



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİDOĞAN ALZHEİMER TRANSGENİK FARE MODELİNDE  
FARKLI BEYİN BÖLGELERİNDE PROTEİN PROFİL  
DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

AİŞE RUMEYSA MAZI

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. MEHMET OZANSOY

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. AHMET TARIK BAYKAL

İSTANBUL-2016

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi

Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )

Anabilim Dalı : Sinirbilim

Tez Sahibi : Aişe Rûmeysa MAZI

Tez Başlığı : Yeni Doğan Alzheimer Transgenik Fare Modelin Farklı Beyin Bölgelerinde Protein Profil Değişiminin İncelenmesi

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi

Sınav Tarihi : 02.09.2016

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

### Danışman

Yrd.Doç.Dr. Mehmet OZANSOY

Doç.Dr.A.Tarık BAYKAL (2.Danışman)

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

Acıbadem Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Yrd.Doç.Dr.M.Yalçın GÜNAL

Yrd.Doç.Dr. Bilal Ersen KERMAN

Yrd.Doç.Dr.Hüseyin ÇİMEN

İstanbul Medipol Üniversitesi

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yeditepe Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .07./09./2016. tarih ve ...2016.../24.... - ..08... 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 yazıma 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.



AİŞE RUMEYSA MAZI

## 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 Sayın Hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, Danışmanım Sayın Hocam Y. Doç. Dr. Mehmet Ozansoy'a ve İkinci Danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a katkıları için, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıkları için,

Çocukluğumdan bu yana bilgi birikimleri, tavsiyeleri, yönlendirmeleri ve varlıklarıyla ufkumu açan; bilim yolunda ilerleme ve büyük hedeflere sahip olma konusunda beni teşvik eden çok değerli hocalarım merhum Prof. Dr. Mahmud Es'ad Coşan ve Muharrem Nureddin Coşan'a,

Bana her aşamada maddi manevi destek olan arkadaşlarım Ayşegül Sümeyye Arzuman, Büşra Gürel ve tüm çalışma ekibimize,

İyi ve kötü günlerimde yanımda olup beni motive eden arkadaşlarım Nur Sümeyye Ülker, Ayşe Reyhan Arslan, Zülal İnce ve Nadire Elif Celayir'e,

REMER bünyesinde çalışan arkadaşlarıma,

Her zaman koşulsuz sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim anneme, babama, kardeşime, teyzeme ve enişteme,

Teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>i</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESİM, ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1.ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2.ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
4.1.Alzheimer Hastalığı .....	5
4.1.1.Tarihçe .....	5
4.1.2.Epidemiyoloji .....	5
4.1.3.Patofizyoloji .....	6
4.1.3.1.Nöropatoloji.....	6
4.1.3.2.Genetik altyapı.....	8
4.1.3.3.Kolinerjik hipotezi.....	9
4.1.3.4.Amiloid hipotezi .....	9
4.1.3.5.Tau hipotezi .....	10
4.1.3.6.Diğer hipotezler .....	10
4.1.4.Alzheimer Hastalığı ilerleyişi.....	11
4.2.Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modeli .....	12
4.3.Proteomiks .....	13
<b>5.MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>14</b>
5.1.Materyaller .....	14
5.1.1.Ekipmanlar .....	14
5.1.2.Kimyasallar.....	16
5.2.Metot.....	19
5.2.1.Deney grubunun oluşturulması ve genotipleme .....	19
5.2.2.Dna eldesi .....	19
5.2.3.Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	19
5.2.4.Agaroz jel elektroforezi .....	20
5.3.Proteomiks Analizi .....	21
5.3.1.Örnek hazırlama .....	21
5.3.1.1.Dokudan protein eldesi.....	21
5.3.1.2.Mikrodiyaliz ile tuzların uzaklaştırılması.....	21

5.3.1.3.FASP (Filter-Aided Sample Preparation) ile proteinden peptid eldesi .....	22
5.3.2.Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi analizi .....	23
5.3.3.Biyoinformatik analiz .....	23
5.4.Hücre Kültürü .....	24
5.4.1.Korteks kültürü .....	24
5.4.2.Hipokampus ve serebellum kültürü .....	25
5.4.3.İmmüno sitokimya .....	25
5.4.4.Mikroskopik görüntüleme ve analiz .....	26
5.5.Western Blot .....	26
5.6.İmmünohistokimyasal Analiz .....	28
5.6.1.Mikroskopik görüntüleme .....	29
<b>6.BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
6.1.Proteomiks Çalışmaları .....	30
6.2.Hücre Kültürü .....	35
6.3.Western Blot .....	37
6.4.İmmünohistokimyasal Analiz .....	38
6.5.Tanımlanan Proteinlerin Bibliyografik Taraması .....	38
<b>7.TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>42</b>
<b>8.KAYNAKLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>9.EKLER .....</b>	<b>54</b>
<b>10.ETİK KURUL ONAYI .....</b>	<b>78</b>
<b>11.ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>80</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Kısaltma	Açılımı
5XFAD	5 mutasyonlu ailesel Alzheimer Hastalığı
ACN	Asetonitril
AH	Alzheimer Hastalığı
AICD	Amiloid Prekürsör Protein intracellular domain
AmBic	Amonyum Bikarbonat
APOE	Alipoprotein E
APOEε4	Alipoprotein E ε4 aleli
APP	Amiloyid Prekürsör Protein
APP <sub>α</sub>	Amiloid Prekürsör Protein alfa
APP <sub>β</sub>	Amiloid Prekürsör Protein beta
APS	Amonyum Persülfat
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksiniükleotid
ECL	Enhanced Chemiluminacence
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FASP	Filtre Yardımı İle Örnek Hazırlama
FBS	Fetal Bovine Serum
GluFib	Glu1-Fibrinopeptid B Standart
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Hidroklorür
IAA	İyodoasetamid
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
KCl	Potasyum Klorür
L-15	Leibovitz's Medium
LC	Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometresi
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NFY	Nörofibriler Yumak
NSAIDs	Non-steroidal inflamatuvar ajanlar
NSF-1	Neural Survival Factor-1
PBS	Fosfat Tampon Saline
PBST	Fosfat Tampon Saline- Tween 20

---

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
PIC	Proteaz İnhibitor Kokteyl
PNBM	Primary Neuron Basal Medium
PSEN1	Presenilin-1
PVDF	Polivinilidenflorit
QC	Nitelik Kontrol
SDS	Sodyum Dodesil Sulfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodecyl Sulfat – Poliakrilamid Jel Elektroforez
SP	Senil Plak
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TEMED	Tetra metil etil diamin
UPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UPX	Universal Protein Ekspresyon Kiti
$\beta$ ME	Beta Merkaptotanol

---



# RESİM, ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ

## Resimler Listesi

<b>Resim 6.1:</b> Genotipleme Sonucu Agaroz Jel Görüntüsü .....	30
<b>Resim 6.2:</b> Korteks, Hipokampus ve Serebellum Primer Hücre Kültürü Görüntüleri (Yeşil;Tubulin, Mavi;Dapı) (Yukarıda) ve Nöron Başına Ortalama Nörit Oranları Grafiği (Solda).....	36
<b>Resim 6.3:</b> 5XFAD ve LM Farelerin Sagital Beyin Kesitlerinde IL-4 Proteininin 10x Objectif ile Tüm Kesit (Üstte) Ve 63x Objectif İle Hipokampus Bölgesi (Altta) Görüntüsü.....	39

## Şekiller Listesi

<b>Şekil 4.1:</b> Sağlıklı Beyin (Solda) ve Alzheimer Hastalığı Taşıyan İnsan Beyni (Sağda) Karşılaştırması .....	6
<b>Şekil 4.2:</b> App'nin A,B Ve $\Gamma$ Sekretazlarla Amiloidojenik ve Amiloidojenik Olmayan Proteoliz İşlemi (A); Sağlıklı Nöronlarda ve Taupati Durumunda Tau Proteini (B).....	8
<b>Şekil 4.3:</b> Alzheimer Hastalığı Evreleri.....	11
<b>Şekil 6.1:</b> Korteks(A), Hipokampus(B) ve Serebellum(C)'Da Tanımlanan Proteinlerin Principal Component Analysis Grafikleri .....	31
<b>Şekil 6.2:</b> Anamlı Ekspresyon Değişimi Gösteren Proteinlerin Beyin Bölgelerine Göre Dağılımı (A) ve Her Bölgede En Büyük Değişim Gösteren 10 Proteinin Venn Şeması (B).....	32
<b>Şekil 6.3:</b> Tüm Bölgelerde Görülen Proteinlerin İpaya Göre Önde Gelen Fonksiyonel Ağı ile İnflamasyon Yolağı Arasındaki İlişki. ....	35
<b>Şekil 6.4:</b> APP, HSP70, mTOR ve Cdk-5 Proteinlerinin Western Blot Görüntüsü ve Analizi .....	37

## Tablolar Listesi

<b>Tablo 5.1:</b> Ekipman Listesi .....	14
<b>Tablo 5.2:</b> Genotiplemede Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	16
<b>Tablo 5.3:</b> Protein Ekspresyon Analizinde Kullanılan Kimyasallar Listesi.....	16
<b>Tablo 5.4:</b> Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	17
<b>Tablo 5.5:</b> Western Blot İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	18

<b>Tablo 5.6:</b> İmmunohistokimya İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi.....	18
<b>Tablo 5.7:</b> PCR Karışımı .....	19
<b>Tablo 5.8:</b> Primer Dizilimi .....	20
<b>Tablo 5.9:</b> PCR Metodu.....	20
<b>Tablo 5.10:</b> Western Blot İçin Kullanılan Antikorlar ve Dilüsyonları.....	28
<b>Tablo 6.1:</b> Ingenuity Pathway Analysis (Ipa) Biyoinformatik Aracı Tarafından Belirlenen, Tanımlanan Proteinlerle İlişkili Yolaklar, Regülatör Proteinler, Moleküler-Hüresel Fonksiyonlar Ve Fonksiyonel Ağlar .....	33
<b>Tablo 6.2:</b> Tüm Bölgelerde Ortak Değişim Gösteren Proteinler.....	34
<b>Tablo 6.3:</b> Bibliyografik Tarama.....	40
<b>Tablo 9.1:</b> Anlamlı Değişim Gösteren Proteinler.....	54



## 1.ÖZET

### YENİDOĞAN ALZHEİMER TRANSGENİK FARE MODELİNDE FARKLI BEYİN BÖLGELERİNDE PROTEİN PROFİL DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Alzheimer Hastalığı (AH), belirgin hafıza kayıplı kortikal demansa sebep olan çeşitli moleküler patolojilerle tanımlanan progresif bir hastalıktır. Hastalığın tanısından onlarca yıl önce oluşmaya başlayan patolojinin dağılımı, klinik semptomlarla oldukça ilişkilidir. Hayvan modelleri kullanılarak, hastalığın farklı dönemlerinde beyin dokusundaki proteom değişimini gözlemlemeye yönelik birçok proteomiks çalışması yapılmıştır. Ancak yeni-doğan transgenik fare modelinde proteom değişimi incelenmemiştir. Bu sebeple, bu çalışmada neonatal 1.günde 5 mutasyonlu ailesel AH transgenik fare modeli (5XFAD) korteks, hipokampus ve serebellumundaki proteom profil değişimi incelendi. Sonuçlar, yeni-doğan 5XFAD protein ekspresyon profilinde; *postmortem* insan AH beyin proteomuna benzer, beyin bölgelerine göre farklılık gösteren, dikkate değer bir değişimi işaret etmektedir. Biyoinformatik analizleri, tespit edilen moleküler değişimin çoğunlukla; nöroinflamasyon, hücre morfolojisi, hücresel oluşum ve organizasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Morfolojik değişimleri inceleme amaçlı yapılan in-vitro çalışmalarda 5XFAD fare nöronlarında dendrit sayısında artışa rastlanmıştır. Veriler göstermektedir ki; AH beyindeki moleküler değişimler doğumda bile var olmakta ve aktifleşen zararlı ve koruyucu mekanizmalar hastalığı beynin hasara daha açık olduğu yaşlılık dönemine kadar susturmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer Hastalığı, Hipokampus, Korteks, Proteomiks, Serebellum

## **2.ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF BRAIN REGION-SPECIFIC PROTEIN PROFILE ALTERATIONS IN NEWBORN TRANSGENIC MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE**

Alzheimer's disease (AD) is a progressive disorder identified by a variety of molecular pathologies causing cortical dementia with a prominent memory deficit. Distribution of pathologies, which begin decades before the diagnosis of the disease, is highly correlated with the clinical symptoms. Several proteomics studies were performed to monitor alterations of the brain tissue proteome at different stages of the disease using animal models. However, proteome changes of newborn transgenic mouse model have not been investigated. To this end, we analyzed proteome profile alterations of 5 mutations familial AD transgenic mouse (5XFAD) cortex, hippocampus and cerebellum at neonatal day-1. Our results indicate a remarkable difference in protein expression profile of newborn 5XFAD brain with region specific variations similar to postmortem human AD brain. Bioinformatics analysis showed the molecular alterations were mostly related to the cell morphology, cellular assembly and organization, and neuroinflammation. Our further studies targeting to examine morphological changes revealed an increase in neurite number of 5XFAD mouse neurons in-vitro. Our data suggest that, molecular alterations in AD brain exist even at birth, and activated detrimental and neuroprotective mechanisms silence the disease until the old ages when the brain is vulnerable.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Proteomics

### 3.GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH) hafıza ve diğer bilişsel fonksiyonların kaybıyla baş gösteren, çeşitli beyin bölgelerini etkileyen, progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. AH, vakaların %60-80'ini oluşturmak suretiyle en yaygın demans türüdür Alzheimer's (1) ve yalnızca 2010 yılında maliyeti dünya genelinde 604 milyar doları bulmuştur. Alzheimer hastalığı patolojisini temel olarak;  $\beta$ -amiloid peptidlerinin kümelenmesiyle oluşan ekstraselüler senil plaklar (SP) ve hiperfosforile MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau) protein içeren intraselüler nörofibriler yumaklar (NFY) oluşturur Braak et al. (2), Weintraub et al. (3). SP oluşumu izokortekste başlayıp hipokampus ve entorinal korteks üzerinden tüm beyne yayılır Thal et al. (4). Buna karşılık NFYlar medial temporal lobun bir parçası olan ve aynı zamanda hastalıktan en ağır etkilenen bölüm olarak bilinen entorinal kortekste ortaya çıkarak tüm beyne yayılır Bobinski et al. (5). Hastalığın ilerleyen dönemlerinde iki patolojinin en yoğun görüldüğü bölge medial temporal lobdur de Leon et al. (6). Yapılan çalışmalarda, nöron ve sinaps kaybı sonucu oluşan, kognitif yetersizlik ve klinik semptomlarla paralel artış gösteren atrofinin de bu bölgede gerçekleştiği tespit edilmiştir Hyman et al. (7).

Hastalığın tanımlanmasının üstünden bir asır geçmesine ve bu süreçte yürütülen yoğun çalışmalara rağmen mekanizması tam olarak çözülememiş ve tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Yukarıda bahsedilen patofizyolojik değişimlerin klinik semptomlardan çok daha önce gözleniyor olması araştırmacıları erken tanı amaçlı biyobelirteçler aramaya yönlendirmiştir. Biyobelirteç keşfetme amaçlı dokudaki proteinleri analiz etmek için kullanılan yöntemlerden biri sıvı kromatografi ve ardışık kütle spektrometrisi ile veritabanı üzerinden protein tanımlamadır. Son yıllarda *postmortem* AH beyin dokusu, beyin omurilik sıvısı, kan numuneleri üzerinden olduğu gibi transgenik AH hayvan modeli numunelerinden de proteomiks yöntemleri kullanan birçok biyobelirteç keşif çalışması yapılmıştır. Transgenik hayvan modeli çalışmalarında erken döneme ışık tutma amaçlı farklı birçok yaşta hayvan kullanılmasına rağmen yeni doğan çalışması yapılmamıştır.

Bu alışma kapsamında yeni doğan (0-24saat) 5 mutasyonlu ailesel Alzheimer hastalığı (5XFAD) transgenik fare modeli ve onların aynı batında doğup mutasyon taşımayan kardeşleri (LM) arası farklı beyin bölgelerindeki (korteks, hipokampus, serebellum) proteom profil değişimleri nano sıvı kromatografi ve ardışık kütle spektrometrisi yöntemi ile incelenecektir. Böylece hastalığın patolojisi ya da semptomları oluşmadan çok önceki dönemde beyinde gerçekleşen moleküler değişimler tespit edilerek, hastalık oluşum mekanizmasına ışık tutmak ve potansiyel biyobelirteç adayları keşfetmek mümkün olacaktır.



## **4.GENEL BİLGİLER**

### **4.1.Alzheimer Hastalığı**

Alzheimer hastalığı (AH) beyinde atrofi ile birlikte hafıza ve bilişsel fonksiyonların kaybolması ile tanımlanan nörodejeneratif hastalıktır Moodley et al. (8). Yaşlı popülasyonda en yaygın rastlanan demans olarak bilinen AH, nöropatolojik olarak ekstraselüler seni plaklar (SP), intraselüler nörofibriler yumaklar (NFY), nöroinflamasyon, nöron ve sinaps kaybıyla karakterizedir.

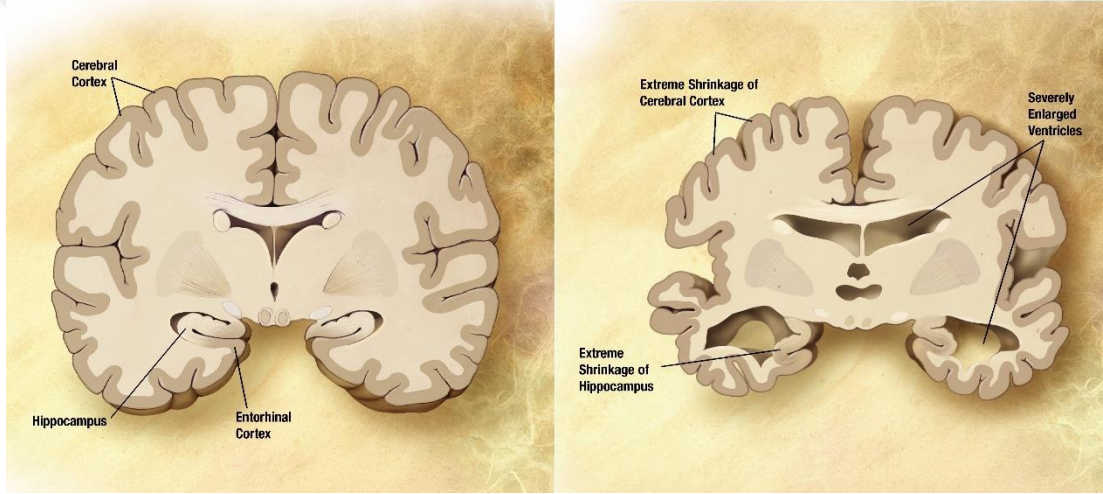
#### **4.1.1.Tarihçe**

AH ilk kez Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. 50 yaşında hastası Auguste D.'nin hastalığını 5 yıl boyunca takip eden Dr.Alzheimer, 1906 yılında hastanın ölümü ardından otopsisinde tespit ettiği senil plaklar ve gümüş boya ile saptadığı nörofibriler yumaklar gibi bulguları, yeni bir hastalığı işaret ettikleri düşüncesiyle yayınladı Alzheimer et al. (9). Bu yayını takip eden 5 yıl içerisinde benzer birçok vaka Alzheimer hastalığı terimi de kullanarak literatüre girdi Berchtold et al. (10). 20.yüzyılın büyük çoğunluğunda AH tanısı demans semptomları görünen 45-65 yaş arası insanlar için kullanıldı. 1977 yılında AH hakkında yapılan bir konferansın ardından AH yaştan bağımsız olarak belirli karakteristik semptomları ve nöropatolojiyi gösteren tüm vakalar için kullanılan bir terim haline geldi Boller et al. (11).

#### **4.1.2.Epidemiyoloji**

Demansın en yaygın formu olan AH, tüm demans vakalarının %65'ini oluşturur. Hastalığın prevalansı yaşa bağımlı değişim gösterir. Global literatürün meta analizi göstermektedir ki; 60-64 yaş arası AH prevalansı %1,3 iken, 90 yaş üstü için bu değer %63,9'dur Prince et al. (12). 65 yaşından sonra hastalık riski her beş yılda iki katına çıkmaktadır Bermejo-Pareja et al. (13), Di Carlo et al. (14). Özellikle 85 yaş sonrasında hastalık sıklığı cinsiyete de bağımlı değişim göstermekte, kadınlar daha

yüksek risk taşımaktadır Di Carlo et al. (14), Andersen et al. (15). Türkiye'ye bakıldığında, 70 yaşından sonra AH prevalansı %11'dir Gurvit et al. (16). AH için birincil risk faktörü yaşlanma olduğundan, ortalama yaşam süresinin uzamasına bağlı olarak hasta sayısında büyük artışlar beklenmektedir Bonda et al. (17). Hastalık genetik kökenli olarak ortaya çıkabilmesinin yanında, sporadik vakalar tüm vakaların %95-99'unu oluşturur. Düşük eğitim düzeyi, Down Sendromu, diyabet Mendez et al. (18), majör depresyon Nihonmatsu-Kikuchi et al. (19), kronik stres Machado et al. (20) ve yanlış beslenme Morris et al. (21) hastalığın diğer risk faktörleri olarak sıralanabilir.



Şekil 4.1: Sağlıklı beyin (solda) ve Alzheimer hastalığı taşıyan insan beyni (sağda) karşılaştırması

([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Alzheimer%27s\\_disease\\_brain\\_comparison.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a5/Alzheimer%27s_disease_brain_comparison.jpg))

### 4.1.3.Patofizyoloji

#### 4.1.3.1.Nöropatoloji

AH serebral kortekste ve belirli korteks altı alanlarda nöron ve sinaps kaybıyla karakterizedir. Bu kayıp temporal lob, pariyetal lob, frontal korteks ve singulat girus gibi bölgeleri de etkileyen atrofiye sebep olur Wenk (22) (Şekil 4.1). Bununla



birlikte kortikal tabakada incelme ve beyaz maddede hacimsel azalma görülür. Buna paralel olarak ventriküllerde genişleme görülür.

Histolojik tanı kriterleri temel bileşeni ekstraselüler amiloid-beta ( $A\beta$ ) olan plaklar ve temel bileşeni hiperfosforile tau proteini olan intraselüler nörofibriler yumaklardır Claeysen et al. (23). Bu histolojik değişimlere azalan sinaptik yoğunluk, artan glial aktivite ve nöron kaybı eşlik eder.

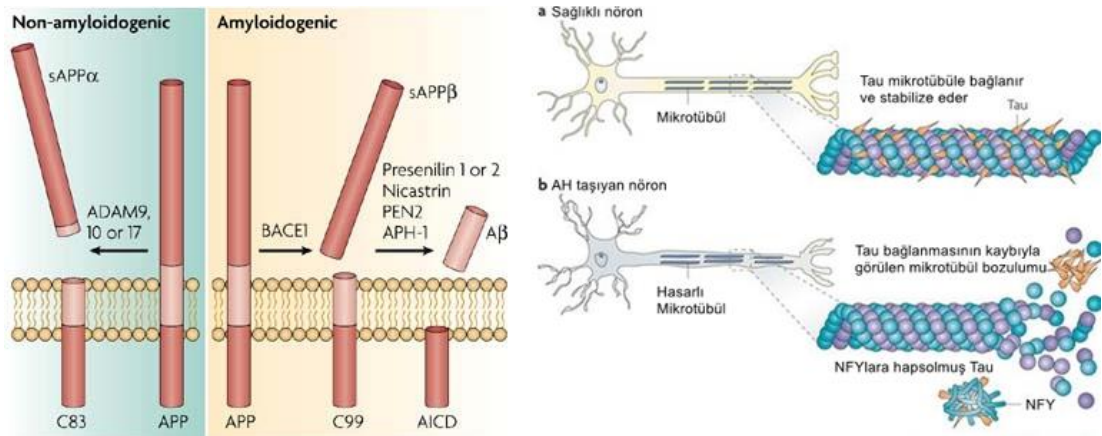
AH beyinde anormal katlanan  $A\beta$  ve tau proteinlerinin birikimiyle oluşan bir protein yanlış katlanma hastalığı (proteopati) olarak tanımlanmıştır Hashimoto et al. (24). Plaklar 39-43 aminoasit uzunluğunda  $A\beta$  peptidlerinden oluşur.  $A\beta$ , amiloid prekürsör proteininin (APP) bir parçasıdır. APP nöron büyümesi, hayatta kalması ve hasar sonrası onarımı açısından önem arz eden bir transmembran proteindir Priller et al. (25), Turner et al. (26). APP'nin proteolitik enzimler  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretazlar tarafından kesilmesi iki şekilde gerçekleşir Hooper (27). Amiloidojenik olmayan proteoliz işlemi,  $\alpha$ -sekretaz enziminin APP'yi transmembran bölgesinden kesmesini takiben  $\gamma$ -sekretaz enziminin intraselüler parçayı kesmesiyle gerçekleşir ve amino ucunda çözülebilir amiloid prekürsör protein alfa ( $APPs\alpha$ ) ve karboksil ucunda C terminal alfa fragmanı ( $\alpha$ -CTF), daha sonra da APP intraselüler domain (AICD) oluşur. Amiloidojenik proteoliz işlemi ise,  $\alpha$ -sekretaz yerine  $\beta$ -sekretaz enziminin proteini amino terminaline 16 aminoasit daha yakın bölgeden kesmesiyle gerçekleşir. Bu durumda çözülebilir amiloid prekürsör protein beta ( $APPs\beta$ ) ve  $\gamma$ -sekretaz enziminin kesimi ardından  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$  ve AICD oluşur (Şekil 4.2-A). Bu işlemle ortaya çıkan  $A\beta$  peptidlerinin %10'u birikime sebep olan  $A\beta_{42}$ 'dir. Bu birikimin sebebi molekülün aşırı hidrofobik yapısıyla çözümlerde bir araya gelme eğilimi göstermesidir. Bu birikimler nöron dışında birleşip senil plak adı verilen yoğun yapıları oluşturur.

AH aynı zamanda tau proteinlerinin anormal birikimiyle oluşan bir taupati olarak değerlendirilir. Her nöron, mikrotübül isimli yapılardan oluşan ve hücre yapısına destek sağlayan hücre iskeletine sahiptir. Mikrotübüller aynı zamanda besin ve moleküllerin hücre gövdesiyle akson uçları arasında iletimine rehberlik eden yapılardır. Tau proteini fosforile halde iken mikrotübülleri stabilize eder. AH'nda tau

proteinleri hiperfosforile hale gelerek mikrotübülden ayrılır ve birleşerek nörofibriler yumakları oluştururlar. Böylece mikrotübül yapısı, hücre iskeleti bütünlüğü ve aksonal iletim sistemi bozulur ve hücre ölüme gider Hernandez et al. (28) (Şekil 4.2-B).

#### 4.1.3.2.Genetik altyapı

AH'nın sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte %1-%5 arası vakalarda genetik farklılıklar saptanmıştır Reitz et al. (29). Yapılan ikiz ve aile çalışmalarına göre hastalığın genetik kalıtımsallığı %49-%79 oranındadır Wilson et al. (30), Gatz et al. (31). Vakaların %0,01'inde otozomal dominant kalıtım görülmekte ve bu vakalarda hastalık 65 yaş öncesinde ortaya çıkmaktadır Blennow et al. (32). Hastalığın bu formu erken başlangıçlı ailesel AH olarak bilinir. Hastalığın bu formunun oluşumu genellikle üç gendeki mutasyonlardan kaynaklanır; APP, presenilin 1 ve presenilin 2 Waring et al. (33). Bu genlerdeki mutasyonların  $A\beta_{42}$  üretimini arttırarak SP oluşumuna yol açar Selkoe (34). Bazı mutasyonlar ise  $A\beta_{42}$  miktarını değiştirmez ancak diğer  $A\beta$  peptidlerine oranını değiştirir Borchelt et al. (35), Shioi et al. (36).



Şekil 4.2: APP'nin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretazlarla amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan proteoliz işlemi (A); sağlıklı nöronlarda ve taupati durumunda tau proteini (B)

LaFerla et al. (37), Brunden et al. (38)

AH vakalarının çoğunda otozomal dominant kalıtım görülmez. Bu vakalar sporadik AH olarak adlandırılır ve çevresel ve genetik farklılıklar risk faktörü olabilir. En bilinen genetik risk faktörü alipoprotein E (APOE)'nin  $\epsilon 4$  alelidir Strittmatter et al. (39), Mahley et al. (40). AH'na sahip insanların %40-%80'inde en az bir APOE $\epsilon 4$  aleli bulunur Mahley et al. (40). APOE $\epsilon 4$  aleli hastalık riskini heterozigotlarda üç kat, homozigotlarda 15 kat artırır Blennow et al. (32). Geç başlangıçlı sporadik AH ile ilişkili 400'e yakın genin görüntülenmesine yönelik çalışmalardan beklenen verim alınamamıştır Blennow et al. (32), Waring et al. (33). Daha yakın zamanda yürütülen çalışmalarda risk oluşturabilecek 19 gen bölgesi bulunmuştur Lambert et al. (41).

#### **4.1.3.3.Kolinerjik hipotezi**

Kolinerjik hipotezi, AH'nın asetilkolin nörotransmitterinin sentezinin azalması sebebiyle oluştuğunu öneren hipotezdir. En eski hipotez olmakla birlikte, günümüzde varolan ilaçların temellendiği hipotezdir Francis et al. (42). Kullanılan ilaçların istenen etkiyi oluşturamaması, hipotezin de desteklenmemesine sebep olmuştur.

#### **4.1.3.4.Amiloid hipotezi**

1991 yılında ortaya atılan bu hipotez, AH'nın ana sebebinin ekstraselüler A $\beta$  birikimleri olduğunu savunur Hardy et al. (43). Bu hipotezi güçlendiren durumlardan bir tanesi APP genini 21. kromozomda bulunması ve trizomi 21 (Down Sendromu) hastalarında 40 yaşlarında AH semptomlarının görülmesidir Nistor et al. (44), Lott et al. (45). A $\beta$  birikimine sebep olan APOE4 proteini ekspres eden genin AH riskini artırıyor olması bir diğer hipotez kuvvetlendirici noktadır. Ayrıca insan APP ekspres eden transgenik farede öğrenme güçlüğüne ek olarak A $\beta$  plakları ve AH benzeri patolojinin görülmesi hipotezi kuvvetlendirmektedir Games et al. (46), Masliah et al. (47), Hsiao et al. (48), Dumont et al. (49).

A $\beta$  plaklarını temizlemek amacıyla üretilen deneysel aşının demans üzerinde kayda değer bir etki sağlayamadığı görülmüştür Holmes et al. (50). Bunun üzerine araştırmacılar hastalık sebebinin plaklar değil de, yüzey reseptörlerine bağlanıp

sinaps yapısını değiştirerek nöronal iletişimi bozan toksik A $\beta$  oligomerleri olduğunu ileri sürmüştür Lacor et al. (51).

#### **4.1.3.5.Tau hipotezi**

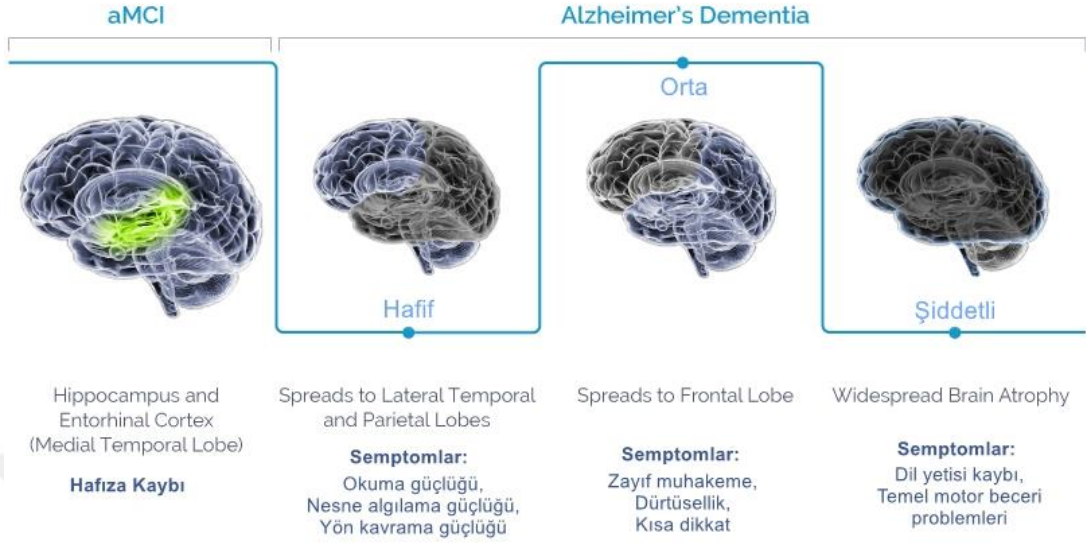
Bu hipotez, tau proteinindeki anormalliklerin hastalığı başlattığını savunur Mudher et al. (52). Hiperfosforile taunun hücre içi NFY'ları oluşturmasıyla mikrotübül yapısı, hücre yapısı ve aksonal iletim bozulur, nöronlar arası iletişim sekteye uğrar ve hücreyi ölüme sürükler Iqbal et al. (53), Chun et al. (54). AH'nda atrofinin NFY'ların dağılımına paralel gelişmesi bu hipotezi güçlendiren bir noktadır.

#### **4.1.3.6.Diğer hipotezler**

A $\beta$ , tau oligomerleri ve oksidatif ajanlar gibi hasar sinyalleri nöroinflamasyon oluşumunu tetiklemektedir. Bu inflamatuvar tepki savunma amaçlı olmakla birlikte daha çok zarara sebep olmakta ve nöron kaybını arttırmaktadır Akiyama et al. (55). Nöroinflamasyon oluşumu glial hücrelerin, özellikle astrosit ve mikrogliaların aktivasyonu ve birikimiyle gerçekleşir. Hasar sinyalleri devamlı olursa ortaya çıkan kronik inflamasyon hasarın artmasına ve hastalığın gelişimine sebep olur. AH'nda belirli sitokinler arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Özellikle SP ve NFY yanlarında inflamatuvar araçılara yüksek oranda rastlanmaktadır Akiyama et al. (55). İnfamasyon hipotezini kuvvetlendiren en önemli kanıt çeşitli çalışmalarda non-steroidal inflamatuvar ajanların (NSAIDs) kullanımında AH riskinin azaldığının gösterilmesidir McGeer et al. (56).

AH'nda, iyonik bakır, demir ve çinko gibi biyometallerin dengesinin bozulduğu bilinmektedir ancak bunun hastalığa sebebiyet mi verdiği yoksa hastalık sonucu mu oluştuğu netlik kazanmamıştır. Bu iyonlar tau, APP ve APOE ile etkileşim halindedirler ve regülasyonlarındaki bir bozukluk oksidatif strese sebep olarak hastalık patolojisine katkı sağlayabilmektedir Xu et al. (57).

#### 4.1.4. Alzheimer Hastalığı ilerleyişi



Şekil 4.3: Alzheimer Hastalığı evreleri

(<http://www.agenebio.com/pipeline/about-amci-and-alzheimers-dementia/>)

Alzheimer patolojisi, pek çok nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi tüm sinir sistemini sarmak yerine belirli fonksiyonel bölgelerde başlayarak zamanla yayılım gösterir. Hastalığın semptomatik süreci genellikle dört evrede incelenir (Şekil 4.3) AH, A $\beta$  seviyesinin artmasıyla birlikte uzun bir prodromal sürece girer Ashe et al. (58). Hastalığın ilk fazında amiloid toksisitesine karşı oldukça hassas olan kolinerjik nöronlar ve noradrenerjik nöronlar etkilenir Tomlinson et al. (59), Whitehouse et al. (60). Hipokampus ve entorhinal kortekste yoğunlaşan patoloji ve atrofi hafıza kaybıyla kendini gösterir. Azalan noradrenerjik sinyal iletimi AH'nın ilerleyen dönemlerinde patolojiye nöroinflamasyonu şiddetlendirerek katkı sağlar Heneka et al. (61).

İlerleyen zamanlarda kortekse yayılan patoloji; okuma, nesne algılama, yön kavrama, muhakeme ve dikkat gibi bilişsel birçok işlevi sekteye uğratar. Hastalığın ilerleyen fazlarında en büyük nöron kaybı yine korteks ve hipokampusta görülerek hipometabolizm ve atrofiye yol açar Mann (62). SP varlığı ve nöron ölümleri immün sistemi aktive ederek nöroinflamasyonu başlatır ki bu da hastalığın ilerleyişini

hızlandırır Hensley (63). Günlük aktivitelerde sıkıntı, agresiflik, şizofreni semptomları gibi bilişsel olmayan bozukluklar ile ilerleyici bir yapı göstermez Reisberg et al. (64).

#### **4.2. Transgenik Alzheimer Hastalığı Fare Modeli**

Alzheimer hastalığında patofizyolojik değişimler klinik semptomlardan onlarca yıl önce oluşmaya başlar. Beyindeki değişimler her zaman kan, BOS, idrar gibi numune alınıp testler uygulanabilecek vücut sıvılarına yansımaz. Bu durum pre-semptomatik dönemin hastalarda saptanmasını zorlaştırır ve insan üzerinde AH oluşumu ve gelişimi üzerine çalışmalar yapılmasını imkân vermez. Postmortem AH beyin dokusundan yapılan çalışmalar da hastalık patogenezi incelenemez. Transgenik hayvan modelleri oluşturmak, bu problemin üstesinden gelmek için önemli bir araçtır.

Son yıllarda, AH ve benzer bilişsel zayıflamanın moleküler ve patolojik mekanizmalarını çalışmak amacıyla birçok transgenik AH fare modeli oluşturulmuştur Duyckaerts et al. (65), Bryan et al. (66). İnsan APP, PSEN1 ve tau genlerinin mutant formlarının ekspresyonunun artırılmasıyla A $\beta$  birikimi, nörofibriler yumak, gliozis ve sinaptik dejenerasyon gibi hastalığın birçok patolojisi fare modelinde tekrarlanmış olur. Ek olarak, bu modellerde hafıza kaybı da olduğu çeşitli bilişsel testlerle ortaya koyulmuştur Ashe (67), Eriksen et al. (68), Gotz et al. (69).

Beş mutasyonlu ailesel AH (5XFAD), hızlı A $\beta$  üretimi ve birikimi görünen erken başlangıçlı bir transgenik AH fare modelidir Oakley et al. (70). Bu transgenik fareler, İsveç (K670N, M671L), Florida (I716V), ve Londra (V717I) mutasyonlu insan APP genlerine ek olarak M146L ve L286V insan PSEN1 mutasyonlarını taşır. Tüm bu genler nörona özel ekspresyon artışı sağlaması amacıyla *Thy1* promotörüne bağlanmıştır. 5XFAD, 2-4 ay içerisinde 5. kortikal tabakada ve hipokampusün subikülüm bölgesinde, öğrenme ve bellek kaybıyla birlikte, intraselüler A $\beta$  birikimleri göstermeye başlar Girard et al. (71). Dört aydan sonra, ağır gliyoz ve

amioyid plakları sebebiyle frontal korteks ilişkili bilişsel kayıp baş gösterir Girard et al. (72). Bu modelde tau patolojisi görülmemekle birlikte; yüksek miktarda toksik A $\beta$ , sinapsların yapısını ve yoğunluğunu değiştirir ve birçok AH fare modelinde görülmeyen progresif nöron ölümü ve atrofi ortaya çıkar Eimer et al. (73), Jawhar et al. (74).

### **4.3.Proteomiks**

Proteomiks proteinlerin, özellikle yapı ve fonksiyonlarının geniş çaplı çalışılmasıdır Anderson et al. (75), Blackstock et al. (76). Proteom, bir organizma ya da sistem tarafından üretilen tüm proteinlere verilen addır Wilkins et al. (77) Proteom, hücre ya da organizmanın içinde bulunduğu şartlara ve zamana bağlı olarak değişim gösterir. Proteomiks genellikle proteinlerin geniş çaplı deneysel analizini ifade etmek için kullanılmakla birlikte protein saflaştırma ve kütle spektrometresini ifade etmek için de kullanılır. Alzheimer hastalığında proteomiks; kan, beyin-omurilik sıvısı, idrar ve beyin dokusunda çalışılarak hastalıkta farklılık gösteren proteinlerin tanımlanması, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin, yerleşimlerinin ve post translasyonel modifikasyonlarının tespiti ve bu sayede hastalık mekanizması ve potansiyel biyobelirteçlerin tespiti ve ilaç geliştirme için kullanılır.

## 5.MATERYAL VE METOT

### 5.1.Materyaller

#### 5.1.1.Ekipmanlar

Tablo 5.1: Ekipman Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	1708280
Concentrator Plus	Ependorf	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 Modulusyonlu Ters Optik Mikroskop	Zeiss	
Konfokal Mikroskop (LSM 780 NLO)	Zeiss	
Kuru-buz Cihazı		
Lam	Thermo Scientific	10143352
Lamel		
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	Ependorf	
Mini-PROTEON Tetra Cell	BioRAD	1658000EDU
nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column	Waters	
nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column	Waters	
Pappen		
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



### 5.1.2. Kimyasallar

Tablo 5.2: Genotiplemede Kullanılan Kimyasallar Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
NaOH	Sigma-Aldrich	221465
EDTA	Sigma-Aldrich	E9884
Tris/HCl	Sigma-Aldrich	T5941
Taq PCR	BioLabs® Inc.	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		
Yükleme Boyası	Thermo Scientific	R0611

\*Tablo 5.2de belirtilen diziler özel olarak sentezlenmiştir.

Tablo 5.3: 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	Ecpedon	44101
Pur-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		

Tablo 5.4: Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar Listesi

<b>Gereç</b>	<b>Markası</b>	<b>Ürün Kodu</b>
PNBM	LONZA	CC-3256
Hibernate®-A Medium	Gibco	A1247501
L-15 Medium (Leibovitz)	Sigma-Aldrich	L5520
NSF-1 Neural Survival Factor	LONZA	CC-4323
B-27 Supplement	Gibco	17504044
Glutamax-I	Gibco	35050-061
Poly-D-lisin	Sigma-Aldrich	P7280
Penisilin Streptomisin	Multicell	450-201-EL
Amforterisin B		
Papain	Sigma-Aldrich	P4762
DNaz	Sigma-Aldrich	D4513
FBS	Sigma-Aldrich	F4135
PBS Tablet	Sigma-Aldrich	P4417
HBSS	Sigma-Aldrich	508264
PFA	Sigma-Aldrich	15127
BSA	Sigma-Aldrich	A9418
Sodyum Azit	Sigma-Aldrich	S8032
Goat Serum	Sigma-Aldrich	G9023
Triton-X	Sigma-Aldrich	
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379
B-Tubulin III	Sigma	T8660
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse	Life Technologies	A-11004
DAPI	Sigma-Aldrich	D9542

Tablo 5.5: Western Blot İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
Amonyum Persulfat	Sigma-Aldrich	A3678
Beta Actin rabbit polyclonal	Santa Cruz	sc-47778
Beta-Amyloid, 17-24 (4G8)	BioLegend	SIG-39220
BME	Sigma-Aldrich	
Cdk-5 (J-3) mouse monoclonal	Santa Cruz	sc-6247
Clarity Western ECL Blotting Substrate	BioRAD	1705060
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2005
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	sc-6721
HSP70 (3A3) mouse monoclonal	Santa Cruz	sc-32239
IL-4 goat polyclonal	Santa Cruz	sc-1260
KCl	Sigma-Aldrich	P9333
Laemmlı Örnek Tampon Çözeltisi	BioRAD	1610737
Metanol	Merck Millipore	106009
mTOR (55.42) mouse monoclonal	Santa Cruz	sc-293089
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
Potasyum Fosfat, Monobazik Moleküler Biyoloji Dereceli	Merck Millipore	529568
SDS	Sigma-Aldrich	L3771
Sodyum Fosfat, Dibazik Moleküler Biyoloji Dereceli	Merck Millipore	567547
TEMED	Sigma-Aldrich	T9281
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions Kiti	BioRAD	1610180
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit	BioRAD	1704272
Tris/HCl	Sigma-Aldrich	T5941
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379
Yağsız Süt Tozu	Fluka	70166

Tablo 5.6: İmmunohistokimya İçin Kullanılan Kimyasallar Listesi

Gereç	Markası	Ürün Kodu
Mounting Medium		
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
KCl	Sigma-Aldrich	P9333
Sodyum Fosfat, Dibazik Moleküler Biyoloji Dereceli	Merck Millipore	567547
Potasyum Fosfat, Monobazik Moleküler Biyoloji Dereceli	Merck Millipore	529568
IL-4 goat polyclonal	Santa Cruz	sc-1260
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 grubunun oluşturulması ve genotipleme

Jackson Laboratuvarlarından alınan, 3 ailesel AH mutasyonu ve 2 insan presenilin mutasyonu ile yüksek miktarda insan APP geni ifade edilen 5 mutasyonlu ailesel AH (5XFAD) fare modeli kullanıldı. Hayvanların bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmalar Merkezi-MEDİTAM'da yapıldı. Tüm hayvan deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi hayvan çalışmaları komitesinin onayıyla gerçekleştirildi. Hemizigot transgenik 5XFAD fareler, B6/SJL F1 üretim fareleriyle çaprazlanarak üretilen yeni-doğanlar (0-24 saat) hipotermi yöntemiyle anestezi altına alındı ve kuyruklarından doku alındı.

### 5.2.2. DNA eldesi

Alınan dokular 75 µL, 25 mM NaOH/EDTA içeren 0,2 mL'lik PCR tüplerine koyuldu. Tüpler PCR cihazında 1 saat 98°C'de bırakıldı. Cihazdan çıkarılan tüplere 75 µL, 40 mM Tris/HCl eklendi ve -4000rpm-g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 100 µL'si doku alınmama dikkat edilerek yeni PCR tüplerine alındı.

### 5.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR solüsyonu aşağıda verilen ölçüler ve sıra ile Taq PCR kiti kullanılarak hazırlandı. Kontrol için bir örneklik Taq polimeraz içermeyen solüsyon hazırlandı.

Tablo 5.7: PCR Karışımı

Gereç	1 örnek için hacim (25 µL)	1 örnek için konsantrasyon
10X Tepkime tampon çözelti	2,4 µL	1X
10 µM Kontrol İleri	1,2 µL	0,5 µM
10 µM Kontrol Geri	1,2 µL	0,5 µM
10 µM APP İleri	1,6 µL	0,6 µM
10 µM APP Geri	1,6 µL	0,6 µM
10 µM PSEN İleri	1,6 µL	0,6 µM
10 µM PSEN Geri	1,6 µL	0,6 µM
10 mM dNTP	0,5 µL	200 µM
Taq polimeraz enzimi	0,125 µL	0,125 U
ddH <sub>2</sub> O	25 µL'te tamamlayacak kadar	

Tablo 5.8: Primer Dizilimi

Primer	Primer Uzunluğu	Dizilimi
Kontrol İ	24	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT
Kontrol G	23	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC AT
APP İ	20	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG
APP G	19	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T
PSEN İ	20	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA
PSEN G	20	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT

Boş PCR tüplerine hazırlanan solüsyondan 21 µL koyuldu. Üzerlerine 4 µL DNA ekstraktı koyuldu ve *Thermocyclera* bırakıldı.

Tablo 5.9: PCR Metodu

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	94°C	3 dk
	94°C	30 sn
35	57,3°C	1dk
	72°C	1 dk
1	72°C	2 dk
1	10°C	∞

#### 5.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Üç gr agaroz tartılarak erlene koyuldu ve 100 µL 1X TAE (40 mM tris, 20 mM glasiyal asetik asit, 1Mm EDTA, pH:7,6) eklenerek mikrodalgada 200°C'de 3 dk ısıtıldı. Karışıma 5 µL Safe View DNA boyası eklenip baloncuk oluşmamasına dikkat ederek karıştırıldı ve tarak yerleştirilmiş jel dökme standına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi, tarak kuyucuklara zarar vermeden çıkarıldı ve 1X TAE ile tank dolduruldu. İlk kuyuya 10 µL DNA standardı, diğer kuyulara en başta kontrol olmak üzere 2 µL yükleme boyasıyla karıştırılan 10 µL PCR ürünü yüklendi. Elektrot uçları doğru şekilde yerleştirildikten sonra PCR ürünü örnekler 80 V'ta 30 dk yürütüldü. Jel, BioRAD ChemiDoc cihazı kullanılarak görüntülendi.

Görüntüleme sonrası çift bant olarak görünen transgenik (5XFAD) farelerden n = 3 olarak deney grubu, tek bant görünen batın kardeşi (LM) farelerden n = 3 olarak kontrol grubu oluşturuldu.

### **5.3.Proteomiks Analizi**

#### **5.3.1.Örnek hazırlama**

Genotipleme sonrası seçilen fareler hipotermi yöntemiyle anestezi altına alındı ve sakrifiye edildi. Beyinler çıkarıldı ve korteks, hipokampus, serebellum bölgelerine ayrıldı. Kuru buz üstünde dondurulan dokular protein LoBind tüplere alındı ve -80°C'de saklandı.

##### **5.3.1.1.Dokudan protein eldesi**

Beyin bölgeleri tartıldı ve 10 mg dokuya 100 µL denk gelecek şekilde, %1 proteaz inhibitör kokteyli (PIC) içeren AmBic eklendi. *Pellet pestle* homojenizatör kullanılarak dokular öğütüldü. Hazırlanan homojenatlara mevcut hacimleri kadar %1 PIC içeren UPX (Universal Protein Extraction Kit) tampon çözeltisi eklendi. Karışım 100°C'de 5 dk kaynatıldı ve 1 saat süreyle +4°C'de bırakıldı. Ardından, 15000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant alınarak yeni *LoBind*® tüplere koyuldu. Protein ekstraktı -80°C'ye kaldırıldı.

##### **5.3.1.2.Mikrodiyaliz ile tuzların uzaklaştırılması**

Mikrodiyaliz tüplerine 200 µL 50 mM AmBic koyuldu ve tüpler manyetik karıştırıcıda 50 mM AmBic dolu behere yerleştirilerek 10 dk membranların dengelenmesi için bırakıldı. Tüplerin içi boşaltılıp 200 µL protein ekstraktı koyuldu. Manyetik karıştırıcıda gece-boyu bırakıldı. Diyaliz sonrası örnekler *LoBind*® tüplere alındı.

### 5.3.1.3.FASP (Filter-Aided Sample Preparation) ile proteinden peptid eldesi

Protein konsantrasyon tayini için Qubit® 2.0 Fluorometer önerilen protokole uygun olarak kullanıldı. 3 standart ve örnekler için, her bir tüpe 199 µL tampon çözelti ve 1 µL protein belirteci karışımı hazırlandı. Üç protein standardı, 190 µL tampon-belirteç solüsyonuna 10 µL'şer olarak; her bir örnek 198 µL solüsyona 2 µL olarak PCR tüplerine koyuldu ve vortekslendi. Karışımlar 15 dk karanlıkta inkübe edilip Qubit cihazı ile ölçüldü.

Peptid eldesi FASP kiti yayınlanan protokole uygun olarak kullanıldı Wisniewski et al. (78). Konsantrasyonu ölçülen her bir örnekten 50 µg alındı ve 230 µL'ye AmBic ile çözülmüş üre ile tamamlandı. Karışımlar kütte bulunan spin filtrelereye koyulup 14000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Ürenin soğukta kristalleşip filtreleri tıkama ihtimaline karşılık santrifüjü soğukta yapmamaya dikkat edildi. 200 µL üre eklenip tekrar 14000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Toz haldeki 10X IAA üre ile çözüldü. Her bir spin filtreye 10 µL IAA, 90 µL üre karışımı eklendi. Kısa bir süre karıştırılıp oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dk inkübe edildi ve 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. 100 µL üre eklenip 14000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Bu aşama iki kez daha tekrarlandı ve filtreden süzülerek tüpte biriken sıvı atıldı. 100 µL, 50 mM AmBic eklenip 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu aşama iki kez daha tekrarlandı. 1mg/75µL tripsin enzimi eklenerek kısa bir süre çalkalandı ve parafilmlelenerek 37°C'de gece-boyu (maksimum 18 saat) inkübe edildi. Filtrelerin altındaki tüpler yeni ve temiz tüplerle değiştirildi. 2 kez 40 µL, 50 mM AmBic eklenip 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. 50 µL, 0,5 M NaCl çözeltisi eklenip 14000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Spin filtreden süzerek tüpte biriken peptid içeren çözelti yeni LoBind tüplere alındı. Çözeltiler konsantratör ile liyofilize hale getirildi, 50 µL %0,1 formik asit içeren AmBic ile çözüldü ve analize kadar -80°C'de saklandı.

Triptik peptidlerde Qubit ile konsantrasyon tayini yapıldı ve her bir örnek 100 ng/µL, 20 µL olarak hazırlandı. Her birinden 2 µL alınarak QC hazırlandı. Tüm örnekler ve QC, LC viallere alınarak cihaza verildi.



### 5.3.2.Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi analizi

Peptid karışımından 2 µL yüksek başarımlı sıvı kromatografisine (Acquity UPLC M-Sınıf, Waters) bağlı, elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma ve dört kutup zaman bazlı ölçüm kaynağı içeren kütle spektrometresi (Synapt G2-Si HDMS, Waters) sistemine [nanoUPLC (*nano ultra performance liquid chromatography*)-ESI (*electrospray ionization*)-QTOF (*quadrupole time of flight*)-MS (*mass spectrometry*)] gönderildi. Dahili kütle kalibrantı glu-fibrinopeptid 300nL/dk akış oranıyla enjekte edildi. Kolonlar, %97 hareketli faz A (%0,1 formik asit içeren LC-MS dereceli su) ile şartlandırıldı ve sıcaklık 55°C'ye ayarlandı. Peptidler *trap* kolondan (Symmetry C18 5 µm, 180 µm i.d. × 20 mm); 120 dk süreyle, 300 nL/dk akış hızında, %5'den %40'a derecelenen hareketli faz B (%0,1 formik asit içeren ekstra saf asetonitril) ile analitik kolon (BEH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm) üzerinde ayrıştırıldı. Her örnek için çift enjeksiyon yapıldı. Veri bağımsız edinim yöntemi (*data independent acquisition mode*; MS<sup>E</sup>), pozitif iyon V modu, MS ve MS/MS fonksiyonları (1,5 saniye aralıklarla 6 V düşük enerji ve 15-40 V yüksek enerji) kullanılarak peptid kütle/elektriksel yük (mass/charge; m/z) değerleri ve ürün iyon bilgisi elde edildi.

### 5.3.3.Biyoinformatik analiz

*Progenesis QI for Proteomics* (Nonlinear Dynamics), işlenmemiş LC-MS verisinden protein tanımlamak için kullanıldı. Fare veri tabanı kullanılarak 400 kDa'dan küçük; *Carbanidomethyl-cystein*, *Acetyl N-term*, *Deamidation N*, *Deamidation Q* ve *Methionine Oxidation* modifikasyonları bulundurabilecek proteinler tanımlandı. 1 peptid tanımlaması için 3 fragman, 1 protein tanımlaması için 7 fragman ve 3 peptid şartı arandı.

*Ingenuity Pathway Analysis* istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinlerin hangi yolak ve moleküler işlevlerde görevli olduğunun tespiti için kullanıldı. Proteinler *Uniprot* kodları, p değerleri ve ekspresyon artış oranları ile sisteme yüklendi. Analiz veri tabanındaki doğrudan ve dolaylı moleküler ilişkileri kapsayacak şekilde; insan, fare ve sıçan canlı türlerinde, sinir sistemi veri kaynağı seçilerek analiz yapıldı.

## 5.4.Hücre Kültürü

Tüm primer kültür deneyleri için 3 günlük 3 5XFAD ve 3 LM farenden oluşan deney grupları başlık 5.1 'de anlatıldığı şekilde oluşturuldu. Cam tabanlı petripler 750 µL %10 poli-D-lisin içeren distile su ile kaplandı. 2saat sonra 3 kez distile su ile yıkayıp kurumaya bırakıldı. Fareler anestezi altında sakrifiye edilip korteks, hipokampus ve serebellum bölgeleri alındı.

### 5.4.1.Korteks kültürü

Kültür vasatı; Hibernate A'ya %1 Glutamax-I, %1 antibiyotik (100U penisilin, 100mg streptomisin, 250ng/mL amfoterisin B), %2 B27 eklenerek hazırlandı. Deney öncesi ve süresince +4°C'de saklandı.

Yaşam vasatı; PNBMe %1 Glutamax-I, %1 antibiyotik (100U penisilin, 100mg streptomisin, 250ng/mL amfoterisin B), %2 NSF-1 eklenerek hazırlandı. Deney öncesi ve süresince etüvde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) saklandı.

Korteks dokusu, içinde 990 µL kültür vasatı bulunan tüplere koyuldu ve 10 µL papain eklenerek forseps yardımıyla hafif darbelerle küçük parçalara ayrıldı. Tüpler 50 Hz'de titreşen özel yapım ajitatörde, +4°C'de 45 dk mekanik ayrıştırılmaya tabi tutuldu. Ardından 3 kez HBSS ile yıkayıp, 1ml kültür vasatında 15 dk sırayla kesik mavi, mavi ve sarı pipet uçları kullanılarak tritürasyon yapıldı. Hücre süspansiyonu 15ml'lik falkona alınıp 3,5 mL daha kültür vasatı eklendi ve 300 g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp hücre peletine 2 mL yaşam vasatı eklendi ve süspansiyon içindeki hücre miktarı hemositometre ile tespit edildi. Her petride 200.000 hücre olacak şekilde süspansiyona yaşam vasatı eklendi. Her petriye 1 mL hücre süspansiyonu eklendi ve petripler hücrelerin tutunması için etüvde 2 saat bekletildi. Tutunmayan hücreleri ve kirliliği uzaklaştırmak için yaşam vasatıyla yıkama yapıldı. 1,5 mL yaşam vasatı eklenip etüvde bırakıldı.

#### **5.4.2.Hipokampus ve serebellum kültürü**

Hipokampus için kültür vasatı; L-15'e %1 Glutamax-I, %1 antibiyotik (100U penisilin, 100mg streptomisin, 250ng/mL amfoterisin B) eklenerek hazırlandı. Deney öncesi ve süresince +4°C'de saklandı.

Serebellum için kültür vasatı; RPMI'a %1 Glutamax-I, %1 antibiyotik (100U penisilin, 100mg streptomisin, 250ng/mL amfoterisin B) eklenerek hazırlandı. Deney öncesi ve süresince +4°C'de saklandı.

Hipokampus ve serebellum için yaşam vasatı; PNBMe %1 Glutamax-I, %1 antibiyotik (100U penisilin, 100mg streptomisin, 250ng/mL amfoterisin B), %2 NSF-1 eklenerek hazırlandı. Deney öncesi ve süresince etüvde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) saklandı.

Hipokampus ve serebellum dokuları, içinde 990 µL kültür vasatı bulunan tüplere koyuldu ve 10 µL papain eklenerek forseps yardımıyla hafif darbelerle küçük parçalara ayrıldı. Tüpler 50 Hz'de titreşen özel yapım ajitatörde, +4°C'de 45 dk mekanik ayrıştırılmaya tabi tutuldu. Kesik mavi ve pastör pipetleriyle tritürasyon yapıldı. 300 g'de 3 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Pelet 3ml kültür vasatı ile santrifüj tüpüne alındı. 300 g'de 3 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Hücre peletine 2 mL yaşam vasatı eklendi ve süspansiyon içindeki hücre miktarı hemositometre ile tespit edildi. Her petride 200.000 hücre olacak şekilde süspansiyona yaşam vasatı eklendi. Her petriye 700 µL hücre süspansiyonu eklendi ve petriyer hücrelerin tutunması için etüvde 2 saat bekletildi. Tutunmayan hücreleri ve kirliliği uzaklaştırmak için yaşam vasatıyla yıkama yapıldı. 1,5 mL yaşam vasatı eklenip etüvde bırakıldı.

#### **5.4.3.İmmunositokimya**

Birincil kültürler hazırlandıktan 48 saat sonra, hücreler PBS (distile suda çözülmüş tablet) ile 2 kez yıkandı. %4 PFA (PBS içerisinde çözülmüş) ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek fiksasyon yapıldı. Ardından 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Bloklama solüsyonu (PBS içerisinde %3 BSA, %0,3 sodyum azit, %1 goat

*serum*, %0,1 *Triton-X*) eklenip oda sıcaklığında 45 dk bekletildi. PBS ile 2 kez yıkama yapıldı ve seyreltme solüsyonunda (PBS içerisinde %3 BSA, %0,3 sodyum azit, %1 *goat serum*, %0,1 *Tween-20*) çözülmüş 1/500 *rabbit anti-Tubulin* birincil antikor eklenerek gece boyu +4°C'de bırakıldı. Petriler PBS ile 2 kez yıkandı ve 1/1000 *goat anti-rabbit* sekonder antikor (Alexa Fluor®594) eklenerek oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. Bu ve sonrasındaki adımlar petrilerin ışık almamasına dikkat edilerek sürdürüldü. Hücreler oda sıcaklığında *shaker* üzerinde %0,02 *Tween-20* (PBS'te çözülmüş) ile 4 kez 3'er dk süreyle yıkandı. *Shaker* üzerindeki petrilere (PBS içinde çözülmüş) 1/1000 DAPI eklendi ve 3 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında 5 dk boyunca %0,02 *Tween-20* ile yıkama yapıldı.

#### **5.4.4.Mikroskopik görüntüleme ve analiz**

Aydınlık alan görüntüleri kültürün 48.saatinde, fiksleme işlemi sonrası alındı. CCD kamera bağlantılı, *Hoffman* modülasyonu bulunan ters-optik Zeiss Axio Observer.A1 mikroskop ile petrinin rastgele seçilmiş 5 bölgesinden 20X görüntü alındı. Görüntülerdeki hücre ve nörit miktarı sayılarak her petri için ortalama alındı. İstatistiksel analiz tek kuyruklu *Student-t* istatistiksel testi ile yapıldı.

İmmünohistokimya sonrası floresan görüntüler Zeiss konfokal mikroskop ile 405 ve 568 nm dalga boylarında görüntülendi.

#### **5.5.Western Blot**

Jel dökme sistemi kuruldu ve işlem *TGX FastCast* akrilamid kitinde önerilen protokole uygun olarak yapıldı. Öncelikle *resolver* ve *stacker* solüsyonları hazırlandı. *Resolver* solüsyonu; eşit miktarlarda *resolver A* ve *resolver B* içerisine %0,5 APS (%10'luk olarak distile suda çözülmüş) ve %0,05 TEMED eklenerek hazırlandı. *Stacker* solüsyonu; eşit miktarlarda *stacker A* ve *stacker B* içerisine %0,5 APS ve %0,1 TEMED eklenerek hazırlandı. 1 mm aralıklı cam plakalarla hazırlanan jel dökme sistemine önce *resolver* solüsyonu, tarakla oluşturulacak kuyucukların 1 cm

altında kalacak miktarda döküldü. Üzeri *stacker* solüsyonu ile tamamen dolduruldu ve tarak yerleştirildi. 30 dk polimerize olmak üzere bırakıldı.

Örneklerin protein konsantrasyonu tespit edildi. Her örnekten 20 µg protein, %5 BME içeren 2X *laemli* örnek tampon çözeltisi ile karıştırıldı ve 95°C'de 5 dk kaynatılarak denatüre edildi. Hazırlanan jel, yürütme tankına yerleştirildi. Tarak çıkarılıp, tankın içi yürütme tampon çözeltisiyle (35 mM SDS, 250 Mm Tris, 1,92 M Glisin; pH:8,3) dolduruldu. İlk kuyucuğa 10 µL moleküler standart, sonraki kuyucuklara sırasıyla denatüre edilmiş protein örnekleri yüklendi. 5 dk 50 V'da, boya jel tabanına gelene kadar da 120 V'da yürütme yapıldı.

Jelden PVDF membrana transfer işlemi Bio-RAD Trans-Blot transfer sistemi ve kiti kullanılarak yapıldı. Transfer cihazına en alta ve en üste transfer tampon çözeltisinde (25 mM Tris, 1,92 M Glisin; pH:8,3) 2-3 dk tutulan kurutma kâğıtları araya %100 metanolden geçirilip transfer solüsyonunda 2-3 dk tutulan membran ile yürütmesi tamamlanan jel koyuldu. Cihaz 2,5 A 25 V'da; moleküler ağırlığı 30 kDa'dan küçük proteinler için 5 dk, 50-150 kDa arasında olanlar için 7 dk, 150 kDa'dan çok olanlar için 10 dk kullanıldı.

Transfer tamamlandıktan sonra membran alınıp PBST (PBS'de çözülmüş %0,1 Tween-20)'den geçirilerek bloklama solüsyonuna koyuldu ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca *shakerda* çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra bloklama solüsyonunda (PBST'de çözülmüş %5 yağsız süt tozu) belirlenen miktarlarda (Tablo 5.x) hazırlanan birincil antikorkar ile +4°C'de gece-boyu (maksimum 16 saat) çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran 3 kez 5'er dk PBST ile yıkandı ve uygulanan primere göre HRP-konjuge goat anti-mouse ya da goat anti-rabbit ikincil antikor (1/2000) koyularak oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. 3 kez 5'er dk PBST ile yıkama yapıldı. ECL kiti ve BioRAD ChemiDoc görüntüleme cihazı kullanılarak önerilen protokole uygun görüntüleme işlemi yapıldı.

Yürütme kontrolü (*Beta Actin*) için *stripping* işlemi yapılarak uygulanan birincil ve ikincil antikorlar temizlendi. *Stripping* işlemi, membranın 55°C'deki etüvde yine 55°C'ye ısıtılan taze hazırlanmış tampon çözelti (%10'luk SDS, 0,5M Tris/HCl, 0,8

mL  $\beta$ ME; pH:6,8) ile 30dk inkübe edilmesiyile yapıldı. Ardından 6 kez 5'er dk PBST yıkaması yapılarak tampon solüsyon uzaklaştırıldı ve bloklamadan itibaren tüm adımlar *Beta Actin* için uygulandı. Görüntülenen bantlar, ImageJ yazılımı kullanılarak ve yürütme kontrol bantlarına göre normalize edilerek tek kuyruklu *Student-t* istatistiksel testi ile analiz edildi.

Tablo 5.10: Western blot için kullanılan antikorlar ve dilüsyonları

Birincil Antikor	Birincil Antikor Dilüsyonu	İkincil Antikor
Beta Amyloid mouse	1/500	
HSP70 mouse monoclonal	1/200	
mTOR mouse monoclonal	1/250	Goat anti-mouse
Cdk-5 mouse monoclonal	1/200	
Beta Actin rabbit monoclonal	1/1000	Goat anti-rabbit

## 5.6. İmmunohistokimyasal Analiz

3 günlük 5XFAD ve LM fare beyinleri çıkarılıp, bölgelere ayrılmadan ve şekli bozulmadan kuru-buz üzerinde donduruldu. Cryostat ile 18 $\mu$ m'lik sagittal kesitler; korteks, hipokampus ve serebellum tek bir kesitte görülebilecek şekilde 40 °C 'ye ısıtılmış lamlar üzerine alındı ve lamlar yine aynı ısı-bloğu üzerine koyularak dokular sabitlendi. Lamlar deneye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Deney başlamadan 30dk önce dokular oda sıcaklığına çıkarıldı ve kurumaları beklendi. Tüm yıkama ve inkübasyon işlemleri *shaker* üzerinde yapıldı. Lamlar lam askısına yerleştirilip distile su dolu şaleden geçirilip %4 PFA dolu şaleyeye koyuldu ve 15dk dokuların fikslenmesi sağlandı. Bir kez daha distile su dolu şaleden geçirilen lamlar farklı bir lam askısına alınarak PBS dolu 3 şalede, her birinde 5dk olacak şekilde bekletildi. Lamlar; lam askısından çıkarıldı, dokulara zarar vermeden kurulandı ve *pappen* ile etrafı yuvarlak bir şekilde çizildi.

Her bir dokuya kit içerisinde bulunan bloklama solüsyonu damlatıldı ve kapalı nemli kutuda 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Lamlar dikkatlice silkelenerek bloklama

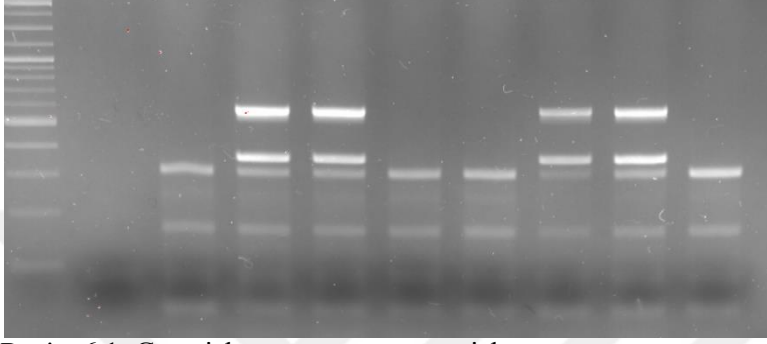
solüsyonu uzaklaştırıldı ve gerekliyse pappen çizgileri yenilendi. 30µL'şer goat polyclonal anti-IL-4 primer antikor (1/30), %1,5 bloklama solüsyonu içeren PBS içerisinde dokulara doyuldu. Her lamda bulunan iki dokudan birine kontrol amaçlı olarak birincil antikor bulundurmayan solüsyon koyuldu. Tüm lamlar kapalı nemli kutuda gece boyu (maksimum 16 sa) 4 °C'de inkübe edildi. Lamlar lam askısına dizilerek PBS dolu şalede 5dk yıkandı. Askıdan çıkarılan lamlar kurulandı ve kitte bulunan ikinci solüsyon eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Lamlar lam askısına dizilerek PBS dolu şalede 5dk yıkandı ve kitte bulunan 3. Solüsyon ile 5 dk inkübe edildi. Son kez PBS dolu şalede 5dk yıkama yapıldı ve lamlar askıdan çıkarılıp 30 µL'şer DAB HRP substratı eklenerek ışık mikroskopunda takip edildi. Boyama tamamlanınca soğuk PBS'ten geçirilen lamlar, mounting medium damlatılarak baloncuk oluşturmamaya dikkat edilerek lamel ile kapatıldı ve gece-boyu oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra konfokal mikroskopta görüntüleme yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

#### **5.6.1.Mikroskobik görüntüleme**

DAB HRP boyama yapılan dokular Zeiss AxioZoom mikroskop ile 10X, 20X, 63X boyutlarda görüntülendi.

## 6.BULGULAR

Tüm deneysel çalışmalar için deney ve kontrol grubu, yeni-doğan farelerin *Jackson Laboratories* tarafından önerilen şekilde genotiplenmesi sonucu oluşturuldu (Resim 6.1).



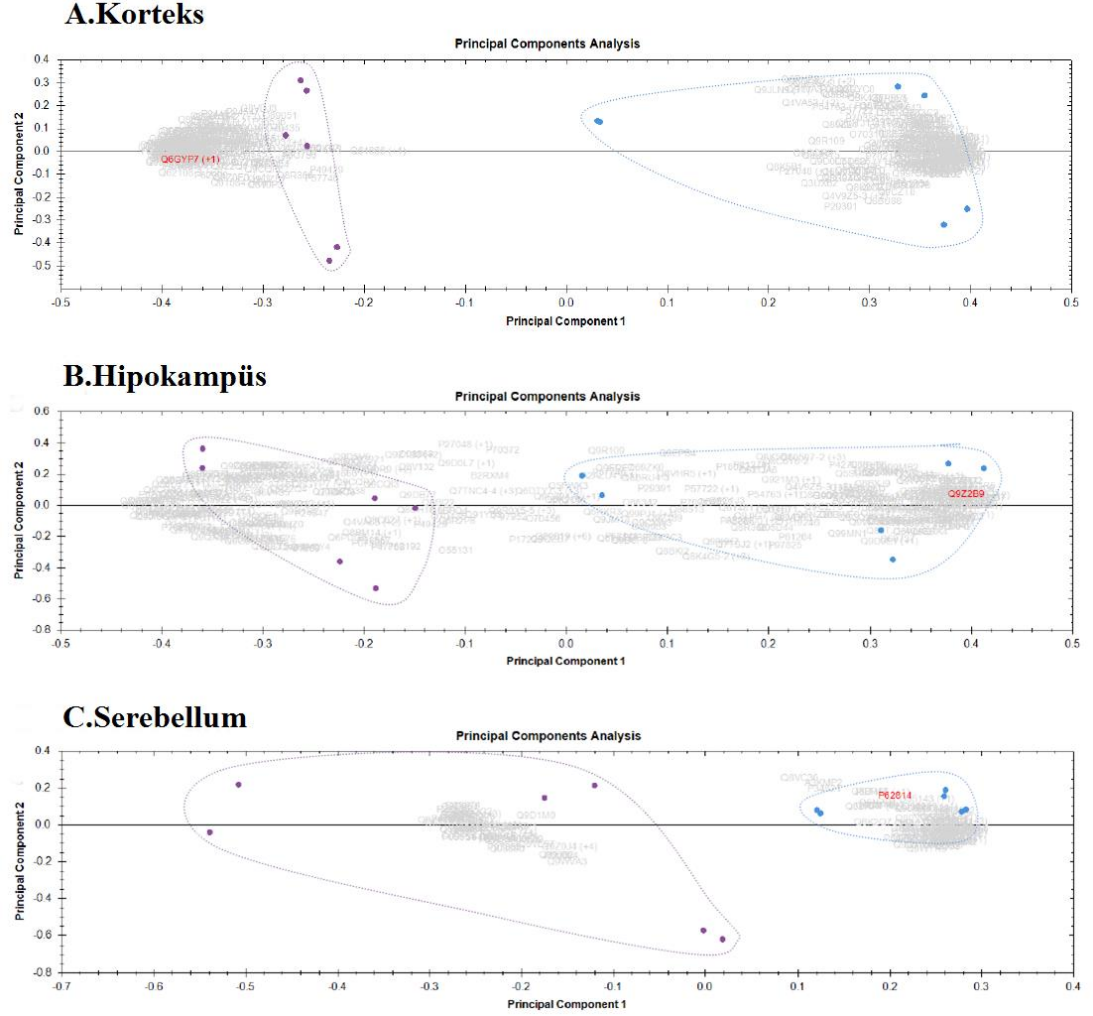
Resim 6.1: Genotiplenme sonucu agaroz jel görüntüsü

### 6.1.Proteomiks Çalışmaları

Yapılan nanoLC-MS/MS çalışmasının Progenesis QI ile analizi sonucu toplam 1598 protein tanımlandı. PCA grafikleri, her beyin bölgesinde deney ve kontrol grubunun proteomlarının birbirinden ayrıldığını gösterdi (Şekil 6.1). Örneklerle birlikte analiz edilen QC'lerin analiz sonuçları değerlendirilerek cihazın hata payı %10 olarak belirlendi. Bu hata payının 5 katı, yani ekspresyon miktarı kontrol ve deney grupları arasında %50 ve daha fazla miktarda değişmiş olan proteinler içinde p değeri 0,05'in altında kalan proteinler anlamlı değişen proteinler olarak belirlendi. Analizi yapılan tüm bölgelerde bu şartları sağlayan protein sayısı 325 olarak belirlendi (Ekler-Tablo 9.1). Bu proteinlerin 243 tanesi kortekste, 132 tanesini hipokampusta ve 80 tanesi serebellumda tanımlandı. 20 protein tüm bölgelerde ortak tanımlandı (Tablo 6.2); 68 protein yalnızca korteks hipokampusta, 17 protein yalnızca korteks ve serebellumda, 5 protein hipokampus ve serebellumda ortak ekspresyon değişimi gösterdi (Şekil 6.2-A). Birden fazla bölgede tanımlanan proteinlerin 2 tanesi – ekspresyonu transgenik fare korteksinde artıp, hipokampusünde azalan Thada ve serebellumunda artıp korteksinde azalan Neil2- dışında geri kalanlarında beyin

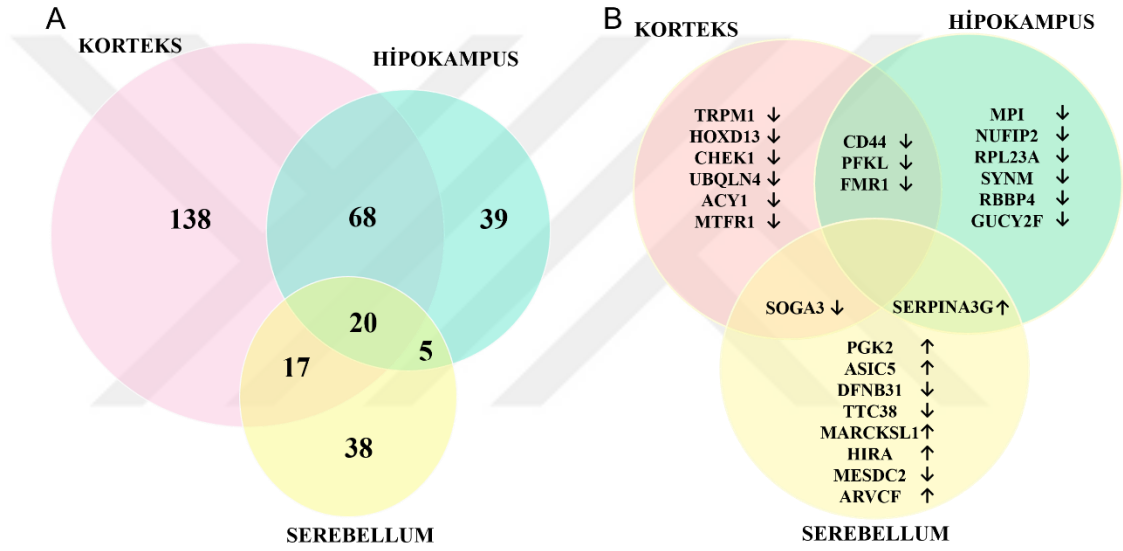


bölgelerinde aynı yönde ekspresyon değişimi gözlemlendi. Her bir bölgede en çok artış gösteren 10 protein karşılaştırıldığında; Cd44, Pfk1 ve Fmr1 proteinlerinin kortekste ve hipokampusta, Serpina3g proteininin korteks ve serebellumda, Soga3 proteininin hipokampus ve serebellumda çakıştığı görüldü (Şekil 6.2-B).



Şekil 6.1: Korteks(A), hipokampus(B) ve serebellum(C)'da tanımlanan proteinlerin Principal Component Analysis grafikleri

Kortekste, hipokampusta, serebellumda ve tüm bölgelerde ortak anlamlı değişim gösteren proteinler IPA ile analiz edildi. Bu analiz sonucunda, tespit edilen proteom değişiminin daha önce literatürde belirtilen hangi yolaklarla, moleküler ve hücresel fonksiyonlarla, fonksiyonel ağlarla ilişkili olduğu ve ekspresyonunun hangi proteinler tarafından düzenlendiği (*upstream regulator*) bulundu (Tablo 6.1). Tüm bölgelerde ortak değişim gösteren proteinlerin IPA tarafından sunulan fonksiyonel ağı ile, bu proteinlerle ilişkili olduğu belirtilen inflamasyon yoluyla birleştirilerek aralarındaki bağlantı gözlemlendi (Şekil 6.3).



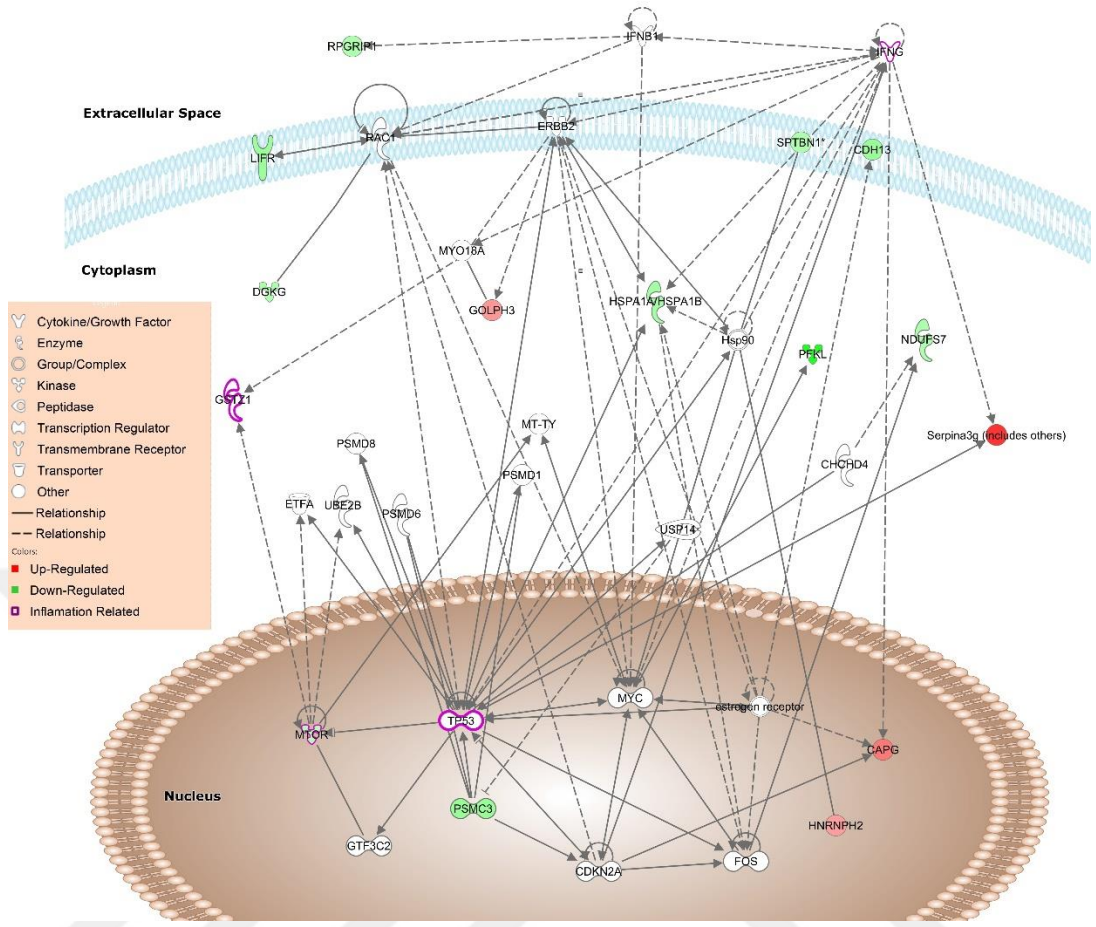
Şekil 6.2: Anlamlı ekspresyon değişimi gösteren proteinlerin beyin bölgelerine göre dağılımı (A) ve her bölgede en büyük değişim gösteren 10 proteinin venn şeması (B)

Tablo 6.1: Ingenuity Pathway Analysis (IPA) biyoinformatik aracı tarafından belirlenen, tanımlanan proteinlerle ilişkili yollar, regülatör proteinler, moleküler-hücresele fonksiyonlar ve fonksiyonel ağlar

	<i>Korteks</i>	<i>Hipokampus</i>	<i>Serebellum</i>	<i>Ortak</i>	
<b>Yollar</b>	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	Huntington's Disease Signaling	2-ketoglutarate Dehydrogenase Complex	CNTF Signaling	
	Ephrin B Signaling	Netrin Signaling	AMPK Signaling	Acyl-CoA Hydrolysis	
	Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)	Molecular Mechanisms of Cancer	Role of BRCA1 in DNA Damage Response	AMPK Signaling	
	Integrin Signaling	Mevalonate Pathway I	Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	Huntington's Disease Signaling	
	Molecular Mechanisms of Cancer	Signaling by Rho Family GTPases	TCA Cycle II (Eukaryotic)	Protein Ubiquitination Pathway	
<b>Regülatörler</b>	MAPT PSEN1 APP FMR1 MKNK1	TP53 SGPL1 miR-142-3p Sos MYC	ERBB2 MKNK1 SUZ12 MAPT PARK2	IL4 estrogen receptor SLC4A5 CHCHD4 SNRPE	
	<b>Moleküler ve Hücresele Fonksiyonlar</b>	Cellular Assembly and Organization	Cellular Assembly and Organization	Cellular Assembly and Organization	Cell Morphology
		Cellular Movement	Cellular Function and Maintenance	Cellular Function and Maintenance	Cellular Assembly and Organization
		Cell-To-Cell Signaling and Interaction	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	Cell Morphology	Cellular Function and Maintenance
		Cell Morphology	Cell Morphology	Cell Cycle	Cellular Development
Cellular Development		Cellular Development	Carbohydrate Metabolism	Cellular Growth and Proliferation	
<b>Ağlar</b>	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Cellular Development	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Carbohydrate Metabolism	Cardiovascular System Development and Function, Hematological System Development and Function, DNA Replication, Recombination, and Repair	Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	
	Hereditary Disorder, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	Cell Cycle, Cellular Movement, Developmental Disorder	Cellular Assembly and Organization, Cell Cycle, Digestive System Development and Function	Cell Morphology, Cellular Compromise, Cancer	
	Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance	Gene Expression, Infectious Diseases, Cancer	Organ Development, Skeletal and Muscular System Development and Function, Nucleic Acid Metabolism		
	Nervous System Development and Function, Tissue Morphology, Cellular Assembly and Organization	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Renal and Urological Disease	Neurological Disease, Cell Morphology, Nervous System Development and Function		
	Cell Death and Survival, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	Cell Cycle, Nervous System Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Function	Cell Cycle, Cell Death and Survival, Organismal Survival		

Tablo 6.2: Tüm bölgelerde ortak değişim gösteren proteinler

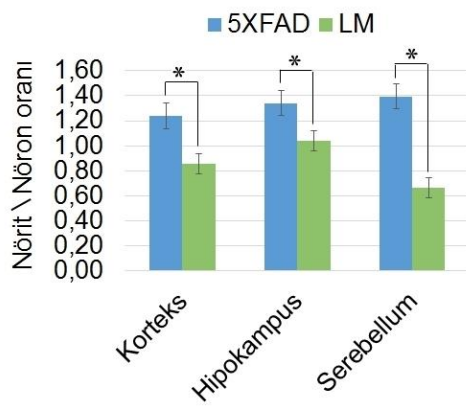
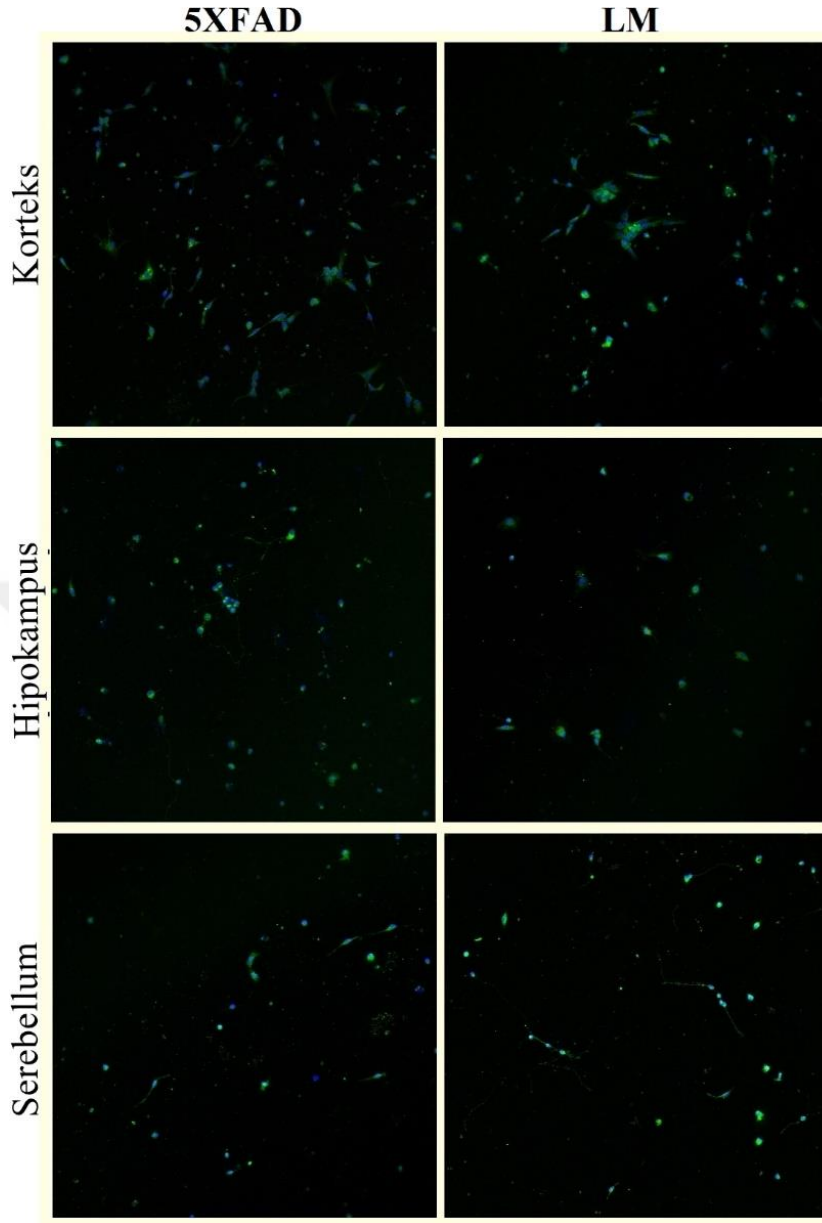
Uniprot	Protein Adı	5XFAD Ks/ LM Ks	P <sub>Ks</sub>	5XFAD Hp/ LM Hp	P <sub>Hp</sub>	5XFAD Sb/ LM Sb	P <sub>Sb</sub>
O88685	26S protease regulatory subunit 6A	0,262	0,000	0,594	0,003	0,455	0,026
P12382	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	0,106	0,000	0,191	0,000	0,477	0,044
P24452	Macrophage-capping protein	1,894	0,021	3,370	0,000	2,302	0,012
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	0,389	0,001	0,341	0,003	0,511	0,018
P70333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	2,350	0,000	2,121	0,001	1,774	0,036
Q5D525	Synaptonemal complex central element protein 1-like	0,656	0,001	0,530	0,001	0,600	0,002
Q5H2H2	Ribosome biogenesis protein TSR3 homolog	0,381	0,000	0,363	0,000	0,443	0,035
Q5I2A0	Serine protease inhibitor A3G	3,872	0,001	3,950	0,002	4,580	0,033
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	0,295	0,000	0,553	0,001	0,659	0,044
Q62261	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,453	0,000	0,464	0,000	0,612	0,040
Q62261-2	Isoform 2 of Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,453	0,000	0,464	0,000	0,612	0,040
Q6NZL0	Protein SOGA3	0,138	0,017	0,355	0,001	0,255	0,027
Q8BU88	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	0,624	0,010	0,402	0,004	0,406	0,032
Q91WG7	Diacylglycerol kinase gamma	0,428	0,000	0,443	0,000	0,619	0,037
Q9CRA5	Golgi phosphoprotein 3	2,363	0,000	1,753	0,003	2,454	0,012
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	0,459	0,018	0,533	0,001	0,515	0,031
Q9EPQ2	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1	0,487	0,000	0,452	0,000	0,553	0,034
Q9JLN9	Serine/threonine-protein kinase mTOR	0,610	0,024	0,409	0,000	0,627	0,008
Q9QYR7	Acyl-coenzyme A thioesterase 3	0,471	0,000	0,451	0,000	0,644	0,046
Q9WTR5	Cadherin-13	0,273	0,000	0,460	0,000	0,604	0,047



Şekil 6.3: Tüm bölgelerde görülen proteinlerin IPaya göre önde gelen fonksiyonel ağı ile inflamasyon yolağı arasındaki ilişki.

## 6.2.Hücre Kültürü

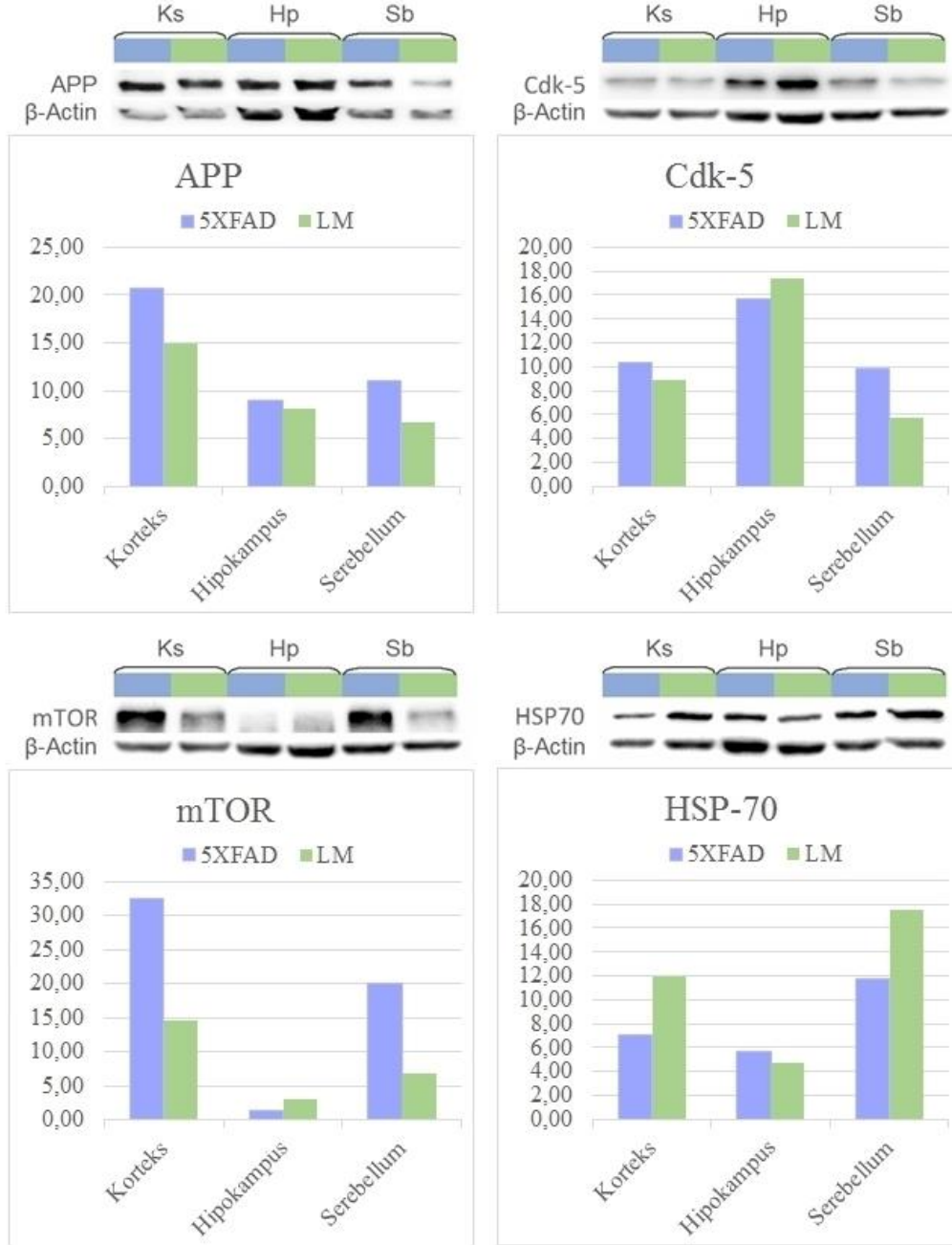
Korteks, hipokampus ve serebellum kültürlerinin 48.saatte alınan aydınlık alan görüntüleri üzerinden yapılan nörit sayımında, üç bölgede de nörit sayısının 5XFAD farelerde LM'lere oranla arttığı tespit edildi (Resim 6.2).



Resim 6.2: Korteks, hipokampus ve serebellum primer hücre kültürü görüntüleri (Yeşil;Tubulin, Mavi;DAPI) (Yukarıda) ve nöron başına ortalama nörit oranları grafiği (Solda) (\*;  $p < 0,05$ )

### 6.3. Western Blot

Western blot yöntemiyle korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerinde, literatürde az miktarda artışının nöronlarda dendrit uzamasını ve dallanmasını arttırdığı belirlenen APP proteininin ekspresyon değişimi de incelendi. 3 bölgede de APP ekspresyonunun arttığı belirlendi (Şekil 6.4).



Şekil 6.4: APP, HSP70, mTOR ve Cdk-5 proteinlerinin western blot görüntüsü ve analizi

IPA analizlerine göre, 3 beyin bölgesinde tanımlanan proteinlere göre değişim beklenen yollarda bulunduğu görülen proteinler; HSP70, mTOR ve Cdk-5 için western blot analizi yapılmıştır (Şekil 6.4). HSP70'in proteomiks verilerine paralel bir şekilde 5XFAD korteks ve serebellumunda azaldığı, hipokampusünde verilerin aksine arttığı tespit edilmiştir. Proteomiks analizlerinde 5XFAD farelerde 3 bölgede de azaldığı gözlenen mTOR'un western blot sonuçları; korteks ve serebellumda artışı ve hipokampuste azalışı görülmüştür. 5XFAD korteks ve hipokampusünde arttığı proteomiks verilerince gösterilen Cdk-5'in ise korteks ve serebellumda artıp hipokampuste azaldığı görülmüştür.

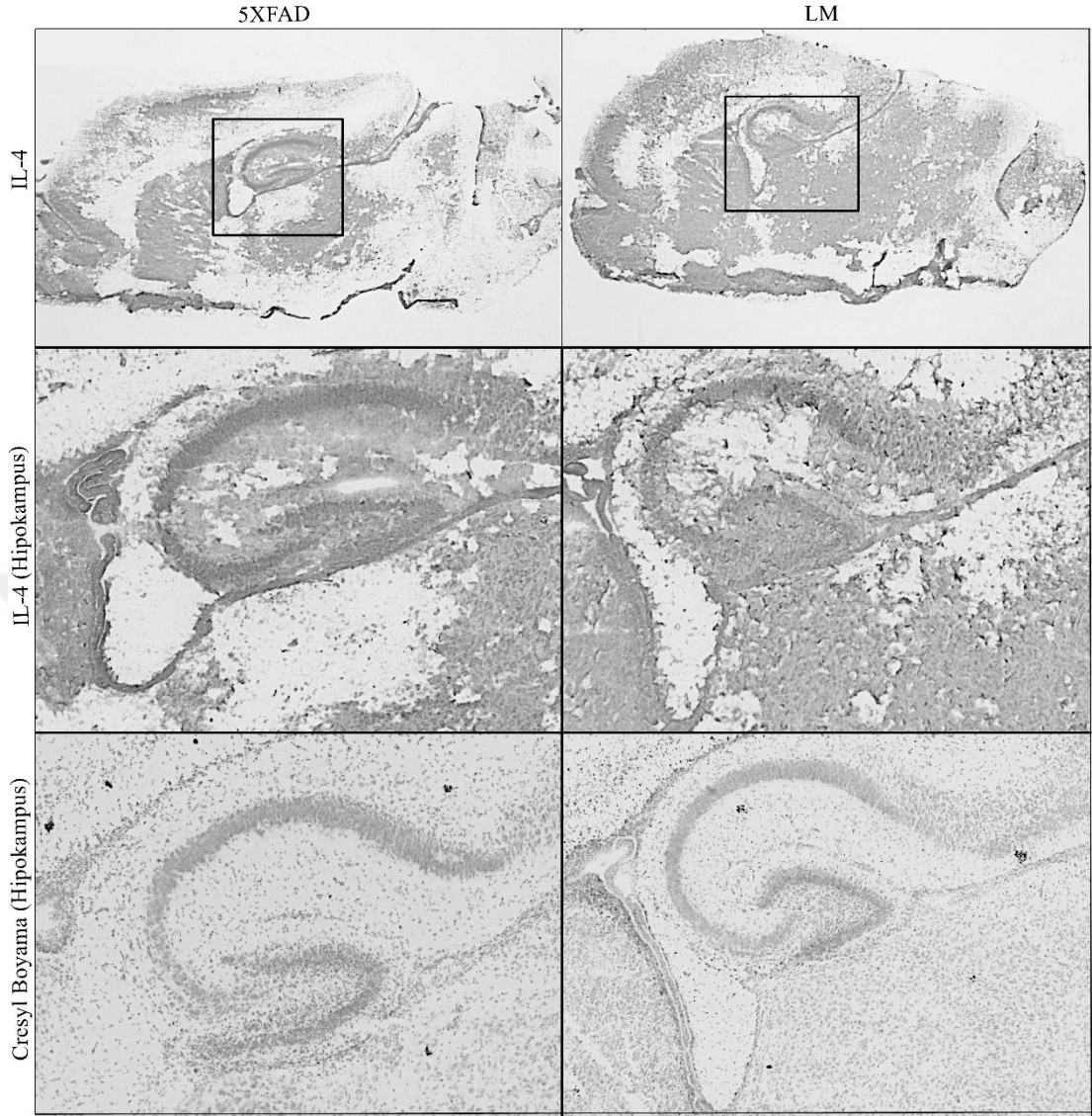
#### **6.4.İmmunohistokimyasal Analiz**

Üç bölgede ortak değişim gösteren proteinlerin regülatörü olduğu belirlenen IL-4 proteininin ekspresyon miktarı sagittal beyin kesitleri üzerinde immunohistokimya yöntemiyle incelendi ve LM farelerin hipokampuslerinin CA1 bölgesinde IL-4 miktarının daha az olduğu tespit edildi (Resim 6.3).

#### **6.5.Tanımlanan Proteinlerin Bibliyografik Taraması**

Proteomiks çalışmasıyla tanımlanan ve istatistiksel olarak anlamlı seçilen proteinler için yapılan bibliyografik taramada *postmortem* AH proteomiks çalışmalarıyla kortekste 22, hipokampuste 3, serebellumda 1 ortak protein tanımlandığı; transgenik fare modellerinin hastalığın ilerleyen evrelerinde alınan beyin dokularıyla yapılan proteomiks çalışmalarla kortekste 10, hipokampuste 3 ortak protein tanımlandığı tespit edildi (Tablo 6.3). Bu proteinlerden 18'inin; hücre morfolojisi, hücresel yapı ve organizasyon, hücresel büyüme ve çoğalma gibi işlevlerle ilişkili olduğu görüldü.





Resim 6.3: 5XFAD ve LM farelerin sagital beyin kesitlerinde IL-4 proteininin 10X objektif ile tüm kesit, 63X objektif ile hipokampus bölgesi ve aynı bölgenin cresyl boyaması yapılmış görüntüsü

Tablo 6.3: Bibliyografik Tarama

Uniprot No	Protein Adı	Yenidoğan 5XFAD	postmort em AH	AH Fare Modeli	Kaynak
<b>Korteks</b>					
A8C756	Thyroid adenoma-associated protein homolog	↑	↓		Andreev et al. (79)
O35280	Serine/threonine-protein kinase Chk1 *	↓		↓	Ly et al. (80)
P03995	Glial fibrillary acidic protein *	↓	↑↓	↑	Hartl et al. (81), Minjarez et al. (82), Musumuri et al. (83), Shin et al. (84), Sizova et al. (85), Tsuji et al. (86)
P06467	Hemoglobin subunit zeta	↓		↑	Martin et al. (87)
P17182	Alpha enolase	↓	↑↓	↑	Musumuri et al. (83), Shin et al. (84), Martin et al. (87), Zahid et al. (88)
P28271	Aconitase	↓		↑	Shin et al. (84)
P29391	Ferritin light chain *	↓	↑		Minjarez et al. (82)
P48962	ADP/ATP translocase 1	↑	↓		Minjarez et al. (82)
P51807	Dynein light chain	↑	↑		Musumuri et al. (83)
P61264	Syntaxin-1B *	↓		↓	Martin et al. (87)
P62141	Serine/threonine-protein phosphatase PP1 - beta catalytic subunit	↓	↓		Andreev et al. (79)
P63044	Vesicle-associated membrane protein 2 *	↓		↓	Martin et al. (87)
Q6PHZ2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	↓		↓	Martin et al. (87)
Q701V5	Synemin *	↓	↑		Minjarez et al. (82)
Q7TQF7	Amphiphysin *	↑		↑	Martin et al. (87)
Q7TSI2	Microtubule-associated protein 6 *	↓		↓	Manavalan et al. (89)
Q80Z24	Neuronal growth regulator 1 *	↓	↓		Andreev et al. (79)
Q8BHZ0	Protein FAM49A	↑	↑		Andreev et al. (79)
Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	↓	↑		Zahid et al. (88)

**Tablo 6.3: Bibliyografik Tarama (devam)**

Uniprot No	Protein Adı	Yenidoğan 5XFAD	postmortem AH	AH Fare Modeli	Kaynak
<b>Korteks (devam)</b>					
Q99JX4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	↓	↑		Andreev et al. (79)
Q99MB2	Mitochondrial fission regulator 1	↓	↓		Andreev et al. (79)
Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	↓	↑		Minjarez et al. (82)
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-related protein 5	↑	↓		Minjarez et al. (82)
Q9JIV2-2	Isoform 2 of Profilin-2	↑	↓		Andreev et al. (79), Musunuri et al. (83)
Q9JKK7	Tropomodulin-2 *	↑	↑		Andreev et al. (79)
Q9QZM0	Ubiqilin-2 *	↓	↓		Minjarez et al. (82)
Q9R1R2	Tripartite motif-containing protein 3 *	↑	↓		Andreev et al. (79)
Q9WUK2	Eukaryotic translation initiation factor 4H	↑	↑		Andreev et al. (79)
Q9WV27	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4	↓		↑	Martin et al. (87)
Q9WV92	Band 4.1-like protein 3	↑	↓		Musunuri et al. (83)
Q9Z0E0	Neurochondrin *	↑	↓		Musunuri et al. (83)
<b>Hipokampus</b>					
P14824	Annexin A6 *	↑	↑	↑	Manavalan et al. (89), Rhein et al. (90)
P62204	Calmodulin	↑	↑		Zahid et al. (88)
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A *	↓	↑		Sultana et al. (91)
Q62261	Spectrin beta chain *	↓		↓	Manavalan et al. (89)
Q80UG5	Septin-9 *	↓		↓	Manavalan et al. (89)
<b>Serebellum</b>					
Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A *	↑	↑		Manavalan et al. (92)

## 7.TARTIŞMA VE SONUÇ

AH, vakaların %95'ini 60'lı yaşlarda ortaya çıkan geç başlangıçlı formun oluşturduğu, yaşa bağlı bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalık semptomları her ne kadar ilerleyen yaşlarda ortaya çıkıyor olsa da, beyindeki değişimlerin onlarca yıl önceden başladığı bilinmektedir. Ayrıca, bu değişimler tüm beyne hükmetmek yerine korteks ve hipokampus gibi belirli bölgelerde görülmeye başlar ve yayılır. Literatürde transgenik fare modellerinde hastalığın erken dönemlerini hedef alan birçok proteomiks çalışması bulunmaktadır Lv et al. (80), Hartl et al. (81), Shin et al. (84), Rhein et al. (90), Chang et al. (93), Chou et al. (94), Sun et al. (95), Walls et al. (96), Yang et al. (97). Bu araştırmada, 5XFAD transgenik fare modelinde doğumu takip eden 24 saat içerisinde, beynin üç bölgesini (korteks, hipokampus ve serebellum) hedef alan bir proteomiks çalışması yapılmıştır. Oldukça şaşırtıcı bir şekilde, protein ekspresyon profilinde, özellikle literatürde bulunan diğer erken dönem çalışmalarına kıyasla, büyük bir değişim gözlenmiştir. Ek olarak, neonatal 5XFAD fare beyin proteomunun, literatürde gösterilen postmortem insan AH proteomuna benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir Andreev et al. (79), Lv et al. (80), Hartl et al. (81), Minjarez et al. (82), Musunuri et al. (83), Shin et al. (84), Sizova et al. (85), Tsuji et al. (86), Martin et al. (87), Zahid et al. (88), Sultana et al. (91), Manavalan et al. (92). Sonuçlar ayrıca, ekspresyon modelinde bölgesel farklılıklar olduğunu da doğrulamıştır. Protein ekspresyon değişimi AH patolojisinin merkezi olarak bilinen korteks ve hipokampusta yoğunlaşmış, AH'ndan çok daha az etkilendiği bilinen serebellumda en az değişim görülmüştür. Üç bölge için gerçekleştirdiğim primer hücre kültürü görüntüleri tüm bölgelerde nörit sayısında artış olduğunu göstermiştir. Western blot çalışması, düşük ve toksik sayılmayacak düzeylerde uygulandığında nörit sayısını ve dallanmasını artırdığı bilinen APP'nin artışına yönelik tahminin doğruluğunu onaylamıştır Salinero et al. (98), Susen et al. (99). Hastalığın bu kadar erken dönemlerinde bu derece ciddi değişimlerin görülmesi akla; AH'nın doğum kadar erken bir dönemde var olup, bazı mekanizmalarla susturulup gizli bir periyoda girerek, beynin hasara daha açık olduğu yaşlılıkta tekrar ortaya çıkıyor olabileceğini getirmiştir. Bu durumda AH'nda infant dönemin yaşlılık döneminin bir modeli sayılabileceği söylenebilir.

Nörodejeneratif hastalıklar, patolojiden etkilenen fonksiyonel beyin bölgesini yansıtan semptomlar gösterir. AHnda ilk semptom, hipokampus ve entorhinal korteks bozukluğunu yansıtır şekilde hafıza kaybıdır. Hastalığın bir sonraki aşamasında, patolojinin korteks boyunca yayılımına paralel şekilde okuma, nesneleri tanıma ve karar verme gibi bilişsel görevleri gerçekleştirmek zorlaşır. Son aşamada, beyne yayılmış atrofi dil becerilerinde, temel motor becerilerde kayba ve karakter değişimlerine sebep olur. Bazı vakalarda hastalığın ilerleyen dönemlerinde, serebellum hasarına bağlı olarak şizofreni oluşumu da tespit edilmiştir. Elde ettiğim verilerde korteks, hipokampus ve serebellumdaki moleküler değişimin farklı yollarla ilişkilendirilse de, bu bölgelerde değişmesi beklenen hücresel ve moleküler fonksiyonlar benzerlik göstermiştir. IPA tarafından her bir bölge için sunulan ilk on hücresel fonksiyon incelendiğinde, dört fonksiyonun tüm bölgelerde ortak olduğu görülmüştür. AHndan birincil olarak etkilenen korteks ve hipokampus aralarındaki doğrudan nöronal etkileşimin de etkisiyle protein ekspresyon modellerine ek olarak fonksiyonel değişimlerinde de daha çok ortaklık taşımaktadır. Öte yandan serebellum, hastalıktan en geç ve en az etkilenen beyin bölgesi, yenidoğan 5XFAD beyninde en az değişim göstermiştir.

5XFAD fare modeli ağır A $\beta$  toksisitesi görülen ve erken başlangıç gösteren bir model olarak bilinir Oakley et al. (70). Beyinde fonksiyonel bozukluğa sebebiyet veren patoloji NFYlardır ve bu fare modelinde NFY oluşumu ve yayılımı görülmez; ancak sinaptik kayıp ve bilişsel zayıflamaya bundan bağımsız olarak rastlanır Eimer et al. (73), Jawhar et al. (74). Ayrıca bazı çalışmalarda AHnda hafıza kayıplarının nörit kaybına değil de nöronal bağlantının değişmesine bağlı olduğu yorumlaması yapılmıştır. Bu çalışmada yapılan IPA analizine göre, korteks ve hipokampusteki moleküler değişim hücreler-arası etkileşimi ve hücre morfolojisini değiştirir niteliktedir. Bu fonksiyonlardaki değişim yaşlı AH beyninde görülecek sinaptik kayıp ve atrofinin oluşması için altyapı oluşturuyor olabilir.

AH senil plak patolojisinin temel toksik elementi A $\beta$  olsa da, birçok in-vitro çalışma, düşük konsantrasyonlardaki kümelenmiş A $\beta$ , A $\beta$ -40-42 dahil A $\beta$  fibrileri, ve solübl APP'nin nörit uzamasını ve dallanmasını arttırdığını göstermiştir Salinero et al. (98),

Susen et al. (99). APP aynı zamanda yetişkin ve gelişim aşamasındaki beyinde akson yönlendirmesini etkileyen, bağımsız çalışan hücre adezyon molekülü olarak tanımlanmıştır Zheng et al. (100). APP'nin nöronal devre gelişimindeki kritik rolüne ek olarak, nöronal hasar sonrası reaktif glialarda ekspresyonu artmaktadır. IPA analizlerinde 5XFAD proteomundaki değişimlerin işaret ettiği hücre morfolojisi, hücre hareket, hücre oluşum ve organizasyon farklılıklarını incelemek için, primer hücre kültürü yapıldı. Deney sonucunda 5XFAD korteks, hipokampus ve serebellum kültürlerinde nörit sayısında artışa rastlandı. Bunun sebebinin fare modelinde görülen ancak toksik düzeylere ulaşamamış miktarda bulunan APP ve A $\beta$  artışı olduğunu düşündüm. Bunu doğrulamak amacıyla yaptığım western blot sonucu üç beyin bölgesinde de APP ekspresyonunun arttığını gösterdi. Bu sonuçlar ışığında, neonatal 1.gün gibi erken bir dönemde bile 5XFAD fare beyinde, hücre yapısında gözlemlenebilir değişikliklere sebep olacak kadar ciddi bir moleküler dönüşüm olduğu söylenebilir.

Nöroinflamasyon AH'nın yayılmasında önemli bir etken olarak görülmektedir. Oluşan hasara ve A $\beta$  toksisitesine savunma amaçlı bir tepki olarak başlayan glial aktivasyon kronikleştiği zaman zararlı bir hal almaktadır. Literatürde IL-4'ün APP/PS1 transgenik fare modelinde mikroglial aktivasyonu indükleyerek çözümler ve çözülmez formlardaki A $\beta$  miktarını azalttığı gösterilmiştir Latta et al. (101). Elde ettiğim verilerde, tüm bölgelerde ortak değişim gösteren proteinlerin ana regülatörü IPA tarafından IL-4 olarak belirlenmiştir. Bu proteinlerin oluşturduğu ana fonksiyonel ağ ile inflamasyon yolağı birleştirildiğinde, iki gruptaki proteinler çakışmasa da aralarında direkt ve dolaylı bağlantılar olduğu görülmüştür. Bu durum, kullandığımız fare modelinde artmasını beklediğimiz A $\beta$  miktarına yönelik savunma mekanizmasının IL-4 önderliğinde aktifleştiğinin göstergesi olabilir. Tanımlanan proteinler listesinde yer almayan IL-4 proteininin ekspresyonunda bir değişim olup olmadığını görmek amaçlı yaptığım immunohistokimyasal analiz sonuçları 5XFAD hipokampusün CA1 bölgesinde IL-4 miktarında artış olduğunu göstermiştir. Ancak elde edilen immunohistokimya sonucu kantitatif olmadığından, farklı deneylerle veriyi desteklemek ve yorumlamak daha doğru olacaktır.

Literatürde kaydedilen AH insan beyin dokuları ve transgenik fare modellerinin geç, semptomatik dönemde alınan beyin dokularından yapılan proteomikss çalışmalarında anlamlı değişim gösterdiği belirtilen proteinlerden 37 tanesi bu çalışmayla ortaktır ve bu ortak proteinlerin 25 tanesi aynı yönde değişim gösterir. Tüm ortak proteinlerden 18 tanesi IPA analizlerine göre hücre morfolojisi, hücresel oluşum ve organizasyon ile ilişkilidir. Literatürde AHnın gelişmekte olduğu pre-semptomatik döneme yönelik yapılan çalışmalarda, yaş ilerledikçe sağlıklı beyin proteomu ile AH beyni proteomu arasındaki fark artmaktadır. Şaşırtıcı olarak, çalışmada elde edilen yeni-doğan AH verisi, pre-semptomatik dönemden çok semptomatik dönem ve *postmortem* çalışmalarına benzerlik göstermektedir. Yeni-doğanda, hastalığın ilerleyen dönemleriyle büyük benzerlik gösteren moleküler ve morfolojik değişimlerin uzunca bir süre patoloji ya da semptoma sebep olmamasının sebebi, gördüğümüz değişimlerin aynı anda hem zarar verici, hem koruyucu mekanizmaları tetiklemesi olarak değerlendirilebilir. Bu mekanizmaların birlikte aktif olması hastalığın susturulduğu bir denge dönemine girmesini sağlıyor olabilir. Bu denge; yaşlanmayla artan DNA hasarı, oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon, protein birikimleri ve proteoliz sistemi bozuklukları yüküyle bozuluyor ve hastalık galip gelir olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sunduğumuz veriler ve önceki çalışmalar gösteriyor ki, AH patogenezini daha iyi anlamak için erken dönem moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak büyük önem taşır. Neonatal dönemin yaşlılık dönemi için uygun bir model oluşturup oluşturmadığı ek çalışmalarla araştırılmalıdır. Ayrıca, yukarıda belirtilen benzerliklerin tanı, ilaç geliştirme ve tedavi gibi klinik uygulamalara uygunluğu incelenmelidir.

## 8.KAYNAKLAR

1. Alzheimer's A. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2014;10(2):e47-92.
2. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.
3. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(4):a006171.
4. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58(12):1791-800.
5. Bobinski M, de Leon MJ, Convit A, De Santi S, Wegiel J, Tarshish CY, et al. MRI of entorhinal cortex in mild Alzheimer's disease. *Lancet.* 1999;353(9146):38-40.
6. de Leon MJ, George AE, Stylopoulos LA, Smith G, Miller DC. Early marker for Alzheimer's disease: the atrophic hippocampus. *Lancet.* 1989;2(8664):672-3.
7. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science.* 1984;225(4667):1168-70.
8. Moodley KK, Chan D. The hippocampus in neurodegenerative disease. *Frontiers of neurology and neuroscience.* 2014;34:95-108.
9. Alzheimer A, Forstl H, Levy R. On certain peculiar diseases of old age. *History of psychiatry.* 1991;2(5 Pt 1):71-101.
10. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging.* 1998;19(3):173-89.
11. Boller F, Forbes MM. History of dementia and dementia in history: an overview. *Journal of the neurological sciences.* 1998;158(2):125-33.
12. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 2013;9(1):63-75 e2.
13. Bermejo-Pareja F, Benito-Leon J, Vega S, Medrano MJ, Roman GC, Neurological Disorders in Central Spain Study G. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *Journal of the neurological sciences.* 2008;264(1-2):63-72.
14. Di Carlo A, Baldereschi M, Amaducci L, Lepore V, Bracco L, Maggi S, et al. Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. *Journal of the American Geriatrics Society.* 2002;50(1):41-8.



15. Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, et al. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology*. 1999;53(9):1992-7.
16. Gurvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, Hanagasi H, Sahin H, et al. The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*. 2008;23(1):67-76.
17. Bonda DJ, Wang X, Lee HG, Smith MA, Perry G, Zhu X. Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-glass. *Neuroscience bulletin*. 2014;30(2):243-52.
18. Mendez MF, Underwood KL, Zander BA, Mastri AR, Sung JH, Frey WH, 2nd. Risk factors in Alzheimer's disease: a clinicopathologic study. *Neurology*. 1992;42(4):770-5.
19. Nihonmatsu-Kikuchi N, Hayashi Y, Yu XJ, Tatebayashi Y. Depression and Alzheimer's disease: novel postmortem brain studies reveal a possible common mechanism. *J Alzheimers Dis*. 2013;37(3):611-21.
20. Machado A, Herrera AJ, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Ayala A, et al. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease. *Reviews in the neurosciences*. 2014;25(6):785-804.
21. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, et al. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2003;60(2):194-200.
22. Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *The Journal of clinical psychiatry*. 2003;64 Suppl 9:7-10.
23. Claeysen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Bockaert J, Giannoni P. Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cellular signalling*. 2012;24(9):1831-40.
24. Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular medicine*. 2003;4(1-2):21-36.
25. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 2006;26(27):7212-21.
26. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in neurobiology*. 2003;70(1):1-32.
27. Hooper NM. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 2):335-8.

28. Hernandez F, Avila J. Tauopathies. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2007;64(17):2219-33.
29. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochemical pharmacology. 2014;88(4):640-51.
30. Wilson RS, Barral S, Lee JH, Leurgans SE, Foroud TM, Sweet RA, et al. Heritability of different forms of memory in the Late Onset Alzheimer's Disease Family Study. J Alzheimers Dis. 2011;23(2):249-55.
31. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. Archives of general psychiatry. 2006;63(2):168-74.
32. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet. 2006;368(9533):387-403.
33. Waring SC, Rosenberg RN. Genome-wide association studies in Alzheimer disease. Archives of neurology. 2008;65(3):329-34.
34. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature. 1999;399(6738 Suppl):A23-31.
35. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron. 1996;17(5):1005-13.
36. Shioi J, Georgakopoulos A, Mehta P, Kouchi Z, Litterst CM, Baki L, et al. FAD mutants unable to increase neurotoxic Abeta 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Abeta. Journal of neurochemistry. 2007;101(3):674-81.
37. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. Nature reviews Neuroscience. 2007;8(7):499-509.
38. Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. Nature reviews Drug discovery. 2009;8(10):783-93.
39. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(5):1977-81.
40. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(15):5644-51.

41. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2013;45(12):1452-8.
42. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1999;66(2):137-47.
43. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*. 1991;12(10):383-8.
44. Nistor M, Don M, Parekh M, Sarsoza F, Goodus M, Lopez GE, et al. Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain. *Neurobiol Aging*. 2007;28(10):1493-506.
45. Lott IT, Head E. Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiol Aging*. 2005;26(3):383-9.
46. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. 1995;373(6514):523-7.
47. Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1996;16(18):5795-811.
48. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996;274(5284):99-102.
49. Dumont M, Strazielle C, Staufenbiel M, Lalonde R. Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain research*. 2004;1024(1-2):113-21.
50. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, et al. Long-term effects of A $\beta$ 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008;372(9634):216-23.
51. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, et al. A $\beta$  oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2007;27(4):796-807.
52. Mudher A, Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in neurosciences*. 2002;25(1):22-6.
53. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1739(2-3):198-210.

54. Chun W, Johnson GV. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:733-56.
55. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.
56. McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging*. 2007;28(5):639-47.
57. Xu H, Finkelstein DI, Adlard PA. Interactions of metals and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:121.
58. Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*. 2010;66(5):631-45.
59. Tomlinson BE, Irving D, Blessed G. Cell loss in the locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer type. *Journal of the neurological sciences*. 1981;49(3):419-28.
60. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of neurology*. 1981;10(2):122-6.
61. Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, et al. Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci*. 2006;26(5):1343-54.
62. Mann DM. Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*. 1996;5(4):423-7.
63. Hensley K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(1):1-14.
64. Reisberg B, Borenstein J, Salob SP, Ferris SH, Franssen E, Georgotas A. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: phenomenology and treatment. *The Journal of clinical psychiatry*. 1987;48 Suppl:9-15.
65. Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 2008;115(1):5-38.
66. Bryan KJ, Lee H, Perry G, Smith MA, Casadesus G. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. *Frontiers in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL)2009.
67. Ashe KH. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem*. 2001;8(6):301-8.

68. Eriksen JL, Janus CG. Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration. *Behav Genet.* 2007;37(1):79-100.
69. Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):532-44.
70. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2006;26(40):10129-40.
71. Girard SD, Jacquet M, Baranger K, Migliorati M, Escoffier G, Bernard A, et al. Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5XFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus.* 2014;24(7):762-72.
72. Girard SD, Baranger K, Gauthier C, Jacquet M, Bernard A, Escoffier G, et al. Evidence for early cognitive impairment related to frontal cortex in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2013;33(3):781-96.
73. Eimer WA, Vassar R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Molecular neurodegeneration.* 2013;8:2.
74. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging.* 2012;33(1):196 e29-40.
75. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis.* 1998;19(11):1853-61.
76. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in biotechnology.* 1999;17(3):121-7.
77. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology.* 1996;14(1):61-5.
78. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods.* 2009;6(5):359-62.
79. Andreev VP, Petyuk VA, Brewer HM, Karpievitch YV, Xie F, Clarke J, et al. Label-free quantitative LC-MS proteomics of Alzheimer's disease and normally aged human brains. *Journal of proteome research.* 2012;11(6):3053-67.
80. Lv J, Ma S, Zhang X, Zheng L, Ma Y, Zhao X, et al. Quantitative proteomics reveals that PEA15 regulates astroglial Abeta phagocytosis in an Alzheimer's disease mouse model. *Journal of proteomics.* 2014;110:45-58.

81. Hartl D, Rohe M, Mao L, Staufenbiel M, Zabel C, Klohe J. Impairment of adolescent hippocampal plasticity in a mouse model for Alzheimer's disease precedes disease phenotype. *PloS one*. 2008;3(7):e2759.
82. Minjarez B, Calderon-Gonzalez KG, Rustarazo ML, Herrera-Aguirre ME, Labra-Barrios ML, Rincon-Limas DE, et al. Identification of proteins that are differentially expressed in brains with Alzheimer's disease using iTRAQ labeling and tandem mass spectrometry. *Journal of proteomics*. 2016;139:103-21.
83. Musunuri S, Kultima K, Richard BC, Ingelsson M, Lannfelt L, Bergquist J, et al. Micellar extraction possesses a new advantage for the analysis of Alzheimer's disease brain proteome. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015;407(4):1041-57.
84. Shin SJ, Lee SE, Boo JH, Kim M, Yoon YD, Kim SI, et al. Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice. *Proteomics*. 2004;4(11):3359-68.
85. Sizova D, Charbaut E, Delalande F, Poirier F, High AA, Parker F, et al. Proteomic analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiology of aging*. 2007;28(3):357-70.
86. Tsuji T, Shiozaki A, Kohno R, Yoshizato K, Shimohama S. Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*. 2002;27(10):1245-53.
87. Martin B, Brenneman R, Becker KG, Gucek M, Cole RN, Maudsley S. iTRAQ analysis of complex proteome alterations in 3xTgAD Alzheimer's mice: understanding the interface between physiology and disease. *PloS one*. 2008;3(7):e2750.
88. Zahid S, Oellerich M, Asif AR, Ahmed N. Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. *Neurochemical research*. 2014;39(1):208-15.
89. Manavalan A, Mishra M, Sze SK, Heese K. Brain-site-specific proteome changes induced by neuronal P60TRP expression. *Neuro-Signals*. 2013;21(3-4):129-49.
90. Rhein V, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, et al. Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(47):20057-62.
91. Sultana R, Boyd-Kimball D, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, et al. Proteomics analysis of the Alzheimer's disease hippocampal proteome. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2007;11(2):153-64.
92. Manavalan A, Mishra M, Feng L, Sze SK, Akatsu H, Heese K. Brain site-specific proteome changes in aging-related dementia. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45:e39.

93. Chang SH, Jung IS, Han GY, Kim NH, Kim HJ, Kim CW. Proteomic profiling of brain cortex tissues in a Tau transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;430(2):670-5.
94. Chou JL, Shenoy DV, Thomas N, Choudhary PK, Laferla FM, Goodman SR, et al. Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of proteomics*. 2011;74(4):466-79.
95. Sun Y, Rong X, Lu W, Peng Y, Li J, Xu S, et al. Translational study of Alzheimer's disease (AD) biomarkers from brain tissues in AbetaPP/PS1 mice and serum of AD patients. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;45(1):269-82.
96. Walls KC, Coskun P, Gallegos-Perez JL, Zadourian N, Freude K, Rasool S, et al. Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of amyloid precursor protein (APP) and beta-amyloid. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(36):30317-27.
97. Yang H, Wittnam JL, Zubarev RA, Bayer TA. Shotgun brain proteomics reveals early molecular signature in presymptomatic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;37(2):297-308.
98. Salinero O, Moreno-Flores MT, Wandosell F. Increasing neurite outgrowth capacity of beta-amyloid precursor protein proteoglycan in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*. 2000;60(1):87-97.
99. Susen K, Blochl A. Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. *Journal of molecular medicine*. 2005;83(9):720-35.
100. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular neurodegeneration*. 2006;1:5.
101. Latta CH, Sudduth TL, Weekman EM, Brothers HM, Abner EL, Popa GJ, et al. Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid-beta using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:41.

## 9.EKLER

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks</i>						
A2ALU4	Protein Shroom2	0,001	3,640	8	1	40,905
A2AM05	Centlein	0,009	1,553	8	1	36,324
A8C756	Thyroid adenoma-associated protein homolog	0,018	1,815	3	1	13,324
B2RXM4	Alpha N-terminal protein methyltransferase 1B	0,016	1,828	2	1	10,334
D3YYU8	Obscurin-like protein 1	0,003	2,092	2	1	9,190
E9QAF0	Spermatogenesis-associated protein 31	0,000	0,025	7	3	39,276
O08863	Baculoviral IAP repeat-containing protein	0,002	1,642	2	1	10,827
O35280	Serine/threonine-protein kinase Chk1	0,000	0,070	3	1	14,332
O35291	Non-secretory ribonuclease	0,008	0,178	1	1	5,629
O35594	Intraflagellar transport protein 81 homolog	0,001	0,026	7	2	39,048
O35643	AP-1 complex subunit beta-1	0,000	1,534	51	14	291,376
O70310	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	0,009	0,221	1	1	4,534
O70435	Proteasome subunit alpha type-3	0,014	1,890	9	3	48,546
O70456	14-3-3 protein sigma	0,016	1,870	14	2	49,385
O88447	Kinesin light chain 1	0,000	0,006	35	9	179,250
O88448	Kinesin light chain 2	0,001	3,099	5	1	23,273
O88513	Geminin	0,000	0,096	2	1	10,423
O88685	26S protease regulatory subunit 6A	0,000	0,005	35	11	187,037
O89019	Inversin	0,003	2,473	5	1	25,018
O89051	Integral membrane protein 2B	0,024	1,531	2	1	11,063



Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenlirlik Puanı
<b>Korteks (devam)</b>						
P03995	Glial fibrillary acidic protein	0,005	0,008	23	10	127,830
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	0,000	1,764	40	16	222,196
P06467	Hemoglobin subunit zeta	0,004	0,018	10	3	56,357
P07309	Transferrin	0,001	1,783	9	3	41,551
P12382	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	0,000	0,048	4	2	20,814
P15379-7	Isoform 2 of CD44 antigen	0,001	11,448	3	1	14,500
P17182	Alpha-enolase	0,000	0,002	84	33	406,623
P17225	Polypyrimidine tract-binding protein 1	0,000	0,008	23	10	121,259
P18052	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	0,023	0,027	5	2	36,801
P18872	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	0,002	0,005	36	3	194,477
P19246	Neurofilament heavy polypeptide	0,003	0,013	14	3	77,470
P21278	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	0,012	0,008	22	2	121,011
P24452	Macrophage-capping protein	0,021	1,894	3	1	14,670
P28028	Serine/threonine-protein kinase B-raf	0,001	0,217	1	1	4,603
P28271	Cytoplasmic aconitate hydratase	0,001	0,004	43	12	265,765
P28667	MARCKS-related protein	0,002	2,011	11	3	70,340
P29391	Ferritin light chain 1	0,028	0,014	14	3	71,948
P30999	Catenin delta-1	0,001	1,539	8	2	45,787
P32233	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	0,002	0,015	11	4	66,846
P35123	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	0,003	0,038	4	1	26,560

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<b>Korteks (devam)</b>						
P35283	Ras-related protein Rab-12	0,000	0,050	3	1	19,995
P35922	Fragile X mental retardation protein 1 homolog	0,009	6,454	10	1	51,609
P36536	GTP-binding protein.SAR1a	0,038	4,147	1	1	6,500
P36993	Protein phosphatase 1B	0,014	0,040	5	1	24,880
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	0,001	0,163	1	1	6,133
P46638	Ras-related protein Rab-11B	0,001	2,632	10	1	63,287
P47758	Signal recognition particle receptor subunit beta	0,001	2,119	2	1	10,840
P48962	ADP/ATP translocase 1	0,000	1,930	45	10	218,320
P49615	Cyclin-dependent-like kinase 5	0,006	2,947	6	1	32,714
P51807	Dynein light chain Tctex-type 1	0,003	1,505	4	3	37,169
P51881	ADP/ATP translocase 2	0,000	1,655	34	6	174,757
P54763	Ephrin type-B receptor 2	0,015	0,029	6	2	34,124
P57722	Poly(rC)-binding protein 3	0,006	0,011	16	2	90,042
P59279	Ras-related protein Rab-2B	0,004	0,017	9	1	59,035
P59999	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	0,000	1,748	18	8	119,468
P60469	Liprin-alpha-3	0,001	0,010	17	4	97,344
P60764	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	0,000	0,017	9	2	60,314
P61211	ADP-ribosylation factor-like protein 1	0,000	0,035	5	3	28,547
P61264	Syntaxin-1B	0,001	0,023	8	1	42,837
P61750	ADP-ribosylation factor 4	0,001	1,603	26	11	116,914

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<b>Korteks (devam)</b>						
P62141	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	0,000	0,008	23	4	123,578
P62192	26S protease regulatory subunit 4	0,004	1,799	11	2	46,073
P62751	60S ribosomal protein L23a	0,001	0,039	6	1	25,764
P62754	40S ribosomal protein S6	0,000	0,019	9	4	53,389
P62900	60S ribosomal protein L31	0,000	1,780	5	1	25,491
P63044	Vesicle-associated membrane protein 2	0,000	0,022	7	3	45,765
P63082	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	0,003	1,755	2	1	13,747
P68037	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L3	0,001	1,651	6	3	37,555
P68181	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	0,001	0,008	23	1	128,326
P70217	Homeobox protein Hox-D13	0,003	0,091	2	1	11,019
P70257	Nuclear factor 1 X-type	0,001	1,875	8	2	44,515
P70333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	0,000	2,350	23	2	146,498
P70372	ELAV-like protein 1	0,037	1,717	14	5	75,339
P84078	ADP-ribosylation factor 1	0,000	1,620	25	2	114,792
P97371	Proteasome activator complex subunit 1	0,001	2,065	7	1	40,008
P97825	Hematological and neurological expressed 1 protein	0,000	0,015	11	5	68,478
Q02248	Catenin beta-1	0,000	0,006	28	14	154,734
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	0,016	0,032	6	3	31,351
Q05D44	Eukaryotic translation initiation factor 5B	0,000	0,027	6	1	37,542
Q14B71	Cell division cycle-associated protein 2	0,004	0,019	8	3	52,711

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devam)</i>						
Q2TV84	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1	0,000	0,057	4	1	17,430
Q32Q92	Acyl-coenzyme A thioesterase 6	0,000	0,013	15	5	75,016
Q3UX62	Coiled-coil domain-containing protein 114	0,040	0,052	4	1	19,360
Q3UYC0	Protein phosphatase 1H	0,005	0,208	1	1	4,814
Q3V132	ADP/ATP translocase 4	0,000	1,838	14	4	65,857
Q5D525	Synaptonemal complex central element protein 1-like	0,001	0,061	3	2	16,374
Q5HZH2	Ribosome biogenesis protein TSR3 homolog	0,000	0,058	2	1	17,254
Q5I2A0	Serine protease inhibitor A3G	0,001	3,872	2	1	10,173
Q5QNV8	Protein HEATR9	0,000	0,014	11	1	70,523
Q5RKR3	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein 2	0,005	1,544	7	2	33,083
Q5SDA5	Retinal guanylyl cyclase 2	0,009	0,101	2	1	9,946
Q5SRX1	TOM1-like protein 2	0,002	1,593	5	2	25,009
Q60597-2	Isoform 2 of 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	0,000	0,036	5	3	27,403
Q60737	Casein kinase II subunit alpha	0,004	0,011	16	7	94,604
Q60972	Histone-binding protein RBBP4	0,000	0,031	9	1	32,142
Q61411	GTPase HRas	0,001	0,093	1	1	10,808
Q61474	RNA-binding protein Musashi homolog 1	0,007	0,037	4	3	27,222
Q61545	RNA-binding protein EWS	0,002	1,637	9	2	55,122
Q61576	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	0,017	1,808	1	1	4,804
Q61584	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	0,002	1,623	6	2	28,853

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özğün Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devam)</i>						
Q61666	Protein HIRA	0,041	1,592	3	1	15,977
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	0,000	0,003	57	9	326,645
Q62108-3	Isoform 3 of Disks large homolog 4	0,000	2,817	1	1	4,766
Q62159	Rho-related GTP-binding protein RhoC	0,001	0,043	3	2	23,476
Q62261	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,000	0,001	193	14	1122,345
Q62261-2	Isoform 2 of Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,000	0,001	161	1	943,862
Q62393-2	Isoform 2 of Tumor protein D52	0,000	0,202	1	1	4,948
Q64373	Bcl-2-like protein 1	0,003	1,552	5	2	25,120
Q64514	Tripeptidyl-peptidase 2	0,000	2,486	8	1	41,235
Q64521	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	0,003	0,066	3	1	15,076
Q69ZK0	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	0,000	0,099	2	1	10,094
Q6DTY7-3	Isoform 3 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	0,006	0,174	1	1	5,735
Q6GYP7	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1	0,000	1,634	4	2	17,432
Q6NZB1	Protein arginine N-methyltransferase 6	0,014	0,098	2	1	10,183
Q6NZL0	Protein SOGA3	0,017	0,041	5	1	24,408
Q6P9L4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 49	0,000	0,116	2	1	8,585
Q6PD31	Trafficking kinesin-binding protein 1	0,001	1,668	3	2	13,711
Q6PHZ2-2	Isoform 2 of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	0,009	0,008	23	5	123,124
Q6PHZ8	Kv channel-interacting protein 4	0,029	0,090	2	1	11,170
Q6R2P8	Endonuclease 8-like 2	0,004	0,115	2	1	8,681

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<b>Korteks (Devam)</b>						
Q6SIQ7	CMRF35-like molecule 1	0,001	1,507	1	1	5,019
Q6ZQA6	Immunoglobulin superfamily member 3	0,049	0,050	4	1	19,808
Q70IV5	Synemin	0,001	0,033	5	2	30,354
Q7TNC4-4	Isoform 4 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	0,010	1,964	2	1	10,571
Q7TQF7	Amphiphysin	0,002	1,715	7	3	42,275
Q7TSJ2	Microtubule-associated protein 6	0,006	0,004	51	24	271,671
Q80TS8	Protein sel-1 homolog 3	0,001	1,800	4	2	19,984
Q80UY2	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	0,000	2,170	3	1	15,728
Q80VA0	N-acetylgalactosaminyltransferase 7	0,000	0,063	3	1	15,759
Q80XN0	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	0,000	0,011	14	4	88,137
Q80Z24	Neuronal growth regulator 1	0,036	0,043	4	1	23,294
Q8BGB7	Enolase-phosphatase E1	0,002	1,742	2	2	11,373
Q8BHC4	Dephospho-CoA kinase domain-containing protein	0,000	1,959	3	2	17,883
Q8BHZ0	Protein FAM49A	0,000	1,807	26	9	163,693
Q8BI22	Centrosomal protein of 128 kDa	0,000	1,725	4	1	25,650
Q8BKX6	Serine/threonine-protein kinase SMG1	0,000	0,022	8	2	44,924
Q8BM14	Lipase member K	0,030	3,427	2	1	9,221
Q8BRU4-3	Isoform 3 of C-type lectin domain family 9 member A	0,002	0,107	2	1	9,381
Q8BU88	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	0,010	0,182	1	1	5,503
Q8BXJ9	Transmembrane protein 62	0,000	0,044	3	3	22,533

Tablo 9.1.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devamı)</i>						
Q8BZ98	Dynamin-3	0,002	0,006	33	8	176,609
Q8C0C4	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 1	0,001	3,477	2	1	10,083
Q8C6Y6-2	Isoform 2 of Ankyrin repeat and SOCS box protein 14	0,004	1,910	2	2	4,619
Q8C854	Myelin expression factor 2	0,000	1,852	37	18	206,996
Q8C9A2-1	Isoform 2 of Endonuclease V	0,000	3,841	3	1	17,295
Q8CA72	Gigaxonin	0,000	1,588	1	1	4,508
Q8CA95	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase 10A	0,006	2,287	5	1	31,065
Q8CCK0	Core histone macro-H2A.2	0,000	1,649	32	8	163,686
Q8CDK2-5	Isoform 5 of Cytosolic carboxypeptidase 2	0,011	0,072	3	1	13,944
Q8CFI0-2	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	0,021	2,032	5	1	27,461
Q8CHI8	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	0,017	1,515	5	2	27,862
Q8K4G5-2	Isoform 2 of Actin-binding LIM protein 1	0,007	3,566	4	1	18,942
Q8K4Z3	NAD(P)H-hydrate epimerase	0,003	0,050	3	1	19,941
Q8K4Z5	Splicing factor 3A subunit 1	0,026	1,646	2	1	11,106
Q8K5B1	Interleukin-31 receptor subunit alpha	0,034	0,201	1	1	4,978
Q8QZY9	Splicing factor 3B subunit 4	0,005	1,780	5	2	27,495
Q8R001	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	0,004	0,031	6	2	32,156
Q8R0Y6	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0,001	0,003	50	23	294,927
Q8R317	Ubiquitin-1	0,001	0,008	21	7	118,194
Q8R550	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	0,022	0,051	4	2	19,590

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özğün Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devam)</i>						
Q8VDD5	Myosin-9	0,009	0,006	30	8	165,919
Q8VDM6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	0,004	3,045	4	1	19,310
Q8VE33	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	0,000	1,684	15	5	104,337
Q8VEG6	CCR4-NOT transcription complex subunit 6-like	0,030	1,942	1	1	5,043
Q8VHR5	Transcriptional repressor p66-beta	0,001	0,023	8	4	43,403
Q8WTY4	Anamorsin	0,002	0,026	7	1	38,424
Q91V92	ATP-citrate synthase	0,000	0,003	57	24	296,454
Q91VA3	Calpain-8	0,007	0,044	2	1	22,853
Q91VK1	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	0,004	1,784	14	1	70,469
Q91VR2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0,000	0,007	21	11	141,269
Q91WG7	Diacylglycerol kinase gamma	0,000	0,041	5	3	24,290
Q920E5	Farnesyl pyrophosphate synthase	0,000	1,534	27	11	175,007
Q922Q4	Pyrraline-5-carboxylate reductase 2	0,003	1,893	1	1	5,477
Q924M7	Mannose-6-phosphate isomerase	0,000	0,210	1	1	4,752
Q925J9-4	Isoform 4 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	0,000	0,045	3	2	22,128
Q99JF5	Diphosphomevalonate decarboxylase	0,009	1,962	3	2	14,814
Q99JW2	Aminoacylase-1	0,000	0,026	8	3	39,099
Q99JX4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	0,001	0,008	20	8	121,854
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0,000	3,056	5	1	24,216
Q99KK7	Dipeptidyl peptidase 3	0,000	0,006	25	8	167,364



Tablo 9.1.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devam)</i>						
Q99KU0	Vacuole membrane protein 1	0,004	2,300	1	1	4,481
Q99LG2	Transportin-2	0,002	1,755	5	2	22,936
Q99MB2	Mitochondrial fission regulator 1	0,000	0,095	2	1	10,475
Q99MD9	Nuclear autoantigenic sperm protein	0,000	0,005	38	15	201,097
Q99MN1	Lysine--tRNA ligase	0,000	0,010	18	7	103,528
Q99NB8	Ubiquitin-4	0,000	0,014	12	3	70,493
Q99PJ1	Protocadherin-15	0,022	0,040	6	1	25,028
Q99PM9	Uridine-cytidine kinase 2	0,001	0,169	1	1	5,918
Q9CFQ3	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	0,000	1,684	2	1	11,219
Q9CQE1	Protein NipSnap homolog 3B	0,002	1,620	1	1	5,535
Q9CQF9	Prenylcysteine oxidase	0,000	0,021	9	1	47,832
Q9CQI3	Glia maturation factor beta	0,004	1,747	3	1	16,310
Q9CQR2	40S ribosomal protein S21	0,020	0,035	5	2	28,625
Q9CQV6	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	0,000	0,048	2	1	20,860
Q9CRA5	Golgi phosphoprotein 3	0,000	2,363	1	1	5,128
Q9CXW3	Calcyclin-binding protein	0,004	0,017	10	6	59,486
Q9CZT8	Ras-related protein Rab-3B	0,006	0,017	9	2	59,382
Q9D0E1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,000	0,002	76	34	492,044
Q9D0L7	Armadillo repeat-containing protein 10	0,046	0,039	4	1	25,876
Q9D3R3	Centrosomal protein of 72 kDa	0,000	0,103	2	1	9,693

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devam)</i>						
Q9D4C6	LRP2-binding protein	0,001	2,921	1	1	4,275
Q9D6P8	Calmodulin-like protein 3	0,000	0,009	21	3	113,730
Q9D892	Inosine triphosphate pyrophosphatase	0,002	3,812	1	1	5,734
Q9DAR7	m7GpppX diphosphatase	0,000	0,097	2	1	10,316
Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0,000	1,512	44	25	234,089
Q9DBE8	Alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2	0,000	1,653	18	6	93,514
Q9DBY5	Chromobox protein homolog 6	0,009	0,186	1	1	5,388
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone]iron-sulfur protein 7, mitochondrial	0,018	0,195	1	1	5,131
Q9EPB4	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	0,000	0,094	2	1	10,626
Q9EPQ2	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1	0,000	0,036	5	2	27,745
Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	0,000	0,061	3	2	16,445
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-related protein 5	0,001	1,579	71	27	340,239
Q9EQQ9	Protein O-GlcNAcase	0,000	1,541	34	15	177,593
Q9ERE7	LDLR chaperone MIESD	0,001	0,111	2	1	8,976
Q9EST5	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	0,001	2,391	5	1	35,884
Q9ESW4	Acylglycerol kinase, mitochondrial	0,001	0,040	5	1	25,208
Q9JHD1	Histone acetyltransferase KAT2B	0,001	1,899	5	1	23,265
Q9JIV2-2	Isoform 2 of Profilin-2	0,000	2,328	10	3	49,312
Q9JKB3	Y-box-binding protein 3	0,000	0,007	22	6	138,214
Q9JKK7	Tropomodulin-2	0,001	1,664	27	10	179,975

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Korteks (devamı)</i>						
Q9JKW0	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	0,000	1,642	1	1	7,519
Q9JLN9	Serine/threonine-protein kinase mTOR	0,024	0,006	36	9	174,116
Q9JMI4	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	0,013	0,031	6	2	32,593
Q9JMH9-5	Isoform 5 of Unconventional myosin-XVIIIa	0,000	1,842	7	2	25,784
Q9QXY6	EH domain-containing protein 3	0,001	1,556	9	2	46,532
Q9QYB8	Beta-adducin	0,000	0,008	26	7	131,718
Q9QYR7	Acyl-coenzyme A thioesterase 3	0,000	0,012	15	7	80,310
Q9QZB7	Actin-related protein 10	0,024	1,629	3	1	15,811
Q9QZM0	Ubiquilin-2	0,000	0,007	24	8	134,683
Q9R0N0	Galactokinase	0,001	0,062	3	1	16,046
Q9R0P5	Dextrin	0,000	1,530	17	5	90,523
Q9R0X5-5	Isoform 5 of X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	0,006	0,024	7	2	41,870
Q9R109	Ornithine decarboxylase antizyme 3	0,027	0,196	1	1	5,092
Q9R1R2	Tripartite motif-containing protein 3	0,001	1,526	2	2	9,936
Q9WTR5	Cadherin-13	0,000	0,009	20	11	113,690
Q9WUK2	Eukaryotic translation initiation factor 4H	0,002	1,600	13	3	88,809
Q9WV27	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4	0,000	0,004	57	11	281,151
Q9WV92-2	Isoform 2 of Band 4.1-like protein 3	0,001	2,419	6	1	23,985
Q9Z0E0	Neurochondrin	0,003	1,603	5	2	27,002
Q9Z1B3	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	0,005	1,573	3	2	13,566

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgin Peptid	Güvenirlilik Puanı
<b>Korteks (devam)</b>						
Q9Z2Y8	Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	0,002	2,171	4	1	20,824
<b>Hipokampus</b>						
A8C756	Thyroid adenoma-associated protein homolog	0,044	0,625	3	1	13,324
E9QAF0	Spermatogenesis-associated protein 31	0,001	0,625	7	3	39,276
O35291	Non-secretory ribonuclease	0,002	0,436	1	1	5,629
O35887	Calumenin	0,010	1,678	5	3	37,744
O54928	Suppressor of cytokine signaling 5	0,000	0,416	1	1	4,807
O70161	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	0,034	2,982	6	1	37,052
O70194	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	0,038	1,589	2	1	17,225
O70589	Peripheral plasma membrane protein CASK	0,000	1,887	13	4	71,449
O88448	Kinesin light chain 2	0,000	2,468	5	1	23,273
O88685	26S protease regulatory subunit 6A	0,003	0,594	35	11	187,037
O89023	Tripeptidyl-peptidase 1	0,001	0,547	2	1	10,076
P02772	Alpha-fetoprotein	0,000	0,666	45	18	233,409
P06467	Hemoglobin subunit zeta	0,011	0,636	10	3	56,357
P12382	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	0,000	0,191	4	2	20,814
P14824	Annexin A6	0,000	1,640	14	3	78,743
P15379-7	Isoform 2 of CD44 antigen	0,043	7,568	3	1	14,500
P24452	Macrophage-capping protein	0,000	3,370	3	1	14,670
P28271	Cytoplasmic asonitate hydratase	0,000	0,585	43	12	265,765

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Hipokampus (devam)</i>						
P34821	Bone morphogenetic protein 8A	0,009	0,559	1	1	4,993
P35123	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	0,013	0,649	4	1	26,560
P35294	Ras-related protein Rab-19	0,034	2,048	2	1	10,134
P35922	Fragile X mental retardation protein 1 homolog	0,022	7,992	10	1	51,609
P36536	GTP-binding protein SAR1a	0,000	3,003	1	1	6,500
P37040	NADPH--cytochrome P450 reductase	0,001	1,574	19	6	101,685
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	0,003	0,341	1	1	6,133
P49615	Cyclin-dependent-like kinase 5	0,001	3,133	6	1	32,714
P59279	Ras-related protein Rab-2B	0,002	0,526	9	1	59,035
P60764	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	0,002	0,616	9	2	60,314
P61211	ADP-ribosylation factor-like protein 1	0,002	0,519	5	3	28,547
P62204	Calmodulin	0,026	1,585	56	23	196,371
P62751	60S ribosomal protein L23a	0,000	0,202	6	1	25,764
P63082	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	0,006	1,884	2	1	13,747
P68181	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	0,001	0,521	23	1	128,326
P70257	Nuclear factor 1 X-type	0,000	2,175	8	2	44,515
P70324	T-box transcription factor TBX3	0,020	0,471	1	1	5,446
P70333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	0,001	2,121	23	2	146,498
P97371	Proteasome activator complex subunit 1	0,023	1,805	7	1	40,008
P98203	Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome homolog	0,002	1,591	3	2	15,046

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenlirlik Puanı
<i>Hipokampus (devam)</i>						
Q07813	Apoptosis regulator BAX	0,044	1,625	21	6	115,846
Q32Q92	Acyl-coenzyme A thioesterase 6	0,003	0,489	15	5	75,016
Q3UX10	Tubulin alpha chain-like 3	0,012	1,740	31	6	168,324
Q3UYC0	Protein phosphatase 1H	0,006	0,443	1	1	4,814
Q4V9Z5-3	Isoform 3 of Seizure 6-like protein 2	0,007	0,558	1	1	5,505
Q5D525	Synaptonemal complex central element protein 1-like	0,001	0,530	3	2	16,374
Q5F2E7	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	0,041	0,177	1	1	4,929
Q5HZH2	Ribosome biogenesis protein TSR3 homolog	0,000	0,363	2	1	17,254
Q5I2A0	Serine protease inhibitor A3G	0,002	3,950	2	1	10,173
Q5QNV8	Protein HEATR9	0,000	0,373	11	1	70,523
Q5SDA5	Retinal guanylyl cyclase 2	0,012	0,267	2	1	9,946
Q60875	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	0,006	2,320	9	4	50,466
Q60972	Histone-binding protein RBBP4	0,000	0,266	9	1	32,142
Q61576	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	0,002	2,397	1	1	4,804
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	0,001	0,553	57	9	326,645
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	0,004	2,477	7	2	34,605
Q62261	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,000	0,464	193	14	1122,345
Q62261-2	Isoform 2 of Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,000	0,464	161	1	943,862
Q62393-2	Isoform 2 of Tumor protein D52	0,037	0,643	1	1	4,948
Q63810-2	Isoform 2 of Calcineurin subunit B type 1	0,000	0,363	9	2	43,192

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenlirlik Puanı
<i>Hipokampus (devam)</i>						
Q64373	Bcl-2-like protein 1	0,003	1,655	5	2	25,120
Q64514	Tripeptidyl-peptidase 2	0,000	2,317	8	1	41,235
Q61R34	G-protein-signaling modulator 1	0,000	1,533	8	2	40,620
Q6KAU4	Multivesicular body subunit 12B	0,035	0,332	1	1	5,058
Q6KAU8	Autophagy-related protein 16-2	0,001	0,540	6	1	35,531
Q6NVD0	FRAS1-related extracellular matrix protein 2	0,003	0,635	30	11	156,256
Q6NZL0	Protein SOGA3	0,001	0,355	5	1	24,408
Q6P926	Spermatogenesis-associated protein 24	0,013	1,749	3	2	15,128
Q6P9L4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 49	0,000	0,308	2	1	8,585
Q6PD31	Trafficking kinesin-binding protein 1	0,001	2,174	3	2	13,711
Q6PHN9	Ras-related protein Rab-35	0,000	0,653	11	1	61,794
Q6PHZ8	Kv channel-interacting protein 4	0,018	0,656	2	1	11,170
Q6V4S5	Protein sidekick-2	0,015	2,833	3	3	12,740
Q701V5	Synemin	0,001	0,255	5	2	30,354
Q791V5	Mitochondrial carrier homolog 2	0,020	0,485	4	1	20,036
Q80UG5	Septin-9	0,007	0,508	14	1	74,193
Q80UQ2	Ras association domain-containing protein 6	0,011	1,560	2	1	10,315
Q80UY2	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	0,005	1,912	3	1	15,728
Q80VC9	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	0,007	2,393	2	1	9,462
Q80VQ1-3	Isoform 3 of Leucine-rich repeat-containing protein 1	0,004	0,424	2	1	10,045

Tablo 9.1 : Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Hipokampus (devam)</i>						
Q80Z24	Neuronal growth regulator 1	0,010	0,423	4	1	23,294
Q8BGB7	Enolase-phosphatase E1	0,009	1,610	2	2	11,373
Q8BGT6	MICAL-like protein 1	0,032	0,381	4	1	14,631
Q8BGT8	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like	0,038	1,742	5	2	19,354
Q8BHC4	Dephospho-CoA kinase domain-containing protein	0,003	1,501	3	2	17,883
Q8BHZ0	Protein FAM49A	0,017	1,676	26	9	163,693
Q8BKX6	Serine/threonine-protein kinase SMG1	0,000	0,427	8	2	44,924
Q8BNU0	Armadillo repeat-containing protein 6	0,002	0,275	5	2	24,838
Q8BU88	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	0,004	0,402	1	1	5,503
Q8BZ98	Dynamamin-3	0,000	0,646	33	8	176,609
Q8C0C4	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 1	0,002	2,133	2	1	10,083
Q8C854	Myelin expression factor 2	0,000	1,724	37	18	206,996
Q8C9A2-1	Isoform 2 of Endonuclease V	0,002	2,088	3	1	17,295
Q8CDK2-5	Isoform 5 of Cytosolic carboxypeptidase 2	0,014	0,458	3	1	13,944
Q8CEL2	Cilia- and flagella-associated protein 61	0,030	0,274	4	1	17,753
Q8CFI0-2	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	0,012	2,468	5	1	27,461
Q8K4Z3	NAD(P)H-hydrate epimerase	0,002	0,486	3	1	19,941
Q8QZY9	Splicing factor 3B subunit 4	0,001	1,655	5	2	27,495
Q8R317	Ubiquitin-1	0,000	0,502	21	7	118,194
Q8VDM6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	0,001	2,773	4	1	19,310



Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenlilik Puanı
<i>Hipokampus (devam)</i>						
Q8VII8	Mineralocorticoid receptor	0,000	0,370	2	1	11,122
Q91V92	ATP-citrate synthase	0,007	0,661	57	24	296,454
Q91VA3	Calpain-8	0,027	0,536	2	1	22,853
Q91WG7	Diacylglycerol kinase gamma	0,000	0,433	5	3	24,290
Q924M7	Mannose-6-phosphate isomerase	0,012	0,136	1	1	4,752
Q99JF5	Diphosphomevalonate decarboxylase	0,025	2,672	3	2	14,814
Q99JW2	Aminoacylase-1	0,001	0,293	8	3	39,099
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0,013	1,642	5	1	24,216
Q99KU0	Vacuole membrane protein 1	0,025	3,061	1	1	4,481
Q99MB2	Mitochondrial fission regulator 1	0,000	0,386	2	1	10,475
Q99NB8	Ubiquilin-4	0,015	0,496	12	3	70,493
Q99PM9	Uridine-cytidine kinase 2	0,041	0,660	1	1	5,918
Q9CQF9	Prenylcysteine oxidase	0,001	0,656	9	1	47,832
Q9CRA5	Golgi phosphoprotein 3	0,003	1,753	1	1	5,128
Q9CYN9	Renin receptor	0,026	0,467	7	3	39,611
Q9DIG1	Ras-related protein Rab-1B	0,007	1,741	15	2	75,686
Q9D3R3	Centrosomal protein of 72 kDa	0,000	0,334	2	1	9,693
Q9D892	Inosine triphosphate pyrophosphatase	0,001	2,492	1	1	5,734
Q9DAR7	m7GpppX diphosphatase	0,000	0,399	2	1	10,316
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	0,001	0,533	1	1	5,131

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özğün Peptid	Güvenlirlik Puanı
<i>Hipokampus (devam)</i>						
Q64373	Bcl-2-like protein 1	0,003	1,655	5	2	25,120
Q64514	Tripeptidyl-peptidase 2	0,000	2,317	8	1	41,235
Q6IR34	G-protein-signaling modulator 1	0,000	1,533	8	2	40,620
Q6KAU4	Multivesicular body subunit 12B	0,035	0,332	1	1	5,058
Q6KAU8	Autophagy-related protein 16-2	0,001	0,540	6	1	35,531
Q6NVD0	FRAS1-related extracellular matrix protein 2	0,003	0,635	30	11	156,256
Q6NZL0	Protein SOGA3	0,001	0,355	5	1	24,408
Q6P926	Spermatogenesis-associated protein 24	0,013	1,749	3	2	15,128
Q6P9L4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 49	0,000	0,308	2	1	8,585
Q6PD31	Trafficking kinesin-binding protein 1	0,001	2,174	3	2	13,711
Q6PHN9	Ras-related protein Rab-35	0,000	0,653	11	1	61,794
Q6PHZ8	Kv channel-interacting protein 4	0,018	0,656	2	1	11,170
Q6V4S5	Protein sidekick-2	0,015	2,833	3	3	12,740
Q70IV5	Synemin	0,001	0,255	5	2	30,354
Q791V5	Mitochondrial carrier homolog 2	0,020	0,485	4	1	20,036
Q80UG5	Septin-9	0,007	0,508	14	1	74,193
Q80UQ2	Ras association domain-containing protein 6	0,011	1,560	2	1	10,315
Q80UY2	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	0,005	1,912	3	1	15,728
Q80VC9	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	0,007	2,393	2	1	9,462
Q80VQ1-3	Isoform.3 of Leucine-rich repeat-containing protein 1	0,004	0,424	2	1	10,045

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenlirlik Puanı
<b>Hipokampus (devam)</b>						
Q9DCH4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	0,000	1,567	15	6	90,028
Q9EPQ2	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1	0,000	0,452	5	2	27,745
Q9ES28-5	Isoform E of Rho guanine nucleotide exchange factor 7	0,000	0,640	3	2	13,154
Q9EST5	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	0,020	1,745	5	1	35,884
Q9ESW4	Acylglycerol kinase, mitochondrial	0,000	0,469	5	1	25,208
Q9JH10	Serine/threonine-protein kinase 3	0,025	0,637	3	1	20,646
Q9JIV2-2	Isoform 2 of Profilin-2	0,049	1,990	10	3	49,312
Q9JKB3	Y-box-binding protein 3	0,001	0,603	22	6	138,214
Q9JLN9	Serine/threonine-protein kinase mTOR	0,000	0,409	36	9	174,116
Q9QYR7	Acyl-coenzyme A thioesterase 3	0,000	0,451	15	7	80,310
Q9QZM0	Ubiquilin-2	0,004	0,633	24	8	134,683
Q9WTR5	Cadherin-13	0,000	0,460	20	11	113,690
Q9Z1S5	Neuronal-specific septin-3	0,022	2,187	22	11	126,261
Q9Z2Y8	Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	0,045	3,701	4	1	20,824
<b>Serebellum</b>						
A3KMP2	Tetratricopeptide repeat protein 38	0,004	0,264	4	1	18,247
O08709	Peroxi redoxin-6	0,011	1,995	18	4	101,190
O35280	Serine/threonine-protein kinase Chk1	0,035	0,456	3	1	14,332
O55029	Coatomer subunit beta'	0,049	2,146	22	10	119,470
O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	0,000	0,594	55	14	312,211

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Serebellum (devam)</i>						
O88685	26S protease regulatory subunit 6A	0,026	0,455	35	11	187,037
O88939	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A	0,003	0,398	1	1	5,031
O89023	Tripeptidyl-peptidase 1	0,032	0,554	2	1	10,076
P09041	Phosphoglycerate kinase 2	0,033	15,838	16	1	78,092
P12382	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	0,044	0,477	4	2	20,814
P24452	Macrophage-capping protein	0,012	2,302	3	1	14,670
P28667	MARCKS-related protein	0,039	3,339	11	3	70,340
P28740	Kinesin-like protein KIF2A	0,042	0,608	10	6	41,893
P34821	Bone morphogenetic protein 8A	0,011	0,543	1	1	4,993
P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	0,009	2,109	10	2	57,493
P42703	Leukemia inhibitory factor receptor	0,018	0,511	1	1	6,133
P47754	F-actin-capping protein subunit alpha-2	0,026	2,015	24	6	153,944
P62814	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	0,000	0,652	44	15	265,574
P63044	Vesicle-associated membrane protein 2	0,007	0,647	7	3	45,765
P63087	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	0,000	1,859	16	1	87,891
P70333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	0,036	1,774	23	2	146,498
P82347	Delta-sarcoglycan	0,042	0,436	3	1	16,257
P97333	Neuropilin-1	0,014	0,645	5	3	25,170
P97496	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	0,005	0,553	15	2	75,336
P97855	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	0,003	1,617	16	3	91,192

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Serebelum (devamı)</i>						
P98203	Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome homolog	0,009	2,575	3	2	15,046
Q05D44	Eukaryotic translation initiation factor 5B	0,007	0,456	6	1	37,542
Q08890	Iduronate 2-sulfatase	0,021	2,350	8	2	47,135
Q3UNH4	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	0,049	0,524	15	4	88,415
Q504M8	Ras-related protein Rab-26	0,011	1,642	5	2	31,287
Q5D525	Synaptonemal complex central element protein 1-like	0,002	0,600	3	2	16,374
Q5HZH2	Ribosome biogenesis protein TSR3 homolog	0,035	0,443	2	1	17,254
Q512A0	Serine protease inhibitor A3G	0,033	4,580	2	1	10,173
Q60597-2	Isoform 2 of 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	0,016	0,590	5	3	27,403
Q60875	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	0,043	2,315	9	4	50,466
Q61666	Protein HIRA	0,010	2,634	3	1	15,977
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	0,044	0,659	57	9	326,645
Q62261	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,040	0,612	193	14	1122,345
Q62261-2	Isoform 2 of Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,040	0,612	161	1	943,862
Q61R34	G-protein-signaling modulator 1	0,012	1,788	8	2	40,620
Q6NZB1	Protein arginine N-methyltransferase 6	0,022	0,651	2	1	10,183
Q6NZL0	Protein SOGA3	0,027	0,255	5	1	24,408
Q6PDG5	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	0,007	1,565	25	3	147,543
Q6PKN7	Protein INCA1	0,008	0,617	3	3	23,989
Q6R2P8	Endonuclease 8-like 2	0,039	1,819	2	1	8,681

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgül Peptid	Güvenilirlik Puanı
<i>Serebellum (devam)</i>						
Q6ZWR4-3	Isoform 3 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A, 55 kDa regulatory subunit B beta isoform	0,041	0,466	7	1	43,783
Q80V26	Inositol monophosphatase 3	0,013	1,662	3	2	14,435
Q80VA0	N-acetylgalactosaminyltransferase 7	0,041	0,608	3	1	15,759
Q80VW5	Whirlin	0,017	0,211	3	1	15,124
Q80YD6	Secretion-regulating guanine nucleotide exchange factor	0,014	0,613	1	1	5,036
Q8BP47	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,000	0,624	12	8	65,266
Q8BU88	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	0,032	0,406	1	1	5,503
Q8K2Q7	BRO1 domain-containing protein BROX	0,004	0,593	18	5	106,998
Q8R3P6	von Willebrand factor A domain-containing protein 9	0,009	0,660	2	1	4,585
Q8VE97	Serine/arginine-rich splicing factor 4	0,039	1,918	3	1	11,192
Q91WG7	Diacylglycerol kinase gamma	0,037	0,619	5	3	24,290
Q921C5	Protein bicaudal D homolog 2	0,029	1,696	9	1	48,132
Q93092	Transaldolase	0,003	0,624	34	17	163,998
Q99KK7	Dipeptidyl peptidase 3	0,003	0,575	25	8	167,364
Q99MN1	Lysine--tRNA ligase	0,009	0,578	18	7	103,528
Q9CPQ3	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	0,027	1,528	2	1	11,219
Q9CRA5	Golgi phosphoprotein 3	0,012	2,454	1	1	5,128
Q9CZT8	Ras-related protein Rab-3B	0,049	0,653	9	2	59,382
Q9D0E1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,000	0,645	76	34	492,044
Q9D2G2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	0,047	2,074	3	1	17,566

Tablo 9.1: Anlamlı değişim gösteren proteinler (devamı)

Uniprot	Protein Adı	Anova (p)	5XFAD/ LM	Peptid Sayısı	Özgin Peptid	Güvenirlilik Puanı
<i>Serebellum (devam)</i>						
Q9D964	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	0,047	1,529	4	2	18,115
Q9DBY5	Chromobox protein homolog 6	0,006	0,393	1	1	5,388
Q9DC70	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	0,031	0,515	1	1	5,131
Q9EPQ2	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1	0,034	0,553	5	2	27,745
Q9ERE7	LDLR chaperone MESD	0,046	0,385	2	1	8,976
Q9JLN9	Serine/threonine-protein kinase mTOR	0,008	0,627	36	9	174,116
Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A	0,040	1,544	13	4	61,458
Q9QYR7	Acyl-coenzyme A thioesterase 3	0,046	0,644	15	7	80,310
Q9R0Y1	Acid-sensing ion channel 5	0,037	10,604	3	1	14,953
Q9R1P0	Proteasome subunit alpha type-4	0,003	0,626	11	3	53,121
Q9WTR5	Cadherin-13	0,047	0,604	20	11	113,690
Q9WTX5	S-phase kinase-associated protein 1	0,017	0,579	13	10	58,894
Q9WVA3	Mitotic checkpoint protein BUB3	0,002	1,648	7	2	39,175
Q9Z0E0	Neurochondrin	0,005	1,635	5	2	27,002
Q9Z0J4	Nitric oxide synthase, brain	0,006	2,057	8	1	37,881

## 10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI  
E-İmzalıdır



Sayı : 38828770-604.01.01-E.708  
Konu : Etik Kurulu Kararı

14/01/2016

**Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL**

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Yeni doğan Alzheimer Transgenik Fare Modelinde Faklı Beyin Bölgelerinde Protein Profil Değişimlerinin İncelenmesi” 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)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 14.01.2016 tarihinde e-İmzalanmıştır.  
Doğrulama Kodu: <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCodeDocumentViewer.aspx?Code=B0512EB0XA>





T.C.

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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/01/2016	08		Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

“Yeni doğan Alzheimer Transgenik Fare Modelinde Faklı Beyin Bölgelerinde Protein Profil Değişimlerinin İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Aralık 2015-Haziran 2016

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

## 11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler			
Adı	Aişe Rumeysa	Soyadı	Mazi
Doğum Yeri	İskenderun	Doğum Tarihi	31/07/1992
Uyruğu	Türk	TC Kimlik No	23647912802
E-mail	rumeysa.mazi@gmail.com	Tel	0538 505 9898

Eğitim Düzeyi		
	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	2016
Lisans	Fatih Üniversitesi	2014
Lise	Asfa Arda Asalet Lisesi	2010

İş Deneyimi		
Görevi	Kurum	Süre
1. Proje Asistanı	Acıbadem Üniversitesi	2015-2016
2. Araştırmacı	İstanbul Medipol Üniversitesi REMER	2014-2015
3. Öğretim Asistanı	Fatih Üniversitesi	2013-2014
4. Stajyer	Katip Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2013
5. Stajyer	Şifa Üniversitesi Bornova Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi	2012

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
			96					

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES	87,85871	88,62270	74,59932
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi	
Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
C Programlama Dili	Orta
Java Programlama Dili	Orta
Phyton Programlama Dili	Orta
Solidworks	Orta
MATLAB	Orta
PyMOL	İyi
Vector NTI	İyi