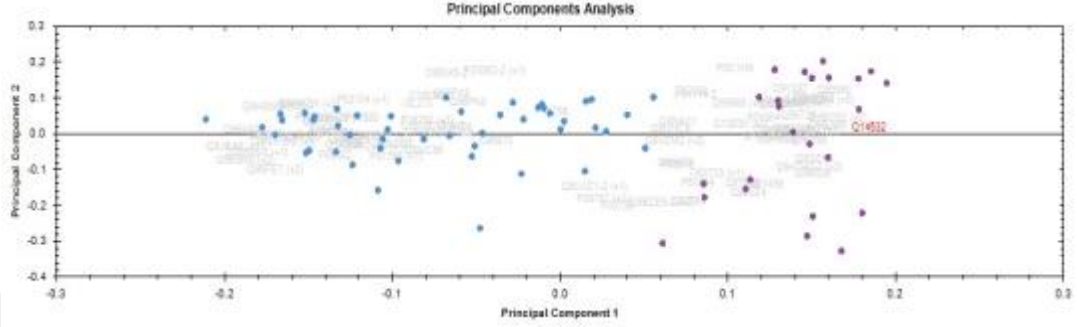
P16870	Carboxypeptidase E	2.27E-02	0.62
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	2.27E-02	0.63
P21926	CD9 antigen	2.31E-02	0.59
O14594	Neurocan core protein	2.32E-02	0.42
P54920	Alpha-soluble NSF attachment protein	2.33E-02	0.47
P23763	Vesicle-associated membrane protein 1	2.40E-02	0.33
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	2.46E-02	0.47
O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	2.60E-02	0.61
P61266	Syntaxin-1B	2.60E-02	0.64
Q13561	Dynactin subunit 2	2.65E-02	0.69
Q16623	Isoform 2 of Syntaxin-1A	2.66E-02	0.53
Q16623	Syntaxin-1A	2.66E-02	0.53
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2.71E-02	0.47
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	2.71E-02	0.55
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2.72E-02	0.40
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	2.72E-02	0.63
Q96FN4	Copine-2	2.75E-02	0.53
Q08257	Quinone oxidoreductase	2.75E-02	0.58
Q53H12	Acylglycerol kinase, mitochondrial	2.77E-02	0.69
O94856	Neurofascin	2.77E-02	0.64
Q9NQC3	Reticulon-4	2.78E-02	0.65
Q08722	Leukocyte surface antigen CD47	2.80E-02	0.69
Q9UBB6	Neurochondrin	2.82E-02	0.71
P07197	Neurofilament medium polypeptide	2.83E-02	0.52
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	2.90E-02	0.44
P52758	Ribonuclease UK114	2.91E-02	0.63
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	2.95E-02	0.63
P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	2.99E-02	0.71
Q8IXQ9	Methyltransferase-like protein 20	3.04E-02	0.61
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	3.07E-02	0.70
P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	3.08E-02	0.70
Q8N335	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	3.09E-02	0.59
P20700	Lamin-B1	3.11E-02	0.55
Q06830	Peroxiredoxin-1	3.13E-02	0.64
Q08209	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit	3.30E-02	0.64
Q9UPP5	Uncharacterized protein KIAA1107	3.33E-02	0.23
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	3.46E-02	0.69
Q9Y639	Neuroplastin	3.48E-02	0.53

Q9GZP4	PITH domain-containing protein 1	3.51E-02	0.54
Q8NBP0	Tetratricopeptide repeat protein 13	3.55E-02	0.64
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	3.63E-02	0.62
P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	3.72E-02	0.69
P21964	Catechol O-methyltransferase	3.72E-02	0.53
Q969E4	Transcription elongation factor A protein-like 3	3.78E-02	0.31
Q9P0J0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	3.81E-02	0.68
O14810	Complexin-1	3.82E-02	0.36
P11233	Ras-related protein Ral-A	3.82E-02	0.69
P25788	Proteasome subunit alpha type-3	3.84E-02	0.36
P38570	Integrin alpha-E	3.85E-02	0.63
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	3.89E-02	0.69
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	3.92E-02	0.52
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3.92E-02	0.66
P47985	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	4.00E-02	0.65
Q16653	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	4.00E-02	0.45
P49802	Isoform 4 of Regulator of G-protein signaling 7	4.01E-02	0.70
P20916	Myelin-associated glycoprotein	4.03E-02	0.43
P14618	Pyruvate kinase PKM	4.04E-02	0.69
P14618	Isoform M1 of Pyruvate kinase PKM	4.04E-02	0.69
O60262	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7	4.18E-02	0.49
Q66GS9	Centrosomal protein of 135 kDa	4.18E-02	0.68
Q9UBW5	Bridging integrator 2	4.21E-02	0.47
Q9Y2Q0	Phospholipid-transporting ATPase IA	4.23E-02	0.65
Q8TBY8	Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1	4.26E-02	0.69
P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	4.27E-02	0.67
O00217	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	4.32E-02	0.69
Q9H2U2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	4.34E-02	0.67
O12158	Gag-Pol polyprotein	4.35E-02	0.59
Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	4.48E-02	0.46
P59768	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2	4.52E-02	0.63
Q5TCS8	Adenylate kinase 9	4.56E-02	0.65
Q9H0Q0	Protein FAM49A	4.59E-02	0.67

Q07343	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	4.60E-02	0.62
Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5	4.63E-02	0.57
Q13112	Chromatin assembly factor 1 subunit B	4.65E-02	0.11
Q2M2I5	Keratin, type I cytoskeletal 24	4.69E-02	0.69
Q9Y376	Calcium-binding protein 39	4.75E-02	0.67
P02042	Hemoglobin subunit delta	4.77E-02	0.59
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	4.78E-02	0.66
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	4.78E-02	0.64
Q00169	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	4.81E-02	0.70
Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1	4.86E-02	0.58
P04216	Thy-1 membrane glycoprotein	4.88E-02	0.49
Q9NRS4	Isoform 3 of Transmembrane protease serine 4	4.95E-02	0.36
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	4.97E-02	0.60
Q5XKP0	Protein QIL1	1.55E-04	3.28
O75369	Isoform 4 of Filamin-B	2.42E-04	2.21
P48594	Serpin B4	4.08E-04	3.24
Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3	7.33E-04	3.38
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	8.16E-04	2.31
Q96DE0	U8 snoRNA-decapping enzyme	8.23E-04	1.69
Q99685	Monoglyceride lipase	9.90E-04	17.73
P25686	Isoform 2 of DnaJ homolog subfamily B member 2	1.02E-03	33.80
Q8N436	Inactive carboxypeptidase-like protein X2	1.61E-03	65.10
P78358	Isoform 2 of Cancer/testis antigen 1	1.63E-03	180.31
Q99996	Isoform 4 of A-kinase anchor protein 9	2.30E-03	1.57
Q9NQ76	Isoform 3 of Matrix extracellular phosphoglycoprotein	2.40E-03	2.16
Q9UGT4	Sushi domain-containing protein 2	2.51E-03	30.07
	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa		
P30154	regulatory subunit A beta isoform	2.54E-03	2.43
P61006	Ras-related protein Rab-8A	2.78E-03	8.56
Q96AC1	Fermitin family homolog 2	2.82E-03	8.52
Q502W6	Isoform 6 of von Willebrand factor A domain-containing protein 3	3.13E-03	2.51
P39210	Protein Mpv17	3.62E-03	74.94
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	3.92E-03	4.08
A1L0T0	Acetolactate synthase-like protein	4.21E-03	3.17
Q13724	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	4.51E-03	2.02
Q08623	Pseudouridine-5'-monophosphatase	5.03E-03	25.87
Q96AY2	Isoform 2 of Crossover junction endonuclease EME1	5.12E-03	1.58

### 6.9.2. BOS proteomunun PCA analizi

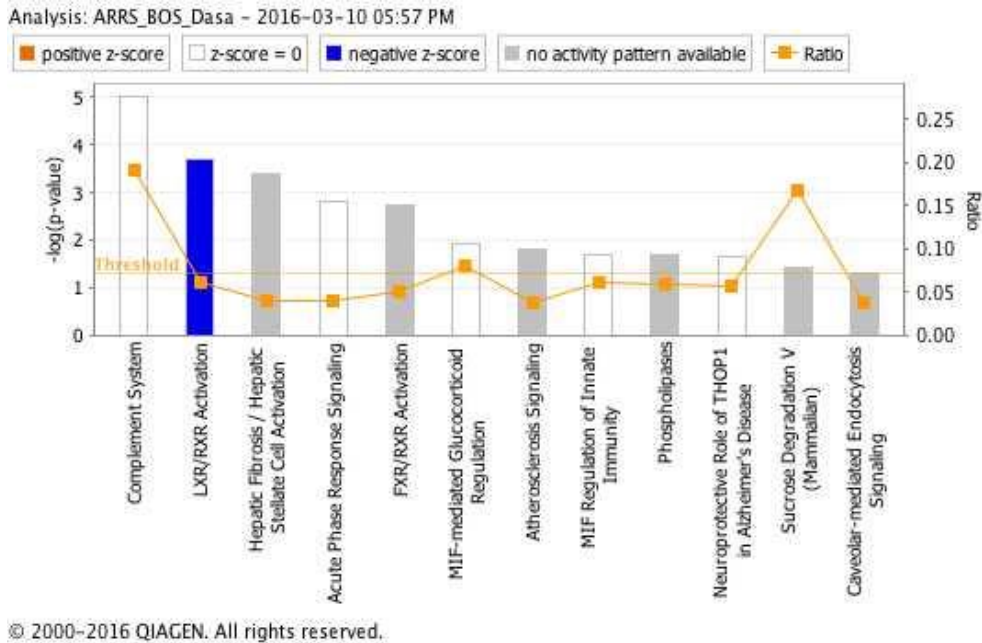
Beyin omurilik sıvısı örneklerinden tanımlanan ve anlamlı değişen proteinlerin PCA analizi sonuçları Şekil 6.9.2.1'deki gibidir. Analiz sonucuna göre iki grubun BOS proteomu birbirinden ayrılmış görünmektedir.



Şekil 6.9.2.1: BOS proteomuna ait PCA analizi. Mavi noktalar Alzheimer's hasta proteomunu, mor noktalar kontrol grubunu temsil etmektedir.

### 6.9.3. BOS proteomunun IPA analizi

Beyin omurilik sıvısı örneklerinden tanımlanan ve anlamlı değişen proteinlerin IPA analizi sonuçları Şekil 6.9.3.1'deki gibidir. Önerilen yollar arasında inflamasyon ve lipid metabolizması yer almaktadır.



Şekil 6.9.3.1: BOS proteomunun IPA analizi.



## 6.10. İnsan post-mortem doku örneklerinin proteom analizi

### 6.10.1. Post-mortem doku örneklerinde tanımlanan anlamlı proteinler

Sağlıklı ve Alzheimer's hastası olan bireylerden alınan post-mortem doku örneklerinin nanoLC-MS/MS ile analizi sonucunda 1737 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler içinde kontrol ve hastalar arasında istatistiksel anlamlılık gösteren protein sayısı ise 311 dir. Tablo 6.10.1.1'de proteinlerin listesi, ekspresyon değişimlerinin oranları (fold change) ve *p* değerleri yer almaktadır. Değişim oranları >1 olanlar hastalarda miktarı o oranda artışı, 0-1 arası olanlar hastalarda o oranda azalışı ifade etmektedir.

**Tablo 6.10.1.1:** Post-mortem doku örneklerinde anlamlı değişen proteinler.

Erişim No	Protein İsmi	Anova (-p değeri)	Değişim Oranı
Q99584	Protein S100-A13	1.21E-05	0.70
Q9C040	Tripartite motif-containing protein 2	2.97E-04	0.40
Q2TB90	Putative hexokinase HKDC1	8.37E-04	0.56
Q96Q06	Perilipin-4	8.90E-04	0.65
Q99747	Gamma-soluble NSF attachment protein	1.45E-03	0.70
P09382	Galectin-1	2.00E-03	0.52
P20338	Ras-related protein Rab-4A	2.05E-03	0.54
O95139	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	2.18E-03	0.43
Q14CN4	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 72	3.37E-03	0.55
Q15388	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	4.28E-03	0.56
Q9NQ66	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-	4.54E-03	0.40
Q9NZL9	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	4.71E-03	0.58
Q9NPJ3	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	4.91E-03	0.60
Q8N111	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	4.97E-03	0.55
Q9H0W9	Isoform 2 of Ester hydrolase C11orf54	5.16E-03	0.45
P49591	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	5.43E-03	0.71
P50440	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	5.67E-03	0.28
Q9UN79	Transcription factor SOX-13	5.93E-03	0.63
P30626	Sorcin	6.04E-03	0.66
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	6.19E-03	0.52
Q9UI15	Transgelin-3	6.32E-03	0.59

P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	6.45E-03	0.64
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	6.49E-03	0.56
P55327	Tumor protein D52	6.80E-03	0.31
P05090	Apolipoprotein D	7.01E-03	0.47
P51693	Amyloid-like protein 1	7.32E-03	0.26
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	7.55E-03	0.54
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	7.69E-03	0.60
Q9Y3P9	Rab GTPase-activating protein 1	7.99E-03	0.42
O43920	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	8.12E-03	0.57
P23471	Isoform 3 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	8.37E-03	0.68
P05413	Fatty acid-binding protein, heart	8.89E-03	0.63
P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	9.29E-03	0.70
Q9NZR1	Tropomodulin-2	9.29E-03	0.64
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	9.51E-03	0.68
P49961	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	9.71E-03	0.41
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	9.79E-03	0.46
P07099	Epoxide hydrolase 1	1.07E-02	0.55
Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	1.11E-02	0.56
Q8NFW1	Collagen alpha-1(XXII) chain	1.12E-02	0.41
O15327	Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase	1.12E-02	0.50
P23528	Cofilin-1	1.13E-02	0.68
Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	1.14E-02	0.61
P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	1.14E-02	0.47
Q9Y3D6	Mitochondrial fission 1 protein	1.15E-02	0.47
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1.15E-02	0.61
P00915	Carbonic anhydrase 1	1.16E-02	0.54
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	1.18E-02	0.65
Q5SQ13	Proline-rich protein 31	1.21E-02	0.42
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1.22E-02	0.56
A6NC98	Coiled-coil domain-containing protein 88B	1.26E-02	0.67
P18433	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	1.27E-02	0.30
P08133	Annexin A6	1.29E-02	0.53
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	1.31E-02	0.51
O14561	Acyl carrier protein, mitochondrial	1.33E-02	0.62
P98170	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	1.36E-02	0.44

P15104	Glutamine synthetase	1.36E-02	0.54
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	1.36E-02	0.67
P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	1.37E-02	0.70
Q13303	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	1.38E-02	0.65
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	1.44E-02	0.52
Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	1.47E-02	0.66
Q9H4I3	Isoform 2 of TraB domain-containing protein	1.49E-02	0.35
P27482	Calmodulin-like protein 3	1.50E-02	0.61
P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	1.54E-02	0.65
Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	1.55E-02	0.52
Q8TD57	Isoform 3 of Dynein heavy chain 3, axonemal	1.58E-02	0.42
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	1.58E-02	0.67
P49418	Amphiphysin	1.58E-02	0.55
P30048	Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	1.60E-02	0.54
P03369	Gag-Pol polyprotein	1.65E-02	0.32
O95970	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1	1.67E-02	0.65
Q9Y5K8	V-type proton ATPase subunit D	1.70E-02	0.70
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	1.70E-02	0.60
O75901	Ras association domain-containing protein 9	1.70E-02	0.19
P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3	1.71E-02	0.59
P41222	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1.75E-02	0.62
Q9H492	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	1.75E-02	0.65
Q58FG1	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4	1.77E-02	0.40
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1.77E-02	0.66
P51649	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	1.78E-02	0.60
P06702	Protein S100-A9	1.78E-02	0.43
Q6ZVM7	TOM1-like protein 2	1.79E-02	0.62
Q9P2J3	Kelch-like protein 9	1.81E-02	0.46
Q8NHY3	GAS2-like protein 2	1.87E-02	0.39
P62760	Visinin-like protein 1	1.90E-02	0.56
Q99961	Endophilin-A2	1.93E-02	0.62
O60313	Dynamamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	1.95E-02	0.71
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	1.96E-02	0.70
Q9ULB1	Neurexin-1	2.01E-02	0.56
Q96L93	Kinesin-like protein KIF16B	2.05E-02	0.51
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form	2.05E-02	0.64

Q86YA3	Protein ZGRF1	2.07E-02	0.47
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	2.08E-02	0.31
Q9Y4C0	Neurexin-3	2.08E-02	0.59
Q9UMS6	Synaptopodin-2	2.08E-02	0.64
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit	2.08E-02	0.54
O95182	7	2.10E-02	0.71
P02794	Ferritin heavy chain NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit	2.11E-02	0.52
Q9NX14	11,	2.12E-02	0.64
Q13491	Isoform 4 of Neuronal membrane glycoprotein M6-b	2.17E-02	0.64
P62424	60S ribosomal protein L7a	2.20E-02	0.61
P49419	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	2.22E-02	0.68
P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial	2.23E-02	0.62
Q99962	Endophilin-A1	2.26E-02	0.68
P16870	Carboxypeptidase E	2.27E-02	0.62
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	2.27E-02	0.63
P21926	CD9 antigen	2.31E-02	0.59
O14594	Neurocan core protein	2.32E-02	0.42
P54920	Alpha-soluble NSF attachment protein	2.33E-02	0.47
P23763	Vesicle-associated membrane protein 1	2.40E-02	0.33
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	2.46E-02	0.47
O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	2.60E-02	0.61
P61266	Syntaxin-1B	2.60E-02	0.64
Q13561	Dynactin subunit 2	2.65E-02	0.69
Q16623	Isoform 2 of Syntaxin-1A	2.66E-02	0.53
Q16623	Syntaxin-1A	2.66E-02	0.53
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2.71E-02	0.47
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	2.71E-02	0.55
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2.72E-02	0.40
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	2.72E-02	0.63
Q96FN4	Copine-2	2.75E-02	0.53
Q08257	Quinone oxidoreductase	2.75E-02	0.58
Q53H12	Acylglycerol kinase, mitochondrial	2.77E-02	0.69
O94856	Neurofascin	2.77E-02	0.64
Q9NQC3	Reticulon-4	2.78E-02	0.65
Q08722	Leukocyte surface antigen CD47	2.80E-02	0.69
Q9UBB6	Neurochondrin	2.82E-02	0.71

P07197	Neurofilament medium polypeptide	2.83E-02	0.52
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	2.90E-02	0.44
P52758	Ribonuclease UK114	2.91E-02	0.63
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	2.95E-02	0.63
P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	2.99E-02	0.71
Q8IXQ9	Methyltransferase-like protein 20	3.04E-02	0.61
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	3.07E-02	0.70
P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	3.08E-02	0.70
Q8N335	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	3.09E-02	0.59
P20700	Lamin-B1	3.11E-02	0.55
Q06830	Peroxiredoxin-1	3.13E-02	0.64
Q08209	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit	3.30E-02	0.64
Q9UPP5	Uncharacterized protein KIAA1107	3.33E-02	0.23
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	3.46E-02	0.69
Q9Y639	Neuroplastin	3.48E-02	0.53
Q9GZP4	PITH domain-containing protein 1	3.51E-02	0.54
Q8NBP0	Tetratricopeptide repeat protein 13	3.55E-02	0.64
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	3.63E-02	0.62
P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	3.72E-02	0.69
P21964	Catechol O-methyltransferase	3.72E-02	0.53
Q969E4	Transcription elongation factor A protein-like 3	3.78E-02	0.31
Q9P0J0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	3.81E-02	0.68
O14810	Complexin-1	3.82E-02	0.36
P11233	Ras-related protein Ral-A	3.82E-02	0.69
P25788	Proteasome subunit alpha type-3	3.84E-02	0.36
P38570	Integrin alpha-E	3.85E-02	0.63
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	3.89E-02	0.69
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	3.92E-02	0.52
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3.92E-02	0.66
P47985	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	4.00E-02	0.65
Q16653	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	4.00E-02	0.45
P49802	Isoform 4 of Regulator of G-protein signaling 7	4.01E-02	0.70
P20916	Myelin-associated glycoprotein	4.03E-02	0.43
P14618	Pyruvate kinase PKM	4.04E-02	0.69
P14618	Isoform M1 of Pyruvate kinase PKM	4.04E-02	0.69

	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit		
O60262	gamma-7	4.18E-02	0.49
Q66GS9	Centrosomal protein of 135 kDa	4.18E-02	0.68
Q9UBW5	Bridging integrator 2	4.21E-02	0.47
Q9Y2Q0	Phospholipid-transporting ATPase IA	4.23E-02	0.65
Q8TBY8	Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1	4.26E-02	0.69
P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	4.27E-02	0.67
	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8,		
O00217	mitochondrial	4.32E-02	0.69
Q9H2U2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	4.34E-02	0.67
O12158	Gag-Pol polyprotein	4.35E-02	0.59
Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	4.48E-02	0.46
	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit		
P59768	gamma-2	4.52E-02	0.63
Q5TCS8	Adenylate kinase 9	4.56E-02	0.65
Q9H0Q0	Protein FAM49A	4.59E-02	0.67
Q07343	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	4.60E-02	0.62
Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5	4.63E-02	0.57
Q13112	Chromatin assembly factor 1 subunit B	4.65E-02	0.11
Q2M2I5	Keratin, type I cytoskeletal 24	4.69E-02	0.69
Q9Y376	Calcium-binding protein 39	4.75E-02	0.67
P02042	Hemoglobin subunit delta	4.77E-02	0.59
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	4.78E-02	0.66
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	4.78E-02	0.64
Q00169	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	4.81E-02	0.70
Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1	4.86E-02	0.58
P04216	Thy-1 membrane glycoprotein	4.88E-02	0.49
Q9NRS4	Isoform 3 of Transmembrane protease serine 4	4.95E-02	0.36
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	4.97E-02	0.60
Q5XKP0	Protein QIL1	1.55E-04	3.28
O75369	Isoform 4 of Filamin-B	2.42E-04	2.21
P48594	Serpin B4	4.08E-04	3.24
Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3	7.33E-04	3.38
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	8.16E-04	2.31
Q96DE0	U8 snoRNA-decapping enzyme	8.23E-04	1.69
Q99685	Monoglyceride lipase	9.90E-04	17.73
P25686	Isoform 2 of DnaJ homolog subfamily B member 2	1.02E-03	33.80
Q8N436	Inactive carboxypeptidase-like protein X2	1.61E-03	65.10

P78358	Isoform 2 of Cancer/testis antigen 1	1.63E-03	180.31
Q99996	Isoform 4 of A-kinase anchor protein 9	2.30E-03	1.57
Q9NQ76	Isoform 3 of Matrix extracellular phosphoglycoprotein	2.40E-03	2.16
Q9UGT4	Sushi domain-containing protein 2	2.51E-03	30.07
P30154	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A	2.54E-03	2.43
P61006	Ras-related protein Rab-8A	2.78E-03	8.56
Q96AC1	Fermitin family homolog 2	2.82E-03	8.52
	Isoform 6 of von Willebrand factor A domain-containing protein		
Q502W6	3B	3.13E-03	2.51
P39210	Protein Mpv17	3.62E-03	74.94
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	3.92E-03	4.08
A1L0T0	Acetolactate synthase-like protein	4.21E-03	3.17
Q13724	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	4.51E-03	2.02
Q08623	Pseudouridine-5'-monophosphatase	5.03E-03	25.87
Q96AY2	Isoform 2 of Crossover junction endonuclease EME1	5.12E-03	1.58
Q15404	Isoform 2 of Ras suppressor protein 1	5.13E-03	76.16
P16930	Fumarylacetoacetase	5.14E-03	3.04
P10768	S-formylglutathione hydrolase	5.54E-03	2.21
O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	5.65E-03	35.60
P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	5.78E-03	2.31
Q8NBU5	ATPase family AAA domain-containing protein 1	5.91E-03	63.59
P55083	Microfibril-associated glycoprotein 4	6.91E-03	4.81
Q9UJ78	Zinc finger MYM-type protein 5	7.05E-03	2.17
P12111	Isoform 3 of Collagen alpha-3(VI) chain	7.53E-03	1.89
Q63HM9	PI-PLC X domain-containing protein 3	7.71E-03	5.92
P35573	Glycogen debranching enzyme	7.89E-03	6.86
Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	8.04E-03	8.45
O00764	Pyridoxal kinase	8.18E-03	1.65
Q9NVS9	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	8.50E-03	11.58
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	8.84E-03	8.64
Q6IBS0	Twinfilin-2	8.93E-03	25.45
	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit-like protein		
Q9QJ39	U28	9.11E-03	6.95
Q86YQ8	Copine-8	9.33E-03	2.66
Q9UHL4	Dipeptidyl peptidase 2	9.63E-03	8.58
Q6NXG1	Isoform 2 of Epithelial splicing regulatory protein 1	1.08E-02	26.75
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	1.16E-02	9.55
P06538	DNA polymerase	1.19E-02	6.47

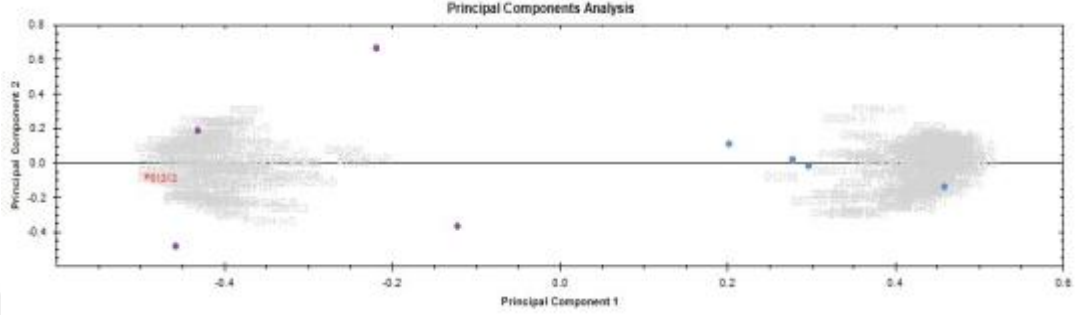
P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2	1.22E-02	1.43
Q9Y6R1	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	1.28E-02	1.73
O43272	Isoform 2 of Proline dehydrogenase 1, mitochondrial	1.29E-02	10.63
Q4G0N4	Isoform 3 of NAD kinase 2, mitochondrial	1.29E-02	20.05
Q9H8H3	Methyltransferase-like protein 7A	1.34E-02	14.23
P68400	Casein kinase II subunit alpha	1.34E-02	1.59
O60664	Isoform 2 of Perilipin-3	1.44E-02	18.84
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	1.45E-02	18.84
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	1.52E-02	3.50
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	1.65E-02	1.44
P28288	ATP-binding cassette sub-family D member 3	1.67E-02	10.53
Q13619	Cullin-4A	1.67E-02	1.92
P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	1.69E-02	9.72
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	1.72E-02	6.27
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1.77E-02	5.83
Q8NE18	Putative methyltransferase NSUN7	1.79E-02	1.83
Q5THR3	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6	1.79E-02	1.48
P05771	Protein kinase C beta type	1.79E-02	2.47
Q9BY67	Cell adhesion molecule 1	1.79E-02	1.44
Q02952	A-kinase anchor protein 12	1.83E-02	2.97
Q9UJ70	N-acetyl-D-glucosamine kinase	1.86E-02	4.32
Q8WTW4	Nitrogen permease regulator 2-like protein	1.87E-02	30.10
Q9NYY8	FAST kinase domain-containing protein 2	1.90E-02	1.80
P60660	Myosin light polypeptide 6	1.92E-02	4.03
P21810	Biglycan	1.97E-02	5.14
O60888	Isoform C of Protein CutA	1.99E-02	37.48
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	2.08E-02	2.23
Q99538	Legumain	2.17E-02	8.32
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	2.36E-02	1.55
P20774	Mimecan	2.45E-02	6.08
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	2.47E-02	2.06
Q14738	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit	2.64E-02	5.76
Q9UNZ2	NSFL1 cofactor p47	2.70E-02	1.66
Q14168	MAGUK p55 subfamily member 2	2.85E-02	1.67
Q15233	Isoform 2 of Non-POU domain-containing octamer-binding protein	2.91E-02	61.12
P00488	Coagulation factor XIII A chain	2.98E-02	1.61



Q8N5R6	Isoform 5 of Coiled-coil domain-containing protein 33	2.98E-02	83.89
Q502W7	Coiled-coil domain-containing protein 38	3.12E-02	3.37
P52446	Probable ganciclovir kinase	3.15E-02	1.83
Q05329	Glutamate decarboxylase 2	3.18E-02	18.94
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	3.21E-02	5.68
Q9NQ48	Leucine zipper transcription factor-like protein 1	3.21E-02	1.45
Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	3.25E-02	1.93
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	3.26E-02	1.50
P49720	Proteasome subunit beta type-3	3.26E-02	1.56
Q8TF21	Ankyrin repeat domain-containing protein 24	3.28E-02	2.24
P62333	26S protease regulatory subunit 10B	3.29E-02	10.21
Q96AB3	Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial	3.42E-02	6.42
Q16853	Membrane primary amine oxidase	3.47E-02	12.40
O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	3.52E-02	2.96
O00487	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	3.54E-02	15.84
P12525	Putative myc-like protein MYCLP1	3.54E-02	1.71
A5HBG1	Large T antigen	3.55E-02	5.04
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	3.64E-02	1.84
Q8AZJ5	Uncharacterized LF1 protein	3.73E-02	1.61
P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	3.82E-02	1.49
Q8N427	Thioredoxin domain-containing protein 3	4.03E-02	11.86
P46459	Vesicle-fusing ATPase	4.11E-02	1.96
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	4.12E-02	1.95
Q9BYC2	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 2, mitochondrial	4.19E-02	1.72
Q6KCM7	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	4.25E-02	5.24
O60296	Trafficking kinesin-binding protein 2	4.28E-02	2.16
P60983	Glia maturation factor beta	4.44E-02	2.80
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	4.47E-02	2.05
Q8IZC6	Collagen alpha-1(XXVII) chain	4.51E-02	1.67
Q58FG0	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5	4.51E-02	1.51
P62328	Thymosin beta-4	4.54E-02	22.29
Q96T51	RUN and FYVE domain-containing protein 1	4.59E-02	1.79
P62081	40S ribosomal protein S7	4.84E-02	2.06
Q6YN16	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	4.85E-02	2.41
P12814	Alpha-actinin-1	4.91E-02	5.45
O75952	Isoform 4 of Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein	4.95E-02	8.62

### 6.10.2. Post-mortem doku örneklerinin PCA analizi

Post-mortem doku örneklerinden tanımlanan ve anlamlı değişen proteinlerin PCA analizi sonuçları Şekil 6.10.2.1'deki gibidir. Analiz sonucuna göre iki grubun proteomu birbirinden ayrılmış görünmektedir.

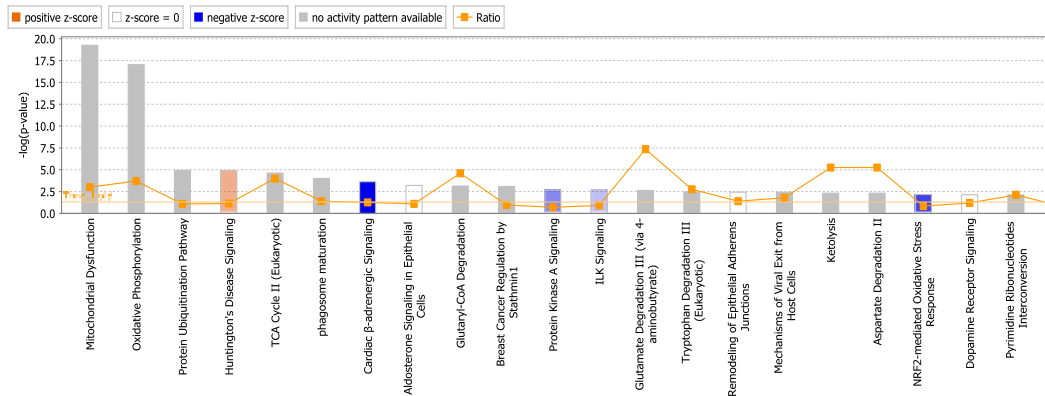


Şekil 6.10.2.1: Post-mortem doku örneklerinin PCA analizi.

### 6.10.3. Post-mortem doku örneklerinin IPA analiz

Post-mortem doku örneklerinden tanımlanan ve anlamlı değişen proteinlerin IPA analizi sonuçları Şekil 6.10.3.1'deki gibidir. Önerilen yollar arasında mitokondriyel disfonksiyon oksidatif fosforilasyon ve sinyal-ileti yolları ile ilgili yollar yer almaktadır.

Analysis: DamjanGlavac\_frozenbrain\_IPA - 2015-12-04 01:54 PM



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Şekil 6.10.3.1: Post-mortem doku örneklerinin IPA analizi.

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alzheimer Hastalığı, A $\beta$  plakları ve nörofibriler düğümler ile karakterize edilen, çok faktörlü, ilerleyici bir hastalıktır. Birçok araştırma grubu tarafından yapılan çalışmalarda, hastalık hakkında geniş bir bilgi birikimine ulaşılmış olsa da, hastalığın patolojisini oluşturan esas sebepler hala aydınlatılamamıştır. Bununla beraber, AD patolojisi üzerine yapılan çalışmalarda çok çeşitli teknikler kullanılmış ve patolojinin açıklanması üzerine farklı hipotezler kabul görmüştür. Bu çalışmada, farklı bakış açılarının bilinmeyenleri açığa çıkaracağı düşünülerek, proteomik temelli bir yaklaşım ile, hastalığın altında yatan bilinmeyen moleküler yolları ortaya çıkarmayı hedefledik.

Bu çalışmada, beynin patolojik değişimlerinin daha başlamadığı erken klinik dönemi ve ileri bilişsel bozulmaya doğru gidilen aşamaların sistematik olarak araştırılabileceği ve yaygın olarak kullanılan beş ailevi Alzheimer hastalığı mutasyonunu içeren 5XFAD fare modelini kullandık. Bu modelde, fareler 9. ayda geri dönüşümsüz olarak amyloid plak oluşumu göstermektedirler. Bununla beraber 9. Ayda farelerde bilişsel bozulmalar da gözlenmiştir (77). Yaptığımız davranışsal ve immünohistokimyasal analizler sonucunda da, 5XFAD farelerinin hastalığı geliştirme evreleri belirlendi. 3 ay, prepatolojik dönem; 6 ay, hastalığın gelişim evresi ve 12 ay, patolojik dönem olarak değerlendirildi. Prepatolojik dönemde, ne A $\beta$  miktarında ne de öğrenme ve hafızada bir hasar tespit edilememişken, gelişim evresinde artan A $\beta$  miktarına rağmen plak formu gözlenmedi. Ayrıca öğrenme ve hafıza da meydana gelen bozulma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Daha önceki çalışmalar da 3. Aydaki 5XFAD farelerde amyloid plak ve kognitif bozulma olmadığını kanıtlamıştır (78, 79). Patolojik evrede ise hem A $\beta$  plakları gözlendi hem de anlamlı şekilde kognitif bozulmalar saptandı.

Son yıllarda, ECM'in nörodejenerasyondaki rolü araştırılmış ve ECM bileşenlerinde meydana gelen değişimlerin sinaptogenez (53), plastisite (80), merkezi sinir sistemi onarımı (81) ve nöroproteksiyon üzerindeki önemli rolleri ortaya çıkarılmıştır. İntraserebral push-pull perfüzyon metodu, çözünebilir ekstraselüler matriks bileşenlerini elde etmek için kullanılan spesifik bir metottur fakat bu metodun fare beyni üzerinde uygulanması, ticari olarak üretilmiş prob boyutlarının

istenilenden büyük olması sebebiyle zordur. Bu problemi aşmak için, kurum içinde üretilmiş membransız süper ince probalar kullanarak, oldukça küçük bir bölge olan CA1 bölgesinden ekstraselüler sıvıyı elde etmeyi başardık. Bu yöntem sonucunda elde edilebilen ekstraselüler sıvı her ne kadar sınırlı olsa da, bu örneklerden kütle-spektrometresi temelli proteomik analizler ile 3, 6 ve 12 aylık perfüzyon örneklerinde sırasıyla 251, 213 ve 238 adet protein tanımlaması yapıldı. Bu sonuç daha sonraki ECM-temelli proteomik analizler için de umut verici bir sonuç teşkil etmektedir. Bu metod sonucu tanımlanan proteinlerin yaklaşık üçte birlik bir kısmının ekstraselüler bileşen içerdiği belirlendi. Mikrodializ yerine serebral push-pull yönteminin kullanılması, ekstraselüler bölgeye ilişkin daha çok sayıda protein tanımlaması sağlamıştır. Proteomik temelli çalışmamızla, plak oluşumunun başlamadığı dönemde dahi birçok proteinde ekspresyon değişimleri olduğunu göstermiş olduk. Her ne kadar erken dönemde bu değişiklikleri saptamış olsak da, bu proteinlerin tam olarak hangi noktada değişim göstermeye başladığını belirleyebilmek için bu konu hakkında daha çok deneysel araştırma gerekmektedir ve malesef 3. aydan daha erken dönemdeki fare beyinlerinden, intraserebral push-pull yöntemi ile ekstraselüler sıvı elde edilmesi teknik olarak kullanışsız görünmektedir.

Inflamasyon süreçlerinin ve sitokinlerin AD' deki rolleri ayrıntılı olarak Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz tarafından derlenmiştir (82). Pre-patolojik döneme ait IPA sonuçlarına göre, tanımlanmış proteinlerden 5 tanesinin üst düzenleyicisi IL-6 olarak saptanmıştır. IL-6 tarafından regüle edilen bu 5 proteinin (SERPINA3, SERPINA1, A2M, PTGER4 ve CST), AD ilişkili proteinler olduğu çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (83–87). IL-6 proteinin 3 aylık 5XFAD farelerin hipokampus ve korkteks bölgelerinde artış gösterdiği immünohistokimya analizleriyle saptandı. Amiloid kaskat hipotezine göre, artmış A $\beta$  üretimi ve azalan amiloid peptit uzaklaştırma süreçleri, AD' nin temel sebebi olarak görülmektedir (88). Her ne kadar yaygın olarak kabul edilmiş bir teori olsa da, beyinlerinde çokça nörofibriler düğüm ve senil plaklar bulunduran birçok sağlıklı birey bulunmaktadır (89). Ayrıca birçok durumda, bu patolojik olguların ortadan kaldırılması, hastalığı ortadan kaldırmamaktadır. Bu bilgiler, AD'nin oluşum ve ilerleyiş patolojisinde amiloid-olmayan faktörlerin de etkili olduğu fikrini ortaya çıkarmıştır. Birçok çalışmada demir birikiminin AH başlangıcında primer sebep olduğu gösterilmiş ve artmış demir

seviyelerinin amiloid plaklar ile bağlantılı olmadığı gösterilmiştir (26). Aksine, yakın zamanda transgenik fareler üzerinde yapılmış çalışmalarda, demir regülasyonunda bozulma, oksidatif stres ve mikroglial aktivasyon gibi süreçlerin amiloid plak oluşumunun erken evlerinde saptandığı gösterilmiştir (27). Demir içeren aktive olmuş mikrogliaların, manyetik rezonans görüntüleme analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda, demir-ilişkili mikroglial kaynaklı nöroinflamasyonun, amiloid ile ilişkili olarak nöronal bozulmanın temel sebebi olabileceği ihtimali öne sunulmuştur (90). Biz, bu çalışmada, 5XFAD transgenik fare hipokampuslarındaki IL-6 ve demir oranındaki artışın, amiloid plak oluşumundan daha önce olduğunu göstermiş ve IL-6 ve CA1 ekstraselüler bölgesi arasında bir ilişkili olabileceğini ilk kez sunmuş olduk.

5XFAD farelerine ait ECM örneklerinde, kontrol grubuna göre anlamlı derecede anlatımı değişen proteinlerin bir kısmı sadece 3, 6 veya 12 aylık zaman dilimlerinde değişim gösterirken, bir kısmı ortak olarak değişmiştir. Hastalığın prepatolojik, gelişim ve patolojik dönemlerinde ekspresyonu farklı miktarlarda değişen 7 adet ortak protein tespit edilmiştir. Bunlar PEB1, GRiD2ip, STX19, PRPTZ, SOD, Ig ve ALBU proteinleridir. PEB1, GRiD2ip, STX19, PRPTZ daha önceki çalışmalarda nörodejenerasyon ya da AD ile ilişkilendirilmiştir (91–100) ancak detaylı moleküler çalışmalar bulunmamaktadır. Ayrıca SOD miktarındaki düşüş ve demir miktarındaki artış nöral hücreleri, yaşlılık ve hastalığın ilerleyen evrelerinde gerçekleştiği bilinen oksidatif stresten daha çok etkilenir hale getirmektedir.

Prepatolojik evrede etkilendiği tespit edilen yolaklar; glikoliz, glikoneogenez ve immün sistemle ilişkili mekanizmalardır. Alzheimer hastalarında glikoliz/glikoneogenez'de (101) ve immün sistem ilişkili mekanizmalarda meydana gelen değişimler (102) önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler ise, bu değişimin hastalığın çok erken evrelerinde başladığını göstermektedir. 3 ve 6 aylık evrelerde ortak görülen yolaklar daha çok lipid taşınımı, sindirimi ve metabolizması ile ilişkili iken, 6. ayda insülin sekresyonu ve demir metabolizmasının etkilendiği tespit edildi. Hastalığın gelişim evresinde görülen demir metabolizmasının disregülasyonu, aynı zamanda daha önceki çalışmalarda dile getirilen demir metabolizması, nöroinflamasyon ve Abeta plak birikimi arasında

ilişkiyi de (27, 30) destekler niteliktedir. 6 ve 12. aylarda, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimi, apoptoz ve nörotransmitter salını ile ilişkili yolların etkilendiği tespit edildi. Son olarak, 3, 6 ve 12. aylarda lipid/lipoprotein metabolizması, Ras/Raf/MAPK sinyal ileti yolağı ve ROS detoksifikasyonu gibi temel yolların etkilendiği tespit edildi. Analizler sonucu belirlenen yolların yaşlanma süreci ile ilişkili olduğu bilinmektedir ancak 5XFAD ve kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı değişen proteinlere dayanarak yapılan bu analizlerden elde edilen veriler, AD'nin hastalığın başlangıcı, gelişimi ve patolojisi ile ilgili önemli bulgulardır. Ek olarak, verilerin doğruluğu ve anlaşılır olabilmesi için daha fazla moleküler temelli çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yapılan posttranslasyonel modifikasyon analizleri, fosforile ve okside olmuş proteinlerin analizini kapsamaktadır. Kütle spektrometrisine dayalı bu tür total posttranslasyonel modifikasyon analizlerinin (fosfoproteom), literatürde pek çok örneği olmakla birlikte (103–106), metodoloji üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmada, AD ve kontrol grubuna ait hipokampal lizatlar karşılaştırılarak, ekspresyonu değişmeyen ancak fosforile/defosforile olmuş 27 protein tanımlandı. Biyolojik önemlerinin anlaşılması için, öncelikle antikör temelli bir yöntem ile valide edilmesi ve ek deneylerle desteklenmesi gerekmektedir. Çalışma kapsamında, okside olmuş proteinlerin tanımlanması mümkün olmamıştır. Elde ettiğimiz veri, 3, 6 ve 12 aylık farelerdeki okside olmuş protein miktarının hastalığın ilerleyişi ile arttığı göstermiş olsada, proteinlerin tanımlanması için kullandığımız yöntemin (107, 108) değiştirilmesi ya da optimize edilmesi gerekmektedir.

Ek olarak, Alzheimer hastası ve kontrol gruplarına ait BOS ve postmortem dokularda protein ekspresyon değişim analizleri yapıldı. BOS örneklerinde tanımlanan 1041 proteinden 204'ünün ekspresyonu, AD hastalarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiştir. Yapılan PCA analizine göre, iki gruba ait proteomların tamamen ayrıştığı, ek olarak AD grubunda iki alt grubun olduğu gözlemlenmiştir. Alt grupların, klinikte kullanılan tanı kriterleri ya da patolojinin seviyesi ile ilişkili olup olmadığı daha detaylı şekilde incelenmelidir. AD ve kontrol grubuna ait postmortem beyin dokularında yapılan protein ekspresyon analizi sonucunda tanımlanan 1737 proteinden 311'nin ekspresyonu, AD bireylerde

kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiştir. BOS ve postmortem doku örneklerinde, AD'de kontrole göre anlamlı ölçüde değiştii tespit edilmiş olan proteinlerden yapılan yolak analizleri sonucunda bazı yolakların, hayvanlardan elde edilen hipokampal ECM örnekler ile ortak yolaklar olduğu görölmektedir. BOS ve 6 aylık farelere ait analizlerde lipid metabolizması ile ilişkili olduğu bilinen FXR/RXR yolağı ortak olarak etkilenmişken, postmortem doku ve 6 / 12 aylık hayvanlardan elde edilen ortak yolağın Nrf2 sinyal yolağı olduğu tespit edilmiştir. Hastalığın gelişimi ve ileri dönemlerinde elde edilen örnekler ile hasta bireylerden elde edilen biyolojik materyallerde ortak yolakların bulunması hem hayvan modelini valide etmekte hem de derinlemesine incelenmesi gereken potansiyel moleküler mekanizmaları ortaya koymaktadır.

## 8. KAYNAKLAR

1. Alzheimer A, Forstl H, Levy R. On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry*. 1991; 2(5):71–73.
2. Denzler P, Kessler J, Markowitsch H. M?glichkeiten und M?ngel der psychopathometrischen Demenz-Diagnostik. *Fortschritte der Neurol? Psychiatr*. 1986; 54(12):382–392.
3. Henderson VW, Finch CE. The neurobiology of Alzheimer's disease. *J Neurosurg*. 1989; 70(3):335–353.
4. Bermejo-Pareja F, Benito-Le?n J, Vega S, Medrano MJ, Rom?n GC. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J Neurol Sci*. 2008; 264(1–2):63–72.
5. Prince M, et al. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement*. 2013; 9(1):63–75.e2.
6. Gurvit H, et al. The Prevalence of Dementia in an Urban Turkish Population. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2008; 23(1):67–76.
7. McKhann GM, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2011; 7(3):263–269.
8. Sperling RA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011; 7(3):280–92.
9. Rhein V, Eckert A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function -- role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem*. 2007; 113(3):131–41.
10. Recuero M, Serrano E, Bullido MJ, Valdivieso F. Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Lett*. 2004; 570(1–3):114–8.
11. Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1998; 53:127–40.
12. Roberts GW, et al. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994; 57(4):419–25.
13. Sanz-Blasco S, Valero RA, Rodr?guez-Crespo I, Villalobos C, N?ñez L.



Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Overload Underlies A $\beta$  Oligomers Neurotoxicity Providing an Unexpected Mechanism of Neuroprotection by NSAIDs. *PLoS One*. 2008; 3(7):e2718.

14. Schmitt HP. Protein ubiquitination, degradation and the proteasome in neuro-degenerative disorders: No clear evidence for a significant pathogenetic role of proteasome failure in Alzheimer disease and related disorders. *Med Hypotheses*. 2006; 67(2):311–317.
15. Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(1):59–68.
16. Braak H, Del Tredici K. Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiol Aging*. 2004; 25(6):713–8–6.
17. Iqbal K, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2005; 1739(2–3):198–210.
18. Johnson GVW, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*. 2004; 117(24):5721–5729.
19. Lovestone S, Reynolds CH. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience*. 1997; 78(2):309–24.
20. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 1992; 3(10):1141–54.
21. Oide T, Kinoshita T, Arima K. Regression stage senile plaques in the natural course of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32(5):539–56.
22. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci*. 1998; 158(1):47–52.
23. Ayton S, Lei P, Bush AI. Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62:76–89.
24. De Sole P, et al. Possible relationship between Al/ferritin complex and Alzheimer's disease. *Clin Biochem*. 2013; 46(1–2):89–93.
25. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 2010; 345(1–2):91–104.
26. Leskovjan AC, et al. Increased brain iron coincides with early plaque

- formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2011; 55(1):32–38.
27. Gallagher JJ, et al. Modest amyloid deposition is associated with iron dysregulation, microglial activation, and oxidative stress. *J Alzheimers Dis*. 2012; 28(1):147–61.
  28. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(8):500–10.
  29. Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia*. 2008; 56(10):1048–1060.
  30. Meadowcroft MD, Connor JR, Yang QX. Cortical iron regulation and inflammatory response in Alzheimer's disease and APP<sup>SWE</sup>/PS1<sup>E9</sup> mice: A histological perspective. *Front Neurosci*. 2015; 9(JUL). doi:10.3389/fnins.2015.00255.
  31. McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(6):799–809.
  32. Dursun E, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 2015; 283(2015):50–7.
  33. Nemeth E, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004; 113(9):1271–1276.
  34. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991; 82(4):239–59.
  35. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. 16(3):271–8–84.
  36. Nakazawa K, et al. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron*. 2003; 38(2):305–15.
  37. O'Reilly RC, Rudy JW. Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function. *Psychol Rev*. 2001; 108(2):311–45.
  38. Golby A, et al. Memory encoding in Alzheimer's disease: an fMRI study of explicit and implicit memory. *Brain*. 2005; 128(4):773–787.
  39. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral

- lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 1986; 6(10):2950–67.
40. Reed JM, Squire LR. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav Neurosci.* 1997; 111(4):667–75.
  41. Bäckman L, Small BJ, Fratiglioni L. Stability of the preclinical episodic memory deficit in Alzheimer’s disease. *Brain.* 2001; 124(Pt 1):96–102.
  42. Buckmaster CA. Entorhinal Cortex Lesions Disrupt the Relational Organization of Memory in Monkeys. *J Neurosci.* 2004; 24(44):9811–9825.
  43. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the Hippocampal Formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, pp 6–17.
  44. Jones RS. Entorhinal-hippocampal connections: a speculative view of their function. *Trends Neurosci.* 1993; 16(2):58–64.
  45. Davis KE, Fox S, Gigg J. Increased hippocampal excitability in the 3xTgAD mouse model for Alzheimer’s disease in vivo. *PLoS One.* 2014; 9(3). doi:10.1371/journal.pone.0091203.
  46. Ji J, Maren S. Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. *Learn Mem.* 2008; 15(4):244–51.
  47. Naber PA, Witter MP, Lopes Silva FH. Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 911:392–403.
  48. van Groen T, Miettinen P, Kadish I. The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus.* 2003; 13(1):133–149.
  49. Flood DG, Coleman PD. Hippocampal plasticity in normal aging and decreased plasticity in Alzheimer’s disease. *Prog Brain Res.* 1990; 83:435–43.
  50. Simonian NA, Hyman BT. Functional alterations in neural circuits in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging.* 16(3):305–9.
  51. Iacono D, et al. Neuronal Hypertrophy in Asymptomatic Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008; 67(6):578–589.
  52. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology.* 2007; 68(18):1501–1508.

53. Faissner A, et al. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev.* 2010; 63(1-2):26-38.
54. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* 2000; 80(4):1267-1290.
55. Sykova E, et al. Changes in extracellular space size and geometry in APP23 transgenic mice: a model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(2):479-484.
56. Morawski M, Filippov M, Tzinia A, Tsilibary E, Vargova L. *ECM in brain aging and dementia* (Elsevier B.V.). 1st Ed. doi:10.1016/B978-0-444-63486-3.00010-4.
57. Suttkus A, Morawski M, Arendt T. Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(1):73-82.
58. Brückner G, et al. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1999; 92(3):791-805.
59. Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience.* 2010; 170(4):1314-1327.
60. Morawski M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Arendt T. Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2010; 169(3):1347-1363.
61. Morawski M, et al. Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(7):1254-1256.
62. Bonneh-Barkay D, Wiley CA. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol.* 2009; 19(4):573-585.
63. Verbeek MM, et al. Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol.* 1999; 155(6):2115-25.
64. Snow AD, et al. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1988; 133(3):456-463.
65. Snow AD, et al. Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am J Pathol.* 1990; 137(5):1253-70.

66. Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11(11):735–746.
67. Chin J, et al. Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2007; 27(11):2727–2733.
68. Hoe HS, Tran TS, Matsuoka Y, Howell BW, Rebeck GW. DAB1 and reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem.* 2006; 281(46):35176–35185.
69. Perrin RJ, et al. Quantitative Label-Free Proteomics for Discovery of Biomarkers in Cerebrospinal Fluid: Assessment of Technical and Inter-Individual Variation. *PLoS One.* 2013; 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0064314.
70. Swomley AM, et al. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014; 1842(8):1248–1257.
71. Licker V, et al. Proteomic analysis of human substantia nigra identifies novel candidates involved in parkinson's disease pathogenesis. *Proteomics.* 2014; 14(6):784–794.
72. Alberio T, et al. Mitochondrial proteomics investigation of a cellular model of impaired dopamine homeostasis, an early step in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol BioSyst Mol BioSyst.* 1332; 10(10):1332–1344.
73. Ozgul S, et al. Linking a compound-heterozygous Parkin mutant (Q311R and A371T) to Parkinson's disease by using proteomic and molecular approaches. *Neurochem Int.* 2015; 85–86:1–13.
74. Yoo Y, et al. Amyloid-beta-activated human microglial cells through ER-resident proteins. *J Proteome Res.* 2015; 14(1):214–223.
75. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991; 351(6322):117–121.
76. Lambert JF, et al. Quick sex determination of mouse fetuses. *J Neurosci Methods.* 2000; 95(2):127–132.
77. Schneider F, Baldauf K, Wetzel W, Reymann KG. Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice. *Physiol Behav.* 2014; 135:25–33.
78. Xiao NA, et al. Reduction of glucose metabolism in olfactory bulb is an earlier Alzheimer's disease-related biomarker in 5XFAD mice. *Chin Med J (Engl).* 2015; 128(16):2220–2227.

79. Liu D, et al. APOE4 enhances age-dependent decline in cognitive function by down-regulating an NMDA receptor pathway in EFAD-Tg mice. *Mol Neurodegener.* 2015; 10(1):7.
80. Cui H, Freeman C, Jacobson GA, Small DH. Proteoglycans in the central nervous system: Role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life.* 2013; 65(2):108–120.
81. Kwok JCF, Dick G, Wang D, Fawcett JW. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol.* 2011; 71(11):1073–1089.
82. Rubio-perez JM, Morillas-ruiz JM. A Review : Inflammatory Process in Alzheimer ' s Disease , Role of Cytokines. *Sci J.* 2012; 2012. doi:10.1100/2012/756357.
83. Kamboh MI, Minster LI, Kenney M, Ozturk A, Desai PP, Kammerer CM and DS. Alpha-1-antichymotrypsin (ACT or SERPINA3) polymorphism may affect age-at-onset and disease duration of Alzheimer's disease. 2006; 46(27):1435–1439.
84. C.R. A, D.J. S. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell.* 1988; 52(4):487–501.
85. Blacker D, et al. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1998; 19(august):357–360.
86. Hoshino T, et al. Prostaglandin E2 stimulates the production of amyloid-?? peptides through internalization of the EP4 receptor. *J Biol Chem.* 2009; 284(27):18493–18502.
87. Hua Y, Zhao H, Lu X, Kong Y, Jin H. Meta-analysis of the cystatin C(CST3) gene G73A polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2012; 122(8):431–438.
88. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; 256(5054):184–5.
89. Davis DG, Schmitt FA, Wekstein DR, Markesbery WR. Alzheimer Neuropathologic Alterations in Aged Cognitively Normal Subjects. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58(4):376–388.
90. Zeineh MM, et al. Activated iron-containing microglia in the human hippocampus identified by magnetic resonance imaging in Alzheimer disease HHS Public Access. *Neurobiol Aging.* 2015; 36(9):2483–2500.
91. Suszyńska-Zajczyk J, Luczak M, Marczak L, Jakubowski H. Hyperhomocysteinemia and bleomycin hydrolase modulate the expression of mouse brain proteins involved in neurodegeneration. *J*

*Alzheimers Dis.* 2014; 40(3):713–26.

92. Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: New insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol.* 2006; 545(1):39–50.
93. George AJ, et al. Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006; 27(4):614–23.
94. Liu QA, Shio H. Mitochondrial Morphogenesis, Dendrite Development, and Synapse Formation in Cerebellum Require both Bcl-w and the Glutamate Receptor  $\delta$ . *PLoS Genet.* 2008; 4(6):e1000097.
95. Takeuchi T, et al. Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphilin. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2297.
96. Counts SE, Alldred MJ, Che S, Ginsberg SD, Mufson EJ. Synaptic gene dysregulation within hippocampal CA1 pyramidal neurons in mild cognitive impairment. *Neuropharmacology.* 2014; 79:172–179.
97. Mukaetova-Ladinska EB, et al. Lewy Body Variant of Alzheimer's Disease: Selective Neocortical Loss of t-SNARE Proteins and Loss of MAP2 and  $\alpha$ -Synuclein in Medial Temporal Lobe. *Sci World J.* 2009; 9:1463–1475.
98. Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(7):2512–6.
99. Asai H, Yokoyama S, Morita S, Maeda N, Miyata S. Functional difference of receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta/\beta$  isoforms in neurogenesis of hippocampal neurons. *Neuroscience.* 2009; 164(3):1020–1030.
100. Esposito L, et al. Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci.* 2006; 26(19):5167–79.
101. Di Domenico F, et al. Quantitative proteomics analysis of phosphorylated proteins in the hippocampus of Alzheimer's disease subjects. *J Proteomics.* 2011; 74(7):1091–1103.
102. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-A brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(1). doi:10.1101/cshperspect.a006346.

103. Ficarro SB, et al. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol.* 2002; 20(3):301–305.
104. Ren R-J, Dammer EB, Wang G, Seyfried NT, Levey AI. Proteomics of protein post-translational modifications implicated in neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2014; 3(1):23.
105. Butterfield DA, et al. Redox proteomics in selected neurodegenerative disorders: from its infancy to future applications. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 17(11):1610–55.
106. Sethuraman M, et al. Quantification of oxidative posttranslational modifications of cysteine thiols of p21ras associated with redox modulation of activity using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(6):823–829.
107. Yoo B-S, Regnier FE. Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis.* 2004; 25(9):1334–1341.
108. Ohlendieck K. On-Membrane Digestion Technology for Muscle Proteomics. *J Membr Sep Technol.* 2013; 2(1):1–12.



## 9. EKLER

**Tablo 9.1:** 3, 6 ve 12. aylarda tanımlanan proteinlerin tam listesi.

Uniprot No	Protein Adı	Peptid Sayısı	Özgün Peptid	Güvenilirlik Skoru	Anova (p)	5XFAD /LM
<b>3 aylık</b>						
O08553	DPYL2 _ Dihydropyrimidinase-related protein 2	8	8	53.62	0.368	1.32
O08677	KNG1 _ Kininogen-1	13	9	87.44	0.032	9.26
O08709	PRDX6 _ Peroxiredoxin-6	4	4	23.65	0.017	5.01
O09114	PTGDS _ Isoform 2 of Prostaglandin-H2 D-isomerase	4	4	23.23	0.885	2.05
O35114	SCRB2 _ Lysosome membrane protein 2	4	4	20.32	0.898	1.13
O55042	SYUA _ Isoform 2 of Alpha-synuclein	3	3	17.30	0.086	6.76
P00342	LDHC _ L-lactate dehydrogenase C chain	5	3	28.76	0.675	1.18
P00920	CAH2 _ Carbonic anhydrase 2	46	43	251.67	0.215	2.44
P01027	CO3 _ Complement C3	74	67	392.89	0.015	13.17
P01631	KV2A7 _ Ig kappa chain V-II region 26-10	4	4	12.06	0.009	3.90
P01837	IGKC _ Ig kappa chain C region	6	5	39.11	0.969	1.17
P01864	GCAB _ Ig gamma-2A chain C region secreted form	11	11	68.98	0.969	3.93
P01867	IGG2B _ Ig gamma-2B chain C region	14	13	87.66	0.969	4.95
P01869	IGH1M _ Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form	23	22	125.38	0.969	1.15
P01878	IGHA _ Ig alpha chain C region	5	4	34.94	0.969	8.49
P01898	HA10 _ H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	7	4	41.33	0.969	3.25
P01942	HBA _ Hemoglobin subunit alpha	91	87	226.78	0.969	1.04
P01942	HBA _ Hemoglobin subunit alpha	134	115	323.43	0.969	8.86
P02088	HBB1 _ Hemoglobin subunit beta-1	243	132	589.34	0.969	6.97
P02089	HBB2 _ Hemoglobin subunit beta-2	112	3	180.31	0.969	26.47
P02535	K1C10 _ Keratin, type I cytoskeletal 10	30	14	165.65	0.969	6.60
P04104	K2C1 _ Keratin, type II cytoskeletal 1	25	14	107.72	0.969	3.35
P04443	HBB0 _ Hemoglobin subunit beta-H0	3	3	19.15	0.969	1.07
P04919	B3AT _ Band 3 anion transport protein	23	22	129.43	0.969	9.75
P04938	MUP8 _ Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	23	7	109.51	0.969	1.21
P05063	ALDOC _ Fructose-bisphosphate aldolase C	9	6	60.52	0.969	3.43
P05063	ALDOC _ Fructose-bisphosphate aldolase C	11	8	68.02	0.969	2.28
P05064	ALDOA _ Fructose-bisphosphate aldolase A	18	15	93.72	0.969	2.83
P05784	K1C18 _ Keratin, type I cytoskeletal 18	12	4	72.16	0.969	4.46
P06151	LDHA _ L-lactate dehydrogenase A chain	4	4	22.57	0.969	7.04
P06745	G6PI _ Glucose-6-phosphate isomerase	5	5	27.96	0.969	2.36
P07309	TTHY _ Transthyretin	12	12	60.53	0.969	1.27
P09542	MYL3 _ Myosin light chain 3	5	5	32.69	0.969	2.04
P09813	APOA2 _ Apolipoprotein A-II	6	6	14.55	0.969	17.36
P10649	GSTM1 _ Glutathione S-transferase Mu 1	3	3	18.64	0.969	1.02
P10649	GSTM1 _ Glutathione S-transferase Mu 1	4	4	24.61	0.969	6.10
P11589	MUP2 _ Major urinary protein 2	19	3	81.61	0.969	2.63
P13634	CAH1 _ Carbonic anhydrase 1	24	22	196.85	0.969	1.33
P15327	PMGE _ Bisphosphoglycerate mutase	12	10	78.71	0.969	4.28
P15532	NDKA _ Nucleoside diphosphate kinase A	6	5	37.67	0.969	1.05
P16858	G3P _ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11	9	71.44	0.969	12.62

P17156	HSP72 _ Heat shock-related 70 kDa protein 2	9	4	63.93	0.969	2.95
P17742	PPIA _ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	11	9	82.30	0.969	2.39
P17751	TPIS _ Triosephosphate isomerase	23	20	160.22	0.969	3.39
P17897	LYZ1 _ Lysozyme C-1	10	9	35.47	0.969	2.42
P19001	K1C19 _ Keratin, type I cytoskeletal 19	22	4	85.39	0.969	3.06
P19426	NELFE _ Negative elongation factor E	12	9	56.83	0.969	24.05
P20918	PLMN _ Plasminogen	3	3	14.27	0.969	1.79
P20918	PLMN _ Plasminogen	6	6	36.83	0.969	10.49
P21460	CYTC _ Cystatin-C	4	3	24.63	0.969	2.75
P21614	VTDB _ Vitamin D-binding protein	14	14	102.94	0.969	1.39
P22599	A1AT2 _ Alpha-1-antitrypsin 1-2	28	6	226.33	0.969	1.29
P23953	EST1C _ Carboxylesterase 1C	46	35	289.47	0.969	1.06
P24270	CATA _ Catalase	10	8	81.95	0.969	1.35
P28665	MUG1 _ Murinoglobulin-1	53	26	362.05	0.969	1.47
P28666	MUG2 _ Murinoglobulin-2	36	9	229.32	0.969	3.24
P29621	SPA3C _ Serine protease inhibitor A3C	7	3	60.27	0.969	1.59
P29621	SPA3C _ Serine protease inhibitor A3C	7	3	51.81	0.969	4.56
P29699	FETUA _ Alpha-2-HS-glycoprotein	9	9	72.47	0.969	1.26
P29699	FETUA _ Alpha-2-HS-glycoprotein	15	14	123.87	0.969	21.14
P50396	GDIA _ Rab GDP dissociation inhibitor alpha	6	5	32.87	0.969	1.65
P50446	K2C6A _ Keratin, type II cytoskeletal 6A	31	12	115.42	0.969	10.43
P50446	K2C6A _ Keratin, type II cytoskeletal 6A	20	5	135.68	0.969	1.99
P52480	KPYM _ Pyruvate kinase PKM	11	9	68.46	0.969	12.37
P61982	1433G _ 14-3-3 protein gamma	10	5	67.03	0.969	1.39
P61982	1433G _ 14-3-3 protein gamma	9	3	75.07	0.969	1.61
P62204	CALM _ Calmodulin	14	13	98.05	0.969	1.26
P62259	1433E _ 14-3-3 protein epsilon	17	10	118.62	0.969	1.32
P62984	RL40 _ Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14	13	70.64	0.969	6.19
P63101	1433Z _ 14-3-3 protein zeta/delta	19	13	140.06	0.969	1.67
P68369	TBA1A _ Tubulin alpha-1A chain	16	4	123.85	0.969	22.27
P70296	PEBP1 _ Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	7	6	53.77	0.969	3.55
P70339	FRAT1 _ Proto-oncogene FRAT1	5	4	18.08	0.969	33.64
Q00897	A1AT4 _ Alpha-1-antitrypsin 1-4	63	7	391.83	0.969	9.19
Q02257	PLAK _ Junction plakoglobin	5	5	24.30	0.969	1.39
Q04447	KCRB _ Creatine kinase B-type	23	16	163.82	0.969	10.03
Q06770	CBG _ Corticosteroid-binding globulin	11	10	90.78	0.969	1.00
Q06890	CLUS _ Clusterin	3	3	17.41	0.969	2.09
Q19LI2	A1BG _ Alpha-1B-glycoprotein	6	4	41.70	0.969	1.44
Q19LI2	A1BG _ Alpha-1B-glycoprotein	8	7	52.84	0.969	9.69
Q3TTY5	K22E _ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7	3	52.93	0.969	3.26
Q3U285	LCORL _ Ligand-dependent nuclear receptor corepressor-like protein	5	4	33.59	0.969	10.29
Q3U564	DCP1B _ mRNA-decapping enzyme 1B	12	8	58.53	0.969	2.11
Q52KR3	PRUN2 _ Protein prune homolog 2	7	7	29.92	0.969	3.20
Q60590	A1AG1 _ Alpha-1-acid glycoprotein 1	9	6	41.05	0.969	1.08
Q60674	NR1D2 _ Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2	5	4	24.21	0.969	2.27
Q61147	CERU _ Ceruloplasmin	3	3	15.07	0.969	4.48
Q61171	PRDX2 _ Peroxiredoxin-2	13	12	86.61	0.969	6.70
Q61171	PRDX2 _ Peroxiredoxin-2	17	17	125.39	0.969	1.21
Q61646	HPT _ Haptoglobin	7	6	61.76	0.969	2.80
Q61670	HLX _ H2.0-like homeobox protein	6	5	26.24	0.969	1.52
Q61838	A2M _ Alpha-2-macroglobulin	135	130	872.05	0.969	2.89
Q6IFX2	K1C42 _ Keratin, type I cytoskeletal 42	21	11	139.75	0.969	1.03
Q6IFX2	K1C42 _ Keratin, type I cytoskeletal 42	30	11	130.21	0.969	62.59

Q6IFZ6	K2C1B _ Keratin, type II cytoskeletal 1b	19	8	65.30	0.969	5.56
Q6NXH9	K2C73 _ Keratin, type II cytoskeletal 73	26	4	70.77	0.969	2.18
Q6P2L7	CASC4 _ Protein CASC4	4	4	23.51	0.969	1.27
Q6P2L7	CASC4 _ Protein CASC4	5	5	34.05	0.969	1.01
Q6VGS5	DAPLE _ Isoform 2 of Protein Daple	9	3	42.17	0.969	2.63
Q8BFZ3	ACTBL _ Beta-actin-like protein 2	19	7	120.08	0.969	5.86
Q8CFY5	COX10 _ Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	6	5	35.14	0.969	14.30
Q8VCT4	CES1D _ Carboxylesterase 1D	19	9	85.92	0.969	1.21
Q8VED5	K2C79 _ Keratin, type II cytoskeletal 79	10	4	56.25	0.969	1.02
Q91X72	HEMO _ Hemopexin	56	48	337.65	0.969	1.22
Q921I1	TRFE _ Serotransferrin	46	44	300.10	0.969	3.71
Q922U2	K2C5 _ Keratin, type II cytoskeletal 5	30	11	108.98	0.969	3.73
Q923D2	BLVRB _ Flavin reductase (NADPH)	11	10	58.53	0.969	4.90
Q9ESB3	HRG _ Histidine-rich glycoprotein	3	3	21.26	0.969	Infinity
Q9JIY0	PKHO1 _ Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	7	4	24.06	0.969	25.29
Q9JL35	HMG5 _ High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	4	4	31.27	0.969	2.12
Q9QWL7	K1C17 _ Keratin, type I cytoskeletal 17	28	4	121.61	0.969	4.15
Q9R0H5	K2C71 _ Keratin, type II cytoskeletal 71	20	8	95.24	0.969	1.40
Q9R111	GUAD _ Guanine deaminase	11	11	61.75	0.969	1.10
Q9Z2K1	K1C16 _ Keratin, type I cytoskeletal 16	9	3	66.26	0.969	1.04
Q9Z2K1	K1C16 _ Keratin, type I cytoskeletal 16	17	4	68.79	0.969	6.03
B9EKR1	PRPTZ _ Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	8	4	59.54	0.969	0.19
B9EKR1	PRPTZ _ Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	7	7	34.48	0.969	0.63
O08553	DPYL2 _ Dihydropyrimidinase-related protein 2	10	8	60.49	0.969	0.50
O08677	KNG1 _ Kininogen-1	14	13	81.21	0.969	0.83
O08709	PRDX6 _ Peroxiredoxin-6	7	7	42.40	0.969	0.70
O08983	HPS1 _ Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein homolog	9	6	38.52	0.969	0.41
O89020	AFAM _ Isoform 3 of Afamin	8	8	47.06	0.969	0.82
P00920	CAH2 _ Carbonic anhydrase 2	46	43	257.74	0.969	0.49
P01027	CO3 _ Complement C3	64	60	413.43	0.969	0.73
P01837	IGKC _ Ig kappa chain C region	3	3	32.53	0.969	0.47
P01864	GCAB _ Ig gamma-2A chain C region secreted form	7	6	41.64	0.969	0.82
P01867	IGG2B _ Ig gamma-2B chain C region	11	10	82.63	0.969	0.90
P01869	IGH1M _ Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form	11	11	62.32	0.969	0.64
P01872	IGHM _ Ig mu chain C region	14	13	79.40	0.969	0.61
P01872	IGHM _ Ig mu chain C region	20	14	157.56	0.969	0.47
P02088	HBB1 _ Hemoglobin subunit beta-1	202	123	517.13	0.969	0.67
P02535	K1C10 _ Keratin, type I cytoskeletal 10	48	22	216.72	0.969	0.21
P03995	GFAP _ Glial fibrillary acidic protein	8	3	30.89	0.969	0.31
P03995	GFAP _ Glial fibrillary acidic protein	32	19	168.47	0.969	0.45
P04104	K2C1 _ Keratin, type II cytoskeletal 1	29	16	148.37	0.969	0.41
P04919	B3AT _ Band 3 anion transport protein	28	27	168.61	0.969	0.62
P05064	ALDOA _ Fructose-bisphosphate aldolase A	17	15	100.77	0.969	0.37
P05201	AATC _ Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	12	12	90.25	0.969	0.73
P05201	AATC _ Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	18	15	123.78	0.969	0.63
P05213	TBA1B _ Tubulin alpha-1B chain	10	7	78.35	0.969	0.43
P06151	LDHA _ L-lactate dehydrogenase A chain	14	11	92.36	0.969	0.38
P06745	G6PI _ Glucose-6-phosphate isomerase	6	6	36.73	0.969	0.58

P07724	ALBU _ Serum albumin	313	297	1064.74	0.969	0.95
P07724	ALBU _ Serum albumin	339	324	912.14	0.969	0.57
P07758	A1AT1 _ Alpha-1-antitrypsin 1-1	60	3	371.51	0.969	0.40
P07759	SPA3K _ Serine protease inhibitor A3K	49	35	270.61	0.969	0.79
P07759	SPA3K _ Serine protease inhibitor A3K	22	13	165.92	0.969	0.41
P08032	SPTA1 _ Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	26	26	149.83	0.969	0.49
P08226	APOE _ Apolipoprotein E	9	6	50.33	0.969	0.60
P08228	SODC _ Superoxide dismutase [Cu-Zn]	18	18	80.94	0.969	0.53
P08228	SODC _ Superoxide dismutase [Cu-Zn]	24	20	134.59	0.969	0.66
P08249	MDHM _ Malate dehydrogenase, mitochondrial	13	11	62.11	0.969	0.58
P09411	PGK1 _ Phosphoglycerate kinase 1	7	6	47.93	0.969	0.37
P11352	GPX1 _ Glutathione peroxidase 1	9	7	64.80	0.969	0.64
P13634	CAH1 _ Carbonic anhydrase 1	24	20	159.45	0.969	0.77
P14152	MDHC _ Malate dehydrogenase, cytoplasmic	9	8	80.92	0.969	0.49
P14152	MDHC _ Malate dehydrogenase, cytoplasmic	16	14	109.63	0.969	0.77
P15327	PMGE _ Bisphosphoglycerate mutase	13	12	101.52	0.969	0.79
P16125	LDHB _ L-lactate dehydrogenase B chain	8	6	38.88	0.969	0.57
P16858	G3P _ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7	7	61.85	0.969	0.44
P17156	HSP72 _ Heat shock-related 70 kDa protein 2	14	7	107.11	0.969	0.30
P17182	ENOA _ Alpha-enolase	13	8	93.76	0.969	0.53
P17182	ENOA _ Alpha-enolase	14	9	101.05	0.969	0.37
P17183	ENOG _ Gamma-enolase	17	13	118.58	0.969	0.51
P17183	ENOG _ Gamma-enolase	19	17	133.90	0.969	0.97
P17742	PPIA _ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	14	14	97.82	0.969	0.51
P17751	TPIS _ Triosephosphate isomerase	16	13	133.12	0.969	0.65
P21614	VTDB _ Vitamin D-binding protein	15	15	103.41	0.969	0.35
P22599	A1AT2 _ Alpha-1-antitrypsin 1-2	60	13	380.02	0.969	0.54
P23492	PNPH _ Purine nucleoside phosphorylase	10	10	57.41	0.969	0.48
P23953	EST1C _ Carboxylesterase 1C	31	26	274.49	0.969	0.23
P24270	CATA _ Catalase	21	19	125.19	0.969	0.73
P26883	FKB1A _ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5	4	36.33	0.969	0.47
P28665	MUG1 _ Murinoglobulin-1	18	8	115.33	0.969	0.59
P32261	ANT3 _ Antithrombin-III	9	9	64.10	0.969	0.46
P35700	PRDX1 _ Peroxiredoxin-1	5	5	29.88	0.969	0.91
P40142	TKT _ Transketolase	4	4	17.39	0.969	0.63
P50396	GDIA _ Rab GDP dissociation inhibitor alpha	7	7	38.49	0.969	0.71
P56480	ATPB _ ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5	5	28.35	0.969	0.59
P58465	CTDSL _ CTD small phosphatase-like protein	4	3	23.84	0.969	0.35
P60710	ACTB _ Actin, cytoplasmic 1	23	12	146.13	0.969	0.68
P60710	ACTB _ Actin, cytoplasmic 1	31	16	194.61	0.969	0.81
P62204	CALM _ Calmodulin	13	11	79.23	0.969	0.52
P62259	1433E _ 14-3-3 protein epsilon	14	9	84.76	0.969	0.77
P62984	RL40 _ Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	3	3	27.67	0.969	0.59
P63017	HSP7C _ Heat shock cognate 71 kDa protein	25	17	151.95	0.969	0.52
P63017	HSP7C _ Heat shock cognate 71 kDa protein	22	17	136.99	0.969	0.56
P63101	1433Z _ 14-3-3 protein zeta/delta	19	13	137.99	0.969	0.40
P70296	PEBP1 _ Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	8	8	56.34	0.969	0.71
Q00623	APOA1 _ Apolipoprotein A-I	24	21	158.26	0.969	0.54
Q00623	APOA1 _ Apolipoprotein A-I	45	43	225.16	0.969	0.91
Q00896	A1AT3 _ Alpha-1-antitrypsin 1-3	30	9	215.75	0.969	0.71
Q00897	A1AT4 _ Alpha-1-antitrypsin 1-4	28	4	216.81	0.969	0.24
Q00898	A1AT5 _ Alpha-1-antitrypsin 1-5	41	15	281.32	0.969	0.46
Q02257	PLAK _ Junction plakoglobin	9	8	45.62	0.969	0.24

Q02566	MYH6 _ Myosin-6	24	6	144.72	0.969	0.65
Q03265	ATPA _ ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	9	9	50.02	0.969	0.71
Q03734	SPA3M _ Serine protease inhibitor A3M	12	3	86.25	0.969	0.24
Q03734	SPA3M _ Serine protease inhibitor A3M	31	16	163.11	0.969	0.42
Q04447	KCRB _ Creatine kinase B-type	17	14	114.59	0.969	0.33
Q06770	CBG _ Corticosteroid-binding globulin	19	17	133.14	0.969	0.48
Q0QWG9	GRD2I _ Delphilin	8	6	30.60	0.969	0.55
Q3TTY5	K22E _ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	26	12	162.30	0.969	0.37
Q3U5Q7	CMPK2 _ UMP-CMP kinase 2, mitochondrial	7	4	33.51	0.969	0.44
Q3UDP0	WDR41 _ Isoform 2 of WD repeat-containing protein 41	8	4	38.58	0.969	0.59
Q3UV17	K22O _ Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	13	8	59.67	0.969	0.78
Q3UV17	K22O _ Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	26	12	131.22	0.969	0.45
Q5SX39	MYH4 _ Myosin-4	9	5	48.49	0.969	0.52
Q61147	CERU _ Ceruloplasmin	22	21	115.21	0.969	0.52
Q61696	HS71A _ Heat shock 70 kDa protein 1A	10	6	57.61	0.969	0.69
Q61781	K1C14 _ Keratin, type I cytoskeletal 14	23	3	155.45	0.969	0.42
Q61838	A2M _ Alpha-2-macroglobulin	100	91	716.63	0.969	0.46
Q62179	SEM4B _ Semaphorin-4B	4	4	23.99	0.969	0.31
Q6GQT1	A2MP _ Alpha-2-macroglobulin-P	7	3	48.57	0.969	0.24
Q6IFZ6	K2C1B _ Keratin, type II cytoskeletal 1b	24	12	126.01	0.969	0.43
Q6IFZ9	K2C74 _ Keratin, type II cytoskeletal 74	15	3	62.77	0.969	0.23
Q6IMF0	KRT83 _ Keratin, type II cuticular Hb3	7	6	37.55	0.969	0.19
Q6NXH9	K2C73 _ Keratin, type II cytoskeletal 73	29	11	165.52	0.969	0.38
Q7SIG6	ASAP2 _ Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	7	7	30.67	0.969	0.46
Q7TN58	TMC8 _ Isoform 2 of Transmembrane channel-like protein 8	6	5	35.08	0.969	0.94
Q7TQ95	LNP _ Protein lunapark	6	4	32.11	0.969	0.63
Q7TSD4	TBATA _ Protein TBATA	5	5	27.14	0.969	0.40
Q80W93	HYDIN _ Isoform 2 of Hydrocephalus-inducing protein	5	5	23.87	0.969	0.39
Q80Y20	ALKB8 _ Isoform 2 of Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8	4	3	22.78	0.969	0.80
Q810U4	NRCAM _ Neuronal cell adhesion molecule	10	9	62.81	0.969	0.48
Q810U4	NRCAM _ Neuronal cell adhesion molecule	9	5	64.66	0.969	0.30
Q8BFZ3	ACTBL _ Beta-actin-like protein 2	11	6	86.41	0.969	0.51
Q8BLK9	KS6C1 _ Ribosomal protein S6 kinase delta-1	4	3	19.61	0.969	0.43
Q8K0E8	FIBB _ Fibrinogen beta chain	3	3	16.57	0.969	0.32
Q8R007	PVRL4 _ Nectin-4	6	5	40.42	0.969	0.84
Q8R1Q0	STX19 _ Syntaxin-19	6	6	32.31	0.969	0.48
Q8R3H9	TTC4 _ Tetratricopeptide repeat protein 4	3	3	25.53	0.969	0.96
Q8VCC2	EST1 _ Liver carboxylesterase 1	6	4	44.70	0.969	0.19
Q8VCT4	CES1D _ Carboxylesterase 1D	14	8	89.00	0.969	0.23
Q91X72	HEMO _ Hemopexin	21	18	166.98	0.969	0.94
Q91ZT5	FGD4 _ FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 4	8	4	50.70	0.969	0.36
Q921I1	TRFE _ Serotransferrin	107	104	684.16	0.969	0.90
Q922U2	K2C5 _ Keratin, type II cytoskeletal 5	28	17	210.17	0.969	0.41
Q923D2	BLVRB _ Flavin reductase (NADPH)	19	17	85.78	0.969	0.74
Q99N03	M4A10 _ Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 10	3	3	14.54	0.969	0.80
Q9CPU0	LGUL _ Lactoylglutathione lyase	4	4	24.50	0.969	0.56
Q9CQV8	1433B _ 14-3-3 protein beta/alpha	12	4	66.49	0.969	0.44
Q9CQV8	1433B _ 14-3-3 protein beta/alpha	11	6	73.91	0.969	0.97
Q9CWJ9	PUR9 _ Bifunctional purine biosynthesis protein	7	7	35.63	0.969	0.48
Q9CWJ9	PURH	7	7	35.63	0.969	0.48

	ODO2 _ Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	4	3	21.75	0.969	0.86
Q99ERD7	TBB3 _ Tubulin beta-3 chain	9	3	51.46	0.969	0.50
Q99QXV1	CBX8 _ Chromobox protein homolog 8	3	3	14.47	0.969	0.97
Q99QYE6	GOGA5 _ Golgin subfamily A member 5	4	3	19.17	0.969	0.31
Q99R0P9	UCHL1 _ Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	10	9	63.84	0.969	0.34
Q99R1E6	ENPP2 _ Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	3	3	21.27	0.969	0.39
Q99WV06	ANKR2 _ Ankyrin repeat domain-containing protein 2	3	3	14.98	0.969	0.41
<b>6 aylık</b>						
Q61879	MYH10_ Myosin-10	4	3	20.67	0.018	1.25
Q9ESB3	HRG_ Histidine-rich glycoprotein	3	3	22.63	0.052	1.56
P01631	KV2A7_ Ig kappa chain V-II region 26-10	3	3	19.49	0.078	1.53
Q8BW88	PKHS1_ Isoform 2 of Pleckstrin homology domain-containing family S member 1	4	3	20.41	0.261	1.42
Q99PI5	LPIN2_ Phosphatidate phosphatase LPIN2	3	3	21.56	0.423	1.10
P01878	IGHA_ Ig alpha chain C region	3	3	25.17	0.489	1.55
Q58A65	JIP4_ C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	4	3	17.18	0.523	1.10
Q8BFZ3	ACTBL_ Beta-actin-like protein 2	6	3	43.84	0.668	1.07
Q9ESB3	HRG_ Histidine-rich glycoprotein	3	3	21.26	0.109	7.72
Q61147	CERU_ Ceruloplasmin	3	3	15.07	0.165	3.04
P02089	HBB2_ Hemoglobin subunit beta-2	112	3	180.31	0.209	2.64
Q6VGS5	DAPLE_ Isoform 2 of Protein Daple	9	3	42.17	0.262	1.82
P29621	SPA3C_ Serine protease inhibitor A3C	7	3	51.81	0.313	3.59
Q06890	CLUS_ Clusterin	3	3	17.41	0.817	1.19
Q3UR70	TGFA1_ Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1	4	4	19.84	0.005	2.02
P08730	K1C13_ Keratin, type I cytoskeletal 13	8	4	62.06	0.007	1.67
P54797	TNG2_ Transport and Golgi organization 2 homolog	4	4	18.64	0.159	1.51
Q6P1G2	KDM2B_ Lysine-specific demethylase 2B	4	4	28.87	0.184	1.22
P16015	CAH3_ Carbonic anhydrase 3	4	4	27.71	0.317	1.45
P01837	IGKC_ Ig kappa chain C region	4	4	24.52	0.355	2.05
P31315	GSX1_ GS homeobox 1	4	4	35.51	0.401	1.71
P13020	GELS_ Isoform 2 of Gelsolin	4	4	22.99	0.458	1.28
P11352	GPX1_ Glutathione peroxidase 1	4	4	26.64	0.687	1.02
Q07456	AMBP_ Protein AMBP	5	4	32.07	0.865	1.05
P50428	ARSA_ Arylsulfatase A	5	4	18.66	0.889	1.07
P01631	KV2A7_ Ig kappa chain V-II region 26-10	4	4	12.06	0.020	5.04
O08709	PRDX6_ Peroxiredoxin-6	4	4	23.65	0.074	2.58
P10649	GSTM1_ Glutathione S-transferase Mu 1	4	4	24.61	0.107	3.22
Q9JL35	HMG5_ High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	4	4	31.27	0.125	5.49
O35114	SCR2_ Lysosome membrane protein 2	4	4	20.32	0.204	1.94
Q6NXH9	K2C73_ Keratin, type II cytoskeletal 73	26	4	70.77	0.359	2.25
P01898	HA10_ H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	7	4	41.33	0.458	1.34
Q9JIY0	PKHO1_ Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	7	4	24.06	0.463	1.41
P19001	K1C19_ Keratin, type I cytoskeletal 19	22	4	85.39	0.571	1.11
P68369	TBA1A_ Tubulin alpha-1A chain	16	4	123.85	0.704	1.26
P05784	K1C18_ Keratin, type I cytoskeletal 18	12	4	72.16	0.747	1.05
Q00898	A1AT5_ Alpha-1-antitrypsin 1-5	19	5	148.27	0.001	2.25

Q8BHW6	SPT21_ Spermatogenesis-associated protein 21	9	5	53.55	0.003	1.51
O09114	PTGDS_ Prostaglandin-H2 D-isomerase	5	5	37.73	0.280	1.15
Q8VCT4	CES1D_ Carboxylesterase 1D	10	5	70.04	0.423	1.08
O89020	AFAM_ Afamin	5	5	25.97	0.634	1.23
P59055	CSRN3_ Isoform 2 of Cysteine/serine-rich nuclear protein 3	5	5	38.05	0.675	1.09
Q3TTY5	K22E_ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7	5	41.81	0.704	1.09
P70339	FRAT1_ Proto-oncogene FRAT1	5	5	20.69	0.828	1.04
P06745	G6PI_ Glucose-6-phosphate isomerase	5	5	27.96	0.204	2.54
P01837	IGKC_ Ig kappa chain C region	6	5	39.11	0.281	2.91
Q8CFY5	COX10_ Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	6	5	35.14	0.620	1.27
Q6P2L7	CASC4_ Protein CASC4	5	5	34.05	0.620	1.71
P50396	GDIA_ Rab GDP dissociation inhibitor alpha	6	5	32.87	0.728	1.25
Q61670	HLX_ H2.0-like homeobox protein	6	5	26.24	0.974	1.02
Q60590	A1AG1_ Alpha-1-acid glycoprotein 1	6	6	26.28	0.155	1.42
P63017	HSP7C_ Heat shock cognate 71 kDa protein	6	6	42.52	0.325	1.01
P14152	MDHC_ Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6	6	48.52	0.565	1.14
P09813	APOA2_ Apolipoprotein A-II	6	6	14.55	0.023	45.45
P20918	PLMN_ Plasminogen	6	6	36.83	0.029	6.43
Q9CQV8	1433B_ 14-3-3 protein beta/alpha	11	6	73.91	0.462	3.96
P70296	PEBP1_ Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	7	6	53.77	0.695	1.13
P62204	CALM_ Calmodulin	9	7	76.70	0.406	1.32
P19221	THRB_ Prothrombin	8	7	53.34	0.498	1.17
Q19LI2	A1BG_ Alpha-1B-glycoprotein	8	7	52.84	0.151	2.08
Q00897	A1AT4_ Alpha-1-antitrypsin 1-4	63	7	391.83	0.465	1.30
Q52KR3	PRUN2_ Protein prune homolog 2	7	7	29.92	0.645	1.03
Q8BFZ3	ACTBL_ Beta-actin-like protein 2	19	7	120.08	0.704	1.19
Q8BRT1	CLAP2_ CLIP-associating protein 2	8	8	45.07	0.063	1.26
Q00897	A1AT4_ Alpha-1-antitrypsin 1-4	37	8	316.09	0.643	1.01
P24270	CATA_ Catalase	10	8	81.95	0.183	3.30
Q3U564	DCP1B_ mRNA-decapping enzyme 1B	12	8	58.53	0.846	1.08
O08553	DPYL2_ Dihydropyrimidinase-related protein 2	8	8	53.62	0.948	1.16
Q922U2	K2C5_ Keratin, type II cytoskeletal 5	17	9	111.34	0.265	1.07
P01869	IGH1M_ Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form	10	9	73.39	0.320	1.08
P28666	MUG2_ Murinoglobulin-2	16	9	133.98	0.544	1.06
P17742	PPIA_ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	11	9	82.30	0.111	1.87
P17897	LYZ1_ Lysozyme C-1	10	9	35.47	0.232	1.83
P19426	NELFE_ Negative elongation factor E	12	9	56.83	0.481	1.13
P52480	KPYM_ Pyruvate kinase PKM	11	9	68.46	0.777	1.29
P17183	ENOG_ Gamma-enolase	17	10	140.83	0.032	1.41
Q06770	CBG_ Corticosteroid-binding globulin	11	10	90.78	0.305	1.64
Q06770	CBG_ Corticosteroid-binding globulin	12	11	82.98	0.722	1.06
P01864	GCAB_ Ig gamma-2A chain C region secreted form	11	11	68.98	0.075	2.70
Q6IFX2	K1C42_ Keratin, type I cytoskeletal 42	30	11	130.21	0.323	1.81
Q04447	KCRB_ Creatine kinase B-type	15	12	98.39	0.744	1.02
P04919	B3AT_ Band 3 anion transport protein	14	12	103.27	0.958	1.02
P50446	K2C6A_ Keratin, type II cytoskeletal 6A	31	12	115.42	0.071	2.36
Q61171	PRDX2_ Peroxiredoxin-2	13	12	86.61	0.755	1.24
P13634	CAH1_ Carbonic anhydrase 1	13	13	107.42	0.051	1.25
P01867	IGG2B_ Ig gamma-2B chain C region	14	13	87.66	0.231	2.35
P29699	FETUA_ Alpha-2-HS-glycoprotein	15	14	123.87	0.628	1.14
P01867	IGG2B_ Ig gamma-2B chain C region	15	15	101.48	0.029	1.50
P05064	ALDOA_ Fructose-bisphosphate aldolase A	18	15	93.72	0.881	1.12

O08677	KNIG1_ Kininogen-1	16	16	100.57	0.913	1.06
Q04447	KCRB_ Creatine kinase B-type	23	16	163.82	0.649	1.28
Q03734	SPA3M_ Serine protease inhibitor A3M	31	16	163.11	0.714	1.36
P07759	SPA3K_ Serine protease inhibitor A3K	29	17	261.15	0.379	1.17
P01872	IGHM_ Ig mu chain C region	18	17	141.14	0.932	1.09
P00920	CAH2_ Carbonic anhydrase 2	19	18	116.22	0.399	1.24
P01869	IGH1M_ Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form	23	22	125.38	0.410	1.98
P28665	MUG1_ Murinoglobulin-1	53	26	362.05	0.095	2.42
Q91X72	HEMO_ Hemopexin	31	31	229.92	0.087	1.26
Q00623	APOA1_ Apolipoprotein A-I	45	43	225.16	0.819	1.59
P02088	HBB1_ Hemoglobin subunit beta-1	99	44	335.44	0.852	1.01
P01027	CO3_ Complement C3	74	67	392.89	0.760	1.01
Q921I1	TRFE_ Serotransferrin	75	73	573.28	0.014	1.42
P07724	ALBU_ Serum albumin	325	314	996.95	0.010	1.41
B5X0G2	MUP17_ Major urinary protein 17	6	3	41.62	0.000	0.41
Q6PDM1	MSL1_ Male-specific lethal 1 homolog	4	3	24.47	0.000	0.38
P07758	A1AT1_ Alpha-1-antitrypsin 1-1	37	3	307.34	0.072	0.55
P60710	ACTB_ Actin, cytoplasmic 1	12	3	94.97	0.170	0.47
Q9CW03	SMC3_ Structural maintenance of chromosomes protein 3	4	3	22.88	0.281	0.93
P0CG50	UBC_ Polyubiquitin-C	3	3	26.52	0.593	0.83
P07758	A1AT1_ Alpha-1-antitrypsin 1-1	60	3	371.51	0.001	0.23
P58465	CTDSL_ CTD small phosphatase-like protein	4	3	23.84	0.004	0.18
P61982	1433G_ 14-3-3 protein gamma	9	3	75.07	0.005	0.17
Q99N03	M4A10_ Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 10	3	3	14.54	0.030	0.49
Q8BLK9	KS6C1_ Ribosomal protein S6 kinase delta-1	4	3	19.61	0.099	0.58
Q80Y20	ALKB8_ Isoform 2 of Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8	4	3	22.78	0.103	0.54
Q9WV06	ANKR2_ Ankyrin repeat domain-containing protein 2	3	3	14.98	0.233	0.68
Q3TTY5	K22E_ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7	3	52.93	0.355	0.69
P21460	CYTC_ Cystatin-C	4	3	24.63	0.476	0.68
P11589	MUP2_ Major urinary protein 2	19	3	81.61	0.736	0.90
Q03717	KCNB1_ Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	5	4	25.94	0.000	0.52
P70296	PEBP1_ Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	4	4	20.64	0.002	0.60
Q6IFZ9	K2C74_ Keratin, type II cytoskeletal 74	7	4	44.55	0.078	0.83
Q3UDP0	WDR41_ Isoform 2 of WD repeat-containing protein 41	8	4	38.58	0.006	0.15
P06151	LDHA_ L-lactate dehydrogenase A chain	4	4	22.57	0.187	0.37
Q9QWL7	K1C17_ Keratin, type I cytoskeletal 17	28	4	121.61	0.246	0.65
Q9Z2K1	K1C16_ Keratin, type I cytoskeletal 16	17	4	68.79	0.847	0.87
P17156	HSP72_ Heat shock-related 70 kDa protein 2	9	4	63.93	0.949	0.88
P70339	FRAT1_ Proto-oncogene FRAT1	5	4	18.08	0.981	0.83
Q9DBQ7	PACE1_ Protein-associating with the carboxyl-terminal domain of ezrin	6	5	25.49	0.007	0.30
P97813	PLD2_ Phospholipase D2	5	5	24.51	0.254	0.82
Q9R0H5	K2C71_ Keratin, type II cytoskeletal 71	9	5	69.35	0.601	0.92
P15327	PMGE_ Bisphosphoglycerate mutase	5	5	35.11	0.990	0.85
Q7TSD4	TBATA_ Protein TBATA	5	5	27.14	0.003	0.23
Q02257	PLAK_ Junction plakoglobin	5	5	24.30	0.019	0.34
P29699	FETUA_ Alpha-2-HS-glycoprotein	8	6	70.04	0.003	0.40
Q5SVT3	ETAA1_ Isoform 2 of Ewing's tumor-associated antigen 1 homolog	7	6	41.93	0.014	0.27
Q91W39	NCOA5_ Nuclear receptor coactivator 5	7	6	49.06	0.091	0.86



P17742	PPIA_ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	6	6	55.70	0.250	0.87
P02535	K1C10_ Isoform 2 of Keratin, type I cytoskeletal 10	12	6	84.72	0.251	0.83
P03995	GFAP_ Glial fibrillary acidic protein	11	6	58.62	0.313	0.78
Q923D2	BLVRB_ Flavin reductase (NADPH)	6	6	37.95	0.770	0.93
Q3UV17	K22O_ Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	10	6	65.11	0.891	1.00
Q03734	SPA3M_ Serine protease inhibitor A3M	16	6	152.45	0.965	0.87
Q0QWG9	GRD2I_ Delphinin	8	6	30.60	0.000	0.23
Q8R1Q0	STX19_ Syntaxin-19	6	6	32.31	0.002	0.28
P08226	APOE_ Apolipoprotein E	9	6	50.33	0.451	0.49
Q61646	HPT_ Haptoglobin	7	6	61.76	0.686	0.29
Q60590	A1AG1_ Alpha-1-acid glycoprotein 1	9	6	41.05	0.879	0.82
P08226	APOE_ Apolipoprotein E	8	7	49.11	0.108	0.89
B9EKR1	PRPTZ_ Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	7	7	34.48	0.005	0.25
P04938	MUP8_ Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	23	7	109.51	0.407	0.48
P32261	ANT3_ Antithrombin-III	8	8	45.04	0.046	0.79
P68369	TBA1A_ Tubulin alpha-1A chain	9	8	64.01	0.210	0.72
Q3UV17	K22O_ Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	13	8	59.67	0.078	0.44
P05063	ALDOC_ Fructose-bisphosphate aldolase C	11	8	68.02	0.218	0.58
P17182	ENOA_ Alpha-enolase	13	8	93.76	0.301	0.63
Q6IFZ6	K2C1B_ Keratin, type II cytoskeletal 1b	19	8	65.30	0.880	0.83
Q6IFZ6	K2C1B_ Keratin, type II cytoskeletal 1b	18	9	112.21	0.027	0.60
P63101	1433Z_ 14-3-3 protein zeta/delta	9	9	73.27	0.326	0.96
P22599	A1AT2_ Alpha-1-antitrypsin 1-2	35	9	309.51	0.403	0.88
Q80TM9	NISCH_ Nischarin	9	9	43.28	0.949	1.00
O08677	KNGL_ Kininogen-1	13	9	87.44	0.581	0.64
P16858	G3P_ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11	9	71.44	0.632	0.79
Q8VCT4	CES1D_ Carboxylesterase 1D	19	9	85.92	0.651	0.70
Q810U4	NRCAM_ Neuronal cell adhesion molecule	10	9	62.81	0.838	0.98
P28666	MUG2_ Murinoglobulin-2	36	9	229.32	0.894	0.86
P04104	K2C1_ Keratin, type II cytoskeletal 1	15	10	107.53	0.084	0.71
P08228	SODC_ Superoxide dismutase [Cu-Zn]	10	10	80.30	0.527	0.90
P15327	PMGE_ Bisphosphoglycerate mutase	12	10	78.71	0.067	0.48
P62259	1433E_ 14-3-3 protein epsilon	17	10	118.62	0.910	0.54
P05201	AATC_ Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	12	11	78.34	0.956	0.99
Q922U2	K2C5_ Keratin, type II cytoskeletal 5	30	11	108.98	0.781	0.79
Q61171	PRDX2_ Peroxiredoxin-2	13	12	80.17	0.354	0.86
P07309	TTHY_ Transthyretin	12	12	60.53	0.391	0.22
P17182	ENOA_ Alpha-enolase	17	13	109.43	0.615	0.97
P22599	A1AT2_ Alpha-1-antitrypsin 1-2	60	13	380.02	0.055	0.43
P62204	CALM_ Calmodulin	14	13	98.05	0.161	0.51
P62984	RL40_ Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14	13	70.64	0.186	0.57
P63101	1433Z_ 14-3-3 protein zeta/delta	19	13	140.06	0.205	0.55
P21614	VTDB_ Vitamin D-binding protein	15	14	146.69	0.000	0.55
P01872	IGHM_ Ig mu chain C region	20	14	157.56	0.001	0.19
P14152	MDHC_ Malate dehydrogenase, cytoplasmic	16	14	109.63	0.014	0.34
P04104	K2C1_ Keratin, type II cytoskeletal 1	25	14	107.72	0.698	0.79
P21614	VTDB_ Vitamin D-binding protein	14	14	102.94	0.920	0.80
P02535	K1C10_ Keratin, type I cytoskeletal 10	30	14	165.65	0.971	0.82
P28665	MUG1_ Murinoglobulin-1	24	15	173.46	0.006	0.71
P17751	TPIS_ Triosephosphate isomerase	16	15	105.97	0.695	0.99
P05201	AATC_ Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	18	15	123.78	0.008	0.27
Q00898	A1AT5_ Alpha-1-antitrypsin 1-5	41	15	281.32	0.009	0.29
P60710	ACTB_ Actin, cytoplasmic 1	31	16	194.61	0.030	0.29

P63017	HSP7C_ Heat shock cognate 71 kDa protein	22	17	136.99	0.002	0.21
Q923D2	BLVRB_ Flavin reductase (NADPH)	19	17	85.78	0.015	0.39
P17183	ENOG_ Gamma-enolase	19	17	133.90	0.226	0.59
Q61147	CERU_ Ceruloplasmin	19	19	123.79	0.526	0.62
P03995	GFAP_ Glial fibrillary acidic protein	32	19	168.47	0.005	0.31
P08228	SODC_ Superoxide dismutase [Cu-Zn]	24	20	134.59	0.001	0.26
P13634	CAH1_ Carbonic anhydrase 1	24	20	159.45	0.098	0.39
P17751	TPIS_ Triosephosphate isomerase	23	20	160.22	0.731	0.79
P23953	EST1C_ Carboxylesterase 1C	28	22	228.13	0.009	0.64
P04919	B3AT_ Band 3 anion transport protein	23	22	129.43	0.997	0.83
Q00623	APOA1_ Apolipoprotein A-I	27	24	204.10	0.159	0.74
P23953	EST1C_ Carboxylesterase 1C	46	35	289.47	0.118	0.26
P07759	SPA3K_ Serine protease inhibitor A3K	49	35	270.61	0.648	0.59
P00920	CAH2_ Carbonic anhydrase 2	46	43	251.67	0.297	0.63
P01027	CO3_ Complement C3	50	44	345.68	0.304	0.90
Q921I1	TRFE_ Serotransferrin	46	44	300.10	0.792	0.88
Q91X72	HEMO_ Hemopexin	56	48	337.65	0.042	0.39
P01942	HBA_ Hemoglobin subunit alpha	80	71	200.56	0.127	0.91
Q61838	A2M_ Alpha-2-macroglobulin	96	89	674.05	0.398	0.83
P01942	HBA_ Hemoglobin subunit alpha	134	115	323.43	0.842	0.81
Q61838	A2M_ Alpha-2-macroglobulin	135	130	872.05	0.718	0.77
P02088	HBB1_ Hemoglobin subunit beta-1	243	132	589.34	0.708	0.74
P07724	ALBU_ Serum albumin	339	324	912.14	0.049	0.48

## 12 aylık

Q9WV06	ANKR2_ Ankyrin repeat domain-containing protein 2	3	3	14.98	0.003	1.87
P21460	CYTC_ Cystatin-C	4	3	24.63	0.055	2.18
P29621	SPA3C_ Serine protease inhibitor A3C	7	3	51.81	0.075	2.18
Q3TTY5	K22E_ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7	3	52.93	0.107	1.24
Q6VGS5	DAPLE_ Isoform 2 of Protein Daple	9	3	42.17	0.190	1.44
P11589	MUP2_ Major urinary protein 2	19	3	81.61	0.238	1.66
P02089	HBB2_ Hemoglobin subunit beta-2	112	3	180.31	0.487	1.22
Q80Y20	ALKB8_ Isoform 2 of Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8	4	3	22.78	0.521	1.16
Q99N03	M4A10_ Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 10	3	3	14.54	0.773	1.03
Q6VGS5	DAPLE_ Isoform 2 of Protein Daple	9	3	42.17	0.013	2.97
P02089	HBB2_ Hemoglobin subunit beta-2	112	3	180.31	0.052	2.42
P29621	SPA3C_ Serine protease inhibitor A3C	7	3	51.81	0.077	2.49
P11589	MUP2_ Major urinary protein 2	19	3	81.61	0.209	1.53
O35114	SCR2_ Lysosome membrane protein 2	4	4	20.32	0.064	2.85
Q6NXH9	K2C73_ Keratin, type II cytoskeletal 73	26	4	70.77	0.100	1.84
Q9JIY0	PKHO1_ Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	7	4	24.06	0.196	1.74
Q9JL35	HMG5_ High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	4	4	31.27	0.214	1.73
P01898	HA10_ H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	7	4	41.33	0.249	1.48
P17156	HSP72_ Heat shock-related 70 kDa protein 2	9	4	63.93	0.260	1.31
P05784	K1C18_ Keratin, type I cytoskeletal 18	12	4	72.16	0.303	1.85
P70339	FRAT1_ Proto-oncogene FRAT1	5	4	18.08	0.350	1.16
P68369	TBA1A_ Tubulin alpha-1A chain	16	4	123.85	0.380	1.65
Q9Z2K1	K1C16_ Keratin, type I cytoskeletal 16	17	4	68.79	0.482	1.23
P68369	TBA1A_ Tubulin alpha-1A chain	16	4	123.85	0.023	3.51
Q9JIY0	PKHO1_ Pleckstrin homology domain-containing family O member 1	7	4	24.06	0.044	2.39

P01898	HA10_ H-2 class I histocom5XFADibility antigen, Q10 alpha chain	7	4	41.33	0.104	1.86
P17156	HSP72_ Heat shock-related 70 kDa protein 2	9	4	63.93	0.161	1.41
P70339	FRAT1_ Proto-oncogene FRAT1	5	4	18.08	0.179	1.40
Q9JL35	HMG5_ High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	4	4	31.27	0.363	1.27
P01631	KV2A7_ Ig kappa chain V-II region 26-10	4	4	12.06	0.588	1.12
Q61670	HLX_ H2.0-like homeobox protein	6	5	26.24	0.163	1.52
Q8CFY5	COX10_ Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	6	5	35.14	0.290	1.33
P50396	GDIA_ Rab GDP dissociation inhibitor alpha	6	5	32.87	0.460	1.20
Q6P2L7	CASC4_ Protein CASC4	5	5	34.05	0.977	1.19
Q61670	HLX_ H2.0-like homeobox protein	6	5	26.24	0.090	1.60
Q8CFY5	COX10_ Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial	6	5	35.14	0.172	1.48
Q6P2L7	CASC4_ Protein CASC4	5	5	34.05	0.263	1.43
P09813	APOA2_ Apolipoprotein A-II	6	6	14.55	0.089	2.57
P08226	APOE_ Apolipoprotein E	9	6	50.33	0.743	1.30
P09813	APOA2_ Apolipoprotein A-II	6	6	14.55	0.093	2.46
P20918	PLMN_ Plasminogen	6	6	36.83	0.343	1.27
Q52KR3	PRUN2_ Protein prune homolog 2	7	7	29.92	0.014	1.59
Q19LI2	A1BG_ Alpha-1B-glycoprotein	8	7	52.84	0.153	2.11
Q8BFZ3	ACTBL_ Beta-actin-like protein 2	19	7	120.08	0.183	1.82
Q00897	A1AT4_ Alpha-1-antitrypsin 1-4	63	7	391.83	0.288	1.44
Q00897	A1AT4_ Alpha-1-antitrypsin 1-4	63	7	391.83	0.041	1.62
Q19LI2	A1BG_ Alpha-1B-glycoprotein	8	7	52.84	0.067	2.50
Q8BFZ3	ACTBL_ Beta-actin-like protein 2	19	7	120.08	0.069	1.97
P05063	ALDOC_ Fructose-bisphosphate aldolase C	11	8	68.02	0.240	1.26
Q3U564	DCP1B_ mRNA-decapping enzyme 1B	12	8	58.53	0.534	1.15
P17182	ENOA_ Alpha-enolase	13	8	93.76	0.540	1.16
Q3UV17	K22O_ Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	13	8	59.67	0.849	1.05
P24270	CATA_ Catalase	10	8	81.95	0.372	1.15
Q3U564	DCP1B_ mRNA-decapping enzyme 1B	12	8	58.53	0.717	1.14
Q810U4	NRCAM_ Neuronal cell adhesion molecule	10	9	62.81	0.035	2.41
P52480	KPYM_ Pyruvate kinase PKM	11	9	68.46	0.057	1.55
O08677	KNG1_ Kininogen-1	13	9	87.44	0.222	1.60
P19426	NELFE_ Negative elongation factor E	12	9	56.83	0.235	2.16
Q8VCT4	CES1D_ Carboxylesterase 1D	19	9	85.92	0.264	1.26
P28666	MUG2_ Murinoglobulin-2	36	9	229.32	0.279	1.25
P19426	NELFE_ Negative elongation factor E	12	9	56.83	0.042	2.88
P52480	KPYM_ Pyruvate kinase PKM	11	9	68.46	0.141	1.45
Q8VCT4	CES1D_ Carboxylesterase 1D	19	9	85.92	0.220	1.35
Q810U4	NRCAM_ Neuronal cell adhesion molecule	10	9	62.81	0.336	1.09
P28666	MUG2_ Murinoglobulin-2	36	9	229.32	0.344	1.21
O08677	KNG1_ Kininogen-1	13	9	87.44	0.987	1.10
Q06770	CBG_ Corticosteroid-binding globulin	11	10	90.78	0.620	1.05
Q06770	CBG_ Corticosteroid-binding globulin	11	10	90.78	0.138	1.50
P62259	1433E_ 14-3-3 protein epsilon	17	10	118.62	0.246	1.68
Q922U2	K2C5_ Keratin, type II cytoskeletal 5	30	11	108.98	0.579	1.50
Q6IFX2	K1C42_ Keratin, type I cytoskeletal 42	30	11	130.21	0.176	1.65
P01864	GCAB_ Ig gamma-2A chain C region secreted form	11	11	68.98	0.487	1.22
Q61171	PRDX2_ Peroxiredoxin-2	13	12	86.61	0.073	1.42
P07309	TTHY_ Transthyretin	12	12	60.53	0.458	1.19
Q61171	PRDX2_ Peroxiredoxin-2	13	12	86.61	0.149	1.33
P02535	K1C10_ Keratin, type I cytoskeletal 10	30	14	165.65	0.140	1.32
P29699	FETUA_ Alpha-2-HS-glycoprotein	15	14	123.87	0.279	1.38

P21614	VTDB_ Vitamin D-binding protein	14	14	102.94	0.745	1.05
P29699	FETUA_ Alpha-2-HS-glycoprotein	15	14	123.87	0.100	1.68
P02535	K1C10_ Keratin, type I cytoskeletal 10	30	14	165.65	0.243	1.37
P21614	VTDB_ Vitamin D-binding protein	14	14	102.94	0.365	1.17
P05064	ALDOA_ Fructose-bisphosphate aldolase A	18	15	93.72	0.794	1.07
Q04447	KCRB_ Creatine kinase B-type	23	16	163.82	0.263	1.20
P17183	ENOG_ Gamma-enolase	19	17	133.90	0.475	1.13
P17183	ENOG_ Gamma-enolase	19	17	133.90	0.816	1.03
P17751	TPIS_ Triosephosphate isomerase	23	20	160.22	0.252	1.32
P17751	TPIS_ Triosephosphate isomerase	23	20	160.22	0.243	1.29
P04919	B3AT_ Band 3 anion transport protein	23	22	129.43	0.287	1.29
P04919	B3AT_ Band 3 anion transport protein	23	22	129.43	0.190	1.38
P28665	MUG1_ Murinoglobulin-1	53	26	362.05	0.235	1.49
P28665	MUG1_ Murinoglobulin-1	53	26	362.05	0.128	1.48
P23953	EST1C_ Carboxylesterase 1C	46	35	289.47	0.563	1.01
Q00623	APOA1_ Apolipoprotein A-I	45	43	225.16	0.966	1.02
P00920	CAH2_ Carbonic anhydrase 2	46	43	251.67	0.377	1.15
Q921I1	TRFE_ Serotransferrin	46	44	300.10	0.291	1.42
Q921I1	TRFE_ Serotransferrin	46	44	300.10	0.058	1.73
P01027	CO3_ Complement C3	74	67	392.89	0.193	1.56
P01027	CO3_ Complement C3	74	67	392.89	0.378	1.37
P01942	HBA_ Hemoglobin subunit alpha	134	115	323.43	0.167	1.22
P01942	HBA_ Hemoglobin subunit alpha	134	115	323.43	0.413	1.12
Q61838	A2M_ Alpha-2-macroglobulin	135	130	872.05	0.278	1.13
Q61838	A2M_ Alpha-2-macroglobulin	135	130	872.05	0.262	1.20
P02088	HBB1_ Hemoglobin subunit beta-1	243	132	589.34	0.324	1.14
P02088	HBB1_ Hemoglobin subunit beta-1	243	132	589.34	0.313	1.19
Q9ESB3	HRG_ Histidine-rich glycoprotein	3	3	21.26	0.015	0.27
P61982	1433G_ 14-3-3 protein gamma	9	3	75.07	0.025	0.52
Q61147	CERU_ Ceruloplasmin	3	3	15.07	0.108	0.36
P07758	A1AT1_ Alpha-1-antitrypsin 1-1	60	3	371.51	0.135	0.59
Q8BLK9	KS6C1_ Ribosomal protein S6 kinase delta-1	4	3	19.61	0.231	0.50
Q06890	CLUS_ Clusterin	3	3	17.41	0.536	0.94
P58465	CTDSL_ CTD small phosphatase-like protein	4	3	23.84	0.602	0.71
P07758	A1AT1_ Alpha-1-antitrypsin 1-1	60	3	371.51	0.003	0.43
P61982	1433G_ 14-3-3 protein gamma	9	3	75.07	0.013	0.33
Q8BLK9	KS6C1_ Ribosomal protein S6 kinase delta-1	4	3	19.61	0.101	0.56
Q9WV06	ANKR2_ Ankyrin repeat domain-containing protein 2	3	3	14.98	0.126	0.64
Q80Y20	ALKB8_ Isoform 2 of Alkylated DNA repair protein alkB homolog 8	4	3	22.78	0.175	0.74
Q3TTY5	K22E_ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7	3	52.93	0.296	0.52
Q99N03	M4A10_ Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 10	3	3	14.54	0.298	0.85
Q06890	CLUS_ Clusterin	3	3	17.41	0.310	0.32
P58465	CTDSL_ CTD small phosphatase-like protein	4	3	23.84	0.491	0.69
Q61147	CERU_ Ceruloplasmin	3	3	15.07	0.524	0.89
Q9ESB3	HRG_ Histidine-rich glycoprotein	3	3	21.26	0.728	0.51
P21460	CYTC_ Cystatin-C	4	3	24.63	0.769	0.80
P06151	LDHA_ L-lactate dehydrogenase A chain	4	4	22.57	0.001	0.30
Q3UDP0	WDR41_ Isoform 2 of WD repeat-containing protein 41	8	4	38.58	0.192	0.59
P01631	KV2A7_ Ig kappa chain V-II region 26-10	4	4	12.06	0.217	0.42
P10649	GSTM1_ Glutathione S-transferase Mu 1	4	4	24.61	0.355	0.44
O08709	PRDX6_ Peroxiredoxin-6	4	4	23.65	0.660	0.87
Q9QWL7	K1C17_ Keratin, type I cytoskeletal 17	28	4	121.61	0.696	0.97
P19001	K1C19_ Keratin, type I cytoskeletal 19	22	4	85.39	0.871	1.00

P06151	LDHA_ L-lactate dehydrogenase A chain	4	4	22.57	0.115	0.46
Q3UDP0	WDR41_ Isoform 2 of WD repeat-containing protein 41	8	4	38.58	0.171	0.52
Q9QWL7	K1C17_ Keratin, type I cytoskeletal 17	28	4	121.61	0.277	0.33
P10649	GSTM1_ Glutathione S-transferase Mu 1	4	4	24.61	0.307	0.74
O35114	SCRB2_ Lysosome membrane protein 2	4	4	20.32	0.700	0.97
Q6NXH9	K2C73_ Keratin, type II cytoskeletal 73	26	4	70.77	0.712	0.83
Q9Z2K1	K1C16_ Keratin, type I cytoskeletal 16	17	4	68.79	0.739	0.74
P05784	K1C18_ Keratin, type I cytoskeletal 18	12	4	72.16	0.933	0.67
O08709	PRDX6_ Peroxiredoxin-6	4	4	23.65	0.949	0.98
P19001	K1C19_ Keratin, type I cytoskeletal 19	22	4	85.39	0.974	0.79
Q02257	PLAK_ Junction plakoglobin	5	5	24.30	0.034	0.55
P01837	IGKC_ Ig kappa chain C region	6	5	39.11	0.038	0.37
Q7TSD4	TBATA_ Protein TBATA	5	5	27.14	0.045	0.52
P06745	G6PI_ Glucose-6-phosphate isomerase	5	5	27.96	0.118	0.42
Q7TSD4	TBATA_ Protein TBATA	5	5	27.14	0.007	0.41
Q02257	PLAK_ Junction plakoglobin	5	5	24.30	0.027	0.40
P06745	G6PI_ Glucose-6-phosphate isomerase	5	5	27.96	0.247	0.71
P01837	IGKC_ Ig kappa chain C region	6	5	39.11	0.295	0.76
P50396	GDIA_ Rab GDP dissociation inhibitor alpha	6	5	32.87	0.824	0.88
Q8R1Q0	STX19_ Syntaxin-19	6	6	32.31	0.031	0.57
P70296	PEBP1_ Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	7	6	53.77	0.034	0.33
Q60590	A1AG1_ Alpha-1-acid glycoprotein 1	9	6	41.05	0.040	0.32
Q0QWG9	GRD2I_ Delphinin	8	6	30.60	0.051	0.51
Q61646	HPT_ Haptoglobin	7	6	61.76	0.264	0.21
P20918	PLMN_ Plasminogen	6	6	36.83	0.446	0.59
Q9CQV8	1433B_ 14-3-3 protein beta/alpha	11	6	73.91	0.768	0.95
Q0QWG9	GRD2I_ Delphinin	8	6	30.60	0.002	0.49
Q8R1Q0	STX19_ Syntaxin-19	6	6	32.31	0.040	0.55
P70296	PEBP1_ Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	7	6	53.77	0.065	0.58
P08226	APOE_ Apolipoprotein E	9	6	50.33	0.184	0.39
Q61646	HPT_ Haptoglobin	7	6	61.76	0.510	0.91
Q9CQV8	1433B_ 14-3-3 protein beta/alpha	11	6	73.91	0.567	0.75
Q60590	A1AG1_ Alpha-1-acid glycoprotein 1	9	6	41.05	0.594	0.78
P04938	MUP8_ Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	23	7	109.51	0.232	0.61
B9EKR1	PRPTZ_ Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	7	7	34.48	0.276	0.60
B9EKR1	PRPTZ_ Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	7	7	34.48	0.027	0.40
P04938	MUP8_ Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	23	7	109.51	0.264	0.76
Q52KR3	PRUN2_ Protein prune homolog 2	7	7	29.92	0.349	0.89
Q6IFZ6	K2C1B_ Keratin, type II cytoskeletal 1b	19	8	65.30	0.554	0.86
O08553	DPYL2_ Dihydropyrimidinase-related protein 2	8	8	53.62	0.958	0.79
P24270	CATA_ Catalase	10	8	81.95	0.968	0.92
Q6IFZ6	K2C1B_ Keratin, type II cytoskeletal 1b	19	8	65.30	0.406	0.21
O08553	DPYL2_ Dihydropyrimidinase-related protein 2	8	8	53.62	0.572	0.77
P05063	ALDOC_ Fructose-bisphosphate aldolase C	11	8	68.02	0.666	0.84
Q3UV17	K22O_ Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	13	8	59.67	0.715	0.89
P17182	ENOA_ Alpha-enolase	13	8	93.76	0.895	0.99
P17742	PPIA_ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	11	9	82.30	0.045	0.43
P17897	LYZ1_ Lysozyme C-1	10	9	35.47	0.433	0.10
P16858	G3P_ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11	9	71.44	0.874	0.89
P16858	G3P_ Glyceraldehyde-3-phosphate	11	9	71.44	0.114	0.74

dehydrogenase						
P17742	PPIA_ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	11	9	82.30	0.179	0.76
P17897	LYZ1_ Lysozyme C-1	10	9	35.47	0.683	0.19
P15327	PMGE_ Bisphosphoglycerate mutase	12	10	78.71	0.779	0.95
P62259	1433E_ 14-3-3 protein epsilon	17	10	118.62	0.889	0.95
P15327	PMGE_ Bisphosphoglycerate mutase	12	10	78.71	0.659	0.88
P01864	GCAB_ Ig gamma-2A chain C region secreted form	11	11	68.98	0.067	0.55
Q61FX2	K1C42_ Keratin, type I cytoskeletal 42	30	11	130.21	0.976	0.50
Q922U2	K2C5_ Keratin, type II cytoskeletal 5	30	11	108.98	0.984	0.93
P50446	K2C6A_ Keratin, type II cytoskeletal 6A	31	12	115.42	0.512	0.86
P07309	TTHY_ Transthyretin	12	12	60.53	0.606	0.93
P50446	K2C6A_ Keratin, type II cytoskeletal 6A	31	12	115.42	0.687	0.44
P62204	CALM_ Calmodulin	14	13	98.05	0.030	0.42
P62984	RL40_ Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14	13	70.64	0.076	0.67
P22599	A1AT2_ Alpha-1-antitrypsin 1-2	60	13	380.02	0.092	0.47
P01867	IGG2B_ Ig gamma-2B chain C region	14	13	87.66	0.226	0.45
P63101	1433Z_ 14-3-3 protein zeta/delta	19	13	140.06	0.800	0.97
P22599	A1AT2_ Alpha-1-antitrypsin 1-2	60	13	380.02	0.012	0.46
P62204	CALM_ Calmodulin	14	13	98.05	0.048	0.59
P01867	IGG2B_ Ig gamma-2B chain C region	14	13	87.66	0.119	0.66
P62984	RL40_ Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14	13	70.64	0.147	0.71
P63101	1433Z_ 14-3-3 protein zeta/delta	19	13	140.06	0.634	0.89
P14152	MDHC_ Malate dehydrogenase, cytoplasmic	16	14	109.63	0.033	0.41
P01872	IGHM_ Ig mu chain C region	20	14	157.56	0.051	0.54
P04104	K2C1_ Keratin, type II cytoskeletal 1	25	14	107.72	0.236	0.65
P01872	IGHM_ Ig mu chain C region	20	14	157.56	0.002	0.39
P14152	MDHC_ Malate dehydrogenase, cytoplasmic	16	14	109.63	0.023	0.58
P04104	K2C1_ Keratin, type II cytoskeletal 1	25	14	107.72	0.421	0.14
P05201	AATC_ Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	18	15	123.78	0.016	0.47
P05064	ALDOA_ Fructose-bisphosphate aldolase A	18	15	93.72	0.578	0.76
Q00898	A1AT5_ Alpha-1-antitrypsin 1-5	41	15	281.32	0.860	0.91
Q00898	A1AT5_ Alpha-1-antitrypsin 1-5	41	15	281.32	0.004	0.45
P05201	AATC_ Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	18	15	123.78	0.071	0.17
Q03734	SPA3M_ Serine protease inhibitor A3M	31	16	163.11	0.009	0.27
P60710	ACTB_ Actin, cytoplasmic 1	31	16	194.61	0.140	0.46
P60710	ACTB_ Actin, cytoplasmic 1	31	16	194.61	0.028	0.34
Q03734	SPA3M_ Serine protease inhibitor A3M	31	16	163.11	0.216	0.70
Q04447	KCRB_ Creatine kinase B-type	23	16	163.82	0.881	1.00
P63017	HSP7C_ Heat shock cognate 71 kDa protein	22	17	136.99	0.101	0.53
Q923D2	BLVRB_ Flavin reductase (NADPH)	19	17	85.78	0.252	0.86
P63017	HSP7C_ Heat shock cognate 71 kDa protein	22	17	136.99	0.004	0.41
Q923D2	BLVRB_ Flavin reductase (NADPH)	19	17	85.78	0.129	0.71
P03995	GFAP_ Glial fibrillary acidic protein	32	19	168.47	0.081	0.65
P03995	GFAP_ Glial fibrillary acidic protein	32	19	168.47	0.087	0.39
P08228	SODC_ Superoxide dismutase [Cu-Zn]	24	20	134.59	0.040	0.55
P13634	CAH1_ Carbonic anhydrase 1	24	20	159.45	0.079	0.70
P08228	SODC_ Superoxide dismutase [Cu-Zn]	24	20	134.59	0.007	0.53
P13634	CAH1_ Carbonic anhydrase 1	24	20	159.45	0.053	0.50
P01869	IGH1M_ Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form	23	22	125.38	0.982	0.84
P01869	IGH1M_ Ig gamma-1 chain C region, membrane-bound form	23	22	125.38	0.993	0.90
P07759	SPA3K_ Serine protease inhibitor A3K	49	35	270.61	0.026	0.20
P23953	EST1C_ Carboxylesterase 1C	46	35	289.47	0.461	0.79
P07759	SPA3K_ Serine protease inhibitor A3K	49	35	270.61	0.467	0.79

P00920	CAH2_ Carbonic anhydrase 2	46	43	251.67	0.135	0.79
Q00623	APOA1_ Apolipoprotein A-I	45	43	225.16	0.090	0.64
Q91X72	HEMO_ Hemopexin	56	48	337.65	0.208	0.65
Q91X72	HEMO_ Hemopexin	56	48	337.65	0.854	0.95
P07724	ALBU_ Serum albumin	339	324	912.14	0.151	0.67
P07724	ALBU_ Serum albumin	339	324	912.14	0.004	0.56



## 11.ETİK KURUL ONAYI

T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

Sayı : 38328770 -54  
Konu: Etik Kurulu Kararı

01/06/2015

Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tank BAYKAL

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Beyin Ekstraselüler Matriksinin Nörodejenerasyondaki Rolünün Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Araştırılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.



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

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Tel: (0216)681 51 37  
Faks:(0212)531 75 55  
E-mail: [ilknurfil@medipol.edu.tr](mailto:ilknurfil@medipol.edu.tr)

Adres:Kavacık Mah.Ekinciler Cad.No:19,34810  
Kavacık/BETKOZ





T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)  
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
01/06/2015	39		Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL

"Beyin Ekstraselüler Matriksinin Nörodejenerasyondaki Rolünün Alzheimer Hastalığı Fare Modelinde Araştırılması" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Ağustos 2013- Ağustos 2016

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

## 12.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Büşra	<b>Soyadı</b>	Gürel
<b>Doğum Yeri</b>	Fatih	<b>Doğum Tarihi</b>	06.11.1988
<b>Uyruğu</b>	Türk	<b>TC Kimlik No</b>	
<b>E-mail</b>	busaydogdu@gmail.com	<b>Tel</b>	

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi	2017
<b>Yüksek Lisans</b>	Fatih Üniversitesi	2013
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi	2010
<b>Lİse</b>	Vefa Lisesi	2006

### İş deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
1.Proje Asistanı	Acıbadem Üniversitesi	2015-
2. Proje Asistanı	İstanbul Medipol Üniversitesi REMER	2013-2015
3. Proje Asistanı	Fatih Üniversitesi	2011-2013
4.Proje Asistanı	İstanbul Üniversitesi	2009-2010

### Yabancı Dil Sınav Notu

<b>KPDS</b>	<b>YDS/ÜDS</b>	<b>IELTS</b>	<b>TOEFL IBT</b>	<b>TOEFL PBT</b>	<b>FCE</b>	<b>CAE</b>	<b>CPE</b>
	80						

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES</b>	79,17033	79,33025	70,87377

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Microsoft Office	Çok iyi
C Programlama	Orta
MATLAB	Orta